



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA-VITERBO
Dipartimento di Scienze Ambientali

Corso di Dottorato di Ricerca
in
EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA XIX CICLO

Ruolo biologico dell'ormone lattogeno placentare nel differenziamento della cellula beta pancreatica.

Settore scientifico disciplinare: BIO/06

Coordinatore Prof.ssa Lucia Mastrolia

.....

Tutori

Prof.ssa Nicla Romano- Università della Tuscia-Viterbo

.....

Prof. Davide Lauro- Università degli Studi di Roma TorVergata

.....

Dottorando - Dott.ssa Barbara Bartolini

.....

A Omy, Pao e Papparino...

*A tutte le persone che credono nella Scienza...
...e agli Stregoni Bianchi, che ogni giorno si perdono nei labirinti di un microscopio...
nell'intento, o nell'illusione, di capire...*

INDICE

RIASSUNTO DELLA TESI	pag. 6
CAPITOLO I	
Introduzione generale	pag. 8
Il pancreas	pag. 8
Anatomia e struttura del pancreas	pag. 8
Le popolazioni cellulari del pancreas endocrino	pag. 10
Le cellule beta	pag. 11
Le cellule alfa	pag. 12
Le cellule delta	pag. 12
Le cellule PP	pag. 12
La secrezione insulare	pag. 13
Generalità sull'organogenesi del pancreas	pag. 13
Ruolo di alcuni fattori di crescita nell'ontogenesi della cellula beta pancreatica	pag. 15
Ormoni lattogeni	pag. 22
L'ormone della crescita	pag. 23
La prolattina	pag. 24
L'ormone lattogeno placentare	pag. 25
SCOPO DELLA TESI	pag. 28
CAPITOLO II	
Espressione e purificazione dell'ormone hPL-A	
Introduzione	pag. 29
Materiali e Metodi	pag. 30
Metodo 1 di espressione e purificazione dell'ormone lattogeno placentare	pag. 30
Trasformazione di DNA plasmidico in batteri competenti	pag. 30
Mini preparazione di DNA plasmidico	pag. 31
Maxi preparazione di DNA plasmidico	pag. 31
Espressione della proteina ricombinante hPL-A	pag. 32
Purificazione della proteina ricombinante hPL-A	pag. 33
Dialisi	pag. 33
Cromatografia su colonna	pag. 34
Metodo 2 di espressione e purificazione dell'ormone lattogeno placentare	pag. 35
Subclonaggio del cDna di hPL-A nel vettore pETM-11	pag. 35
Ligazione del cDna di hPL-A nel vettore plasmidico pETM-11	pag. 36
Trasformazione del plasmide pETM-11/hPL-A in E.coli	pag. 36
Mini preparazione del Dna plasmidico pETM-11/hPL-A	pag. 36
Maxi preparazione del Dna plasmidico di pETM-11/hPL-A	pag. 38
Pre-inoculo	pag. 39
Inoculo e induzione	pag. 39
Purificazione della proteina ricombinante hPL-A	pag. 39
Cromatografia per affinità con chelanti di metalli	pag. 40
Dialisi	pag. 41
Taglio proteolitico	pag.42

Cromatografia liquida su colonna: “Fast Protein Liquid Chromatography”	pag. 43
Cromatografia ad esclusione di peso molecolare	pag. 43
Cromatografia a scambio cationico	pag. 44
Cromatografia a scambio anionico	pag. 44
Analisi elettroforetica	pag. 45
Risultati	pag. 47
Discussione	pag. 57

CAPITOLO III

Via di induzione intracellulare dell’ormone lattogeno placentare nelle cellule del dotto pancreatico

Introduzione	pag. 58
Materiali e Metodi	pag. 61
Risultati	pag. 63
Discussione	pag. 65

CAPITOLO IV

hPL-A induce il differenziamento delle cellule del dotto pancreatico in cellule insulino secernenti.

Introduzione	pag. 67
Materiali e Metodi	pag. 69
Analisi morfologica e di immunofluorescenza	pag. 69
Risultati dell’ analisi morfologica delle cellule PANC-1	pag. 71
Risultati dell’analisi di Immunofluorescenza di cellule PANC-1	pag. 72
Discussione	pag. 74

CAPITOLO V

Analisi proteomica delle cellule PANC-1 differenziate in cellule esprimenti insulina

Introduzione	pag. 76
Materiali e Metodi	pag. 78
Preparazione del campione e Focalizzazione isoelettrica	pag. 78
Elettroforesi bidimensionale classica: 2D-Gel	pag. 79
Digestione triptica delle proteine	pag. 80
La spettrometria di massa	pag. 80
Identificazione MALDI-TOF delle proteine	pag. 82
Identificazione LC MS/MS di proteine	pag. 83
Tecnica Differences Gel Electrophoresis (Ettan™ DIGE)	pag. 84
Saggi di controllo: labelling efficiency e same same same	pag. 85
Labelling efficiency	pag. 86
Same-same-same	pag. 86
Marcatura covalente dei lisati totali PANC-1	pag. 87
Analisi d’immagine ed escissione degli spot proteici	pag. 88
Risultati dell’Analisi 2D-Gel	pag. 89
Risultati Analisi DIGE	pag. 97
Discussione	pag. 105

Appendice del capitolo IV pag. 109

CAPITOLO VI

Conclusioni pag. 113

Materiali utilizzati in questa tesi pag. 116

Ringraziamenti pag. 119

Bibliografia pag. 120

RIASSUNTO

Il Diabete Mellito è una delle patologie più diffuse nella società occidentale e nei paesi industrializzati e si manifesta con un'alterata secrezione di insulina da parte delle cellule beta del pancreas con conseguente iperglicemia. Ad oggi l'unica terapia per la cura del diabete è la somministrazione di insulina e/o analoghi ed in ultima istanza il trapianto d'organo. A riguardo sono stati sviluppati differenti protocolli per il trapianto di pancreas, come ad esempio sembra che il trapianto combinato pancreas-rene produca una migliore aspettativa di vita.

Attualmente è in corso di sviluppo la tecnica di trapianto di isole del Langherans in sostituzione al trapianto d'organo/i, rispetto al quale ha il vantaggio di essere meno invasivo e quindi più idoneo per l'applicazione nei bambini. Tuttavia il trapianto d'organo e di isole pancreatiche è limitato a causa di una scarsa disponibilità di donatori. Per ovviare a questa problematica di approvvigionamento in molti laboratori di ricerca sono in corso studi per ottenere cellule beta pancreatiche dal differenziamento di cellule staminali embrionali, da cellule staminali derivanti dal midollo osseo, o di cellule staminali pancreatiche duttali; dal dedifferenziamento e transdifferenziamento di tipi cellulari diversi.

E' stato dimostrato che le cellule beta pancreatiche possono proliferare in seguito a numerosi stimoli fisiologici e patofisiologici.

Un gran numero di fattori di crescita hanno mostrato aumentare la proliferazione delle cellule beta, la massa e la loro funzione. Tra i fattori di crescita sono importanti l'ormone lattogeno placentare (PL), l'ormone della crescita (GH) e la prolattina (PRL), che appartengono ad una famiglia di ormoni polipeptidici omologhi e comuni a differenti specie dai primati ai pesci teleostei. PL è prodotto dalla placenta esclusivamente durante la gravidanza ed è il fattore principalmente responsabile dell'incremento della massa delle isole pancreatiche e della loro funzione. PL esercita una maggiore attività mitogena sulle cellule beta pancreatiche rispetto GH e PRL, quindi, potrebbe avere un potenziale ruolo nella sopravvivenza e funzione delle isole prima e/o dopo il trapianto.

Il nostro interesse si è rivolto al possibile ruolo biologico dell'ormone hPL-A nel differenziamento cellulare.

Lo scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di ottimizzare una metodica di espressione e purificazione dell'ormone lattogeno placentare umano (isoforma A) (hPL-A), non reperibile commercialmente, fisiologicamente attivo, che possa essere utilizzato nello

studio del possibile ruolo esercitato da hPL-A nel differenziamento di cellule del dotto pancreatico in cellule beta e analizzare il meccanismo molecolare di trasduzione del segnale. In questo studio come modello cellulare è stata utilizzata la linea cellulare PANC-1 (adenocarcinoma umano del dotto pancreatico). Le cellule siero deprivate sono state stimulate con 500 ng/ml di proteina ricombinante per 96 ore, seguendo un protocollo sperimentale da noi sviluppato.

I risultati riportati in questa tesi mostrano che l'ormone hPL-A stimola la fosforilazione delle proteine AKT e MAPK (p44/p42), da cui si evince un possibile ruolo biologico di PL nel mediare il segnale che induce la sopravvivenza della cellula beta pancreatica; l'analisi di immunofluorescenza indica che le cellule trattate cambiano la loro morfologia ed esprimono marcatori molecolari delle cellule beta pancreatiche (Insulina, Peptide-c, Glut-2 e PDX-1). Inoltre, con l'analisi proteomica (2D-Gel, DIGE) abbiamo valutato il cambiamento nell'espressione proteica associato al differenziamento morfologico e molecolare evidenziato dall'analisi di immunofluorescenza. I risultati ottenuti suggeriscono che la condizione di siero deprivazione e/o di stimolazione ormonale hanno apportato un cambiamento anche nell'assetto del proteoma delle cellule PANC-1, fornendo un quadro coerente con un processo di differenziamento delle cellule tumorali di origine duttale a cellule con caratteristiche morfologiche e funzionali diverse.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE GENERALE

Il pancreas

Il pancreas svolge un importante ruolo di regolatore del metabolismo attraverso il funzionamento ghiandolare delle sue popolazioni cellulari (Casella et Taglietti, 1998). Una delle patologie più importanti derivata dalla disfunzione del pancreas è il diabete, questa patologia deriva da un arresto della funzionalità delle beta cellule pancreatiche che, attraverso la secrezione di insulina, agiscono in antagonismo con le cellule alfa per controllare il livello di glucosio ematico (Casella et Taglietti, 1998). Negli ultimi anni, gli studi per curare il diabete si sono spostati verso la possibilità di effettuare trapianti di beta cellule negli individui con diabete di tipo I (Lacy, 1982; Shapiro et al., 2000; Ryan et al., 2001), ma la scarsità di materiale biologico a disposizione impedisce a questa tecnica di diventare una terapia su larga scala, e quindi si stanno studiando in molteplici laboratori nel mondo: 1) le fasi che portano al differenziamento delle beta cellule 2) i fattori di trascrizione che attivano e regolano questo processo differenziativo e 3) lo sviluppo di metodiche per realizzare beta cellule e/o loro surrogati che siano potenzialmente trapiantabili nei pazienti diabetici.

Anatomia e struttura del pancreas

Il pancreas è una ghiandola annessa all'apparato digerente ed è formata da: pancreas esocrino, pancreas endocrino e dotti pancreatici (figura 1) (Casella et Taglietti, 1998).

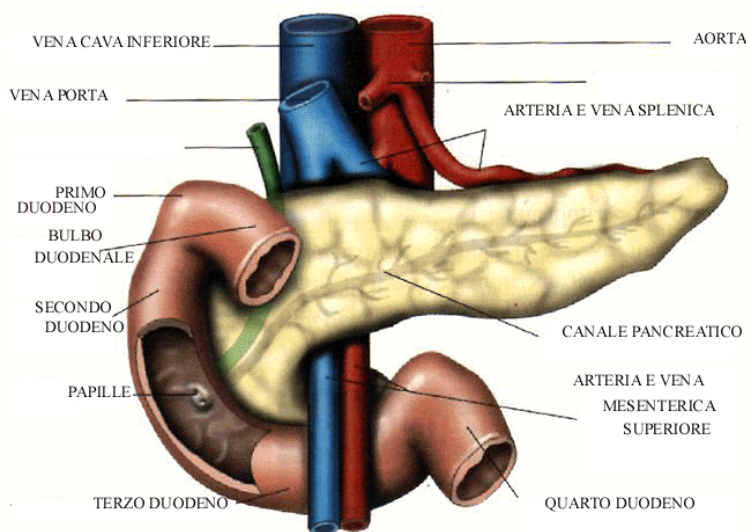


Figura 1 – Rappresentazione di pancreas umano (Greco e Ghirlanda, 1997 e Castano, 1987).

Sia dal punto di vista della struttura che delle funzioni il pancreas è costituito da due parti ben differenziate, l'una a secrezione esterna (pancreas esocrino), di tipo acinare, simile alla struttura delle ghiandole salivari, devoluta a produrre enzimi digestivi, che vengono secreti tramite un dotto nel primo tratto duodenale (Brubaker et Drucker, 2004) e l'altra, a secrezione interna, (pancreas endocrino), che comprende le isole di Langerhans.

Il pancreas esocrino è formato da lobi suddivisi in lobuli quindi è una ghiandola acinosa composta, ed è costituito da un tessuto connettivo scarso e per lo più formato da cellule adipose e condotti escretori di diverse dimensioni. Inoltre si vengono a formare acini di diversa grandezza semplici e composti da raggruppamenti di più unità, chiamati adenomeri, rivestiti da una membrana propria formata da fibrille reticolari, le cellule ghiandolari situate all'interno degli acini (cellule centroacinose) sono coniche con grossi granuli di zimogeno che, emessi nel lume, si trasformano in fermento pancreatico, importante per la digestione.

I condotti di escrezione del pancreas sono due: il condotto principale e quello accessorio, chiamati anche di Santorini e di Wirsung, entrambi sono formati da tessuto connettivo con fibre elastiche e miocellule (figura 2) (Casella et Taglietti, 1998).

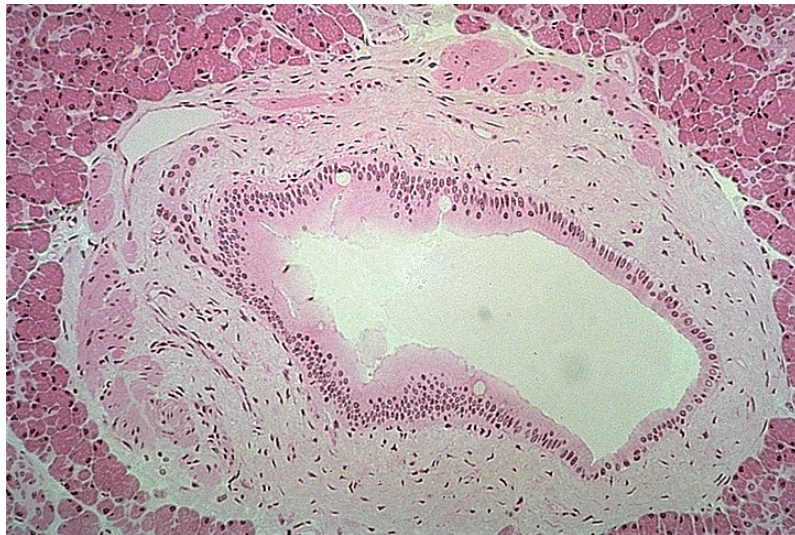


Figura 2 - Sezione trasversale di un dotto pancreatico umano. Sono visibili intorno al lume duttale le cellule centroacinose circondate dalle cellule del parenchima ghiandolare. Colorazione ematossilina-eosina. Ingrandimento 612X.

Il pancreas endocrino è composto da 2×10^5 a 18×10^5 isole di Langerhans, corpi sparsi nel tessuto esocrino con forma globosa e colore rossastro, riuniti in cordoni sottili e sinuosi che formano una struttura reticolare, ed in più sono collegati ad una fitta rete di capillari nei quali vengono liberati gli ormoni prodotti, che quindi entrano prontamente in circolo per svolgere le loro funzioni. Le isole di Langerhans sono costituite da quattro tipi cellulari che secernono ormoni necessari al controllo dell'omeostasi del glucosio nel sangue: cellule alfa, beta, delta e PP producenti rispettivamente glucagone, insulina, somatostatina e polipeptide pancreatico (Bernat, 2001). (Figura 3). In più nelle isole terminano neuroni simpatici e parasimpatici, che mettono in evidenza l'azione di controllo che il sistema nervoso attua sul metabolismo.

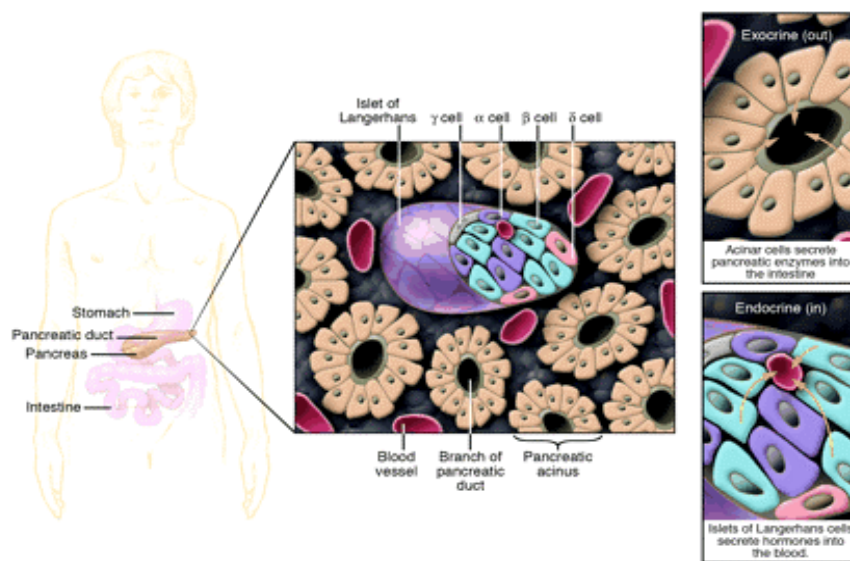


Figura 3 –Rappresentazione di una sezione trasversale di pancreas.

Il pancreas è formato da due differenti tessuti. Il tessuto esocrino che comprende le cellule acinose che secernono enzimi necessari alla digestione ed il tessuto endocrino costituito dalle isole di Langerhans. Ciascuna isola include 4 tipi di cellule (α , β , δ e PP). (Journal of Clinical Investigation, 2005)

Le popolazioni cellulari del pancreas endocrino

I quattro tipi cellulari principali che costituiscono il pancreas endocrino (Isole del Langherans) hanno caratteristiche di sviluppo, morfologiche e funzionali, per la maggior parte differenti (figura 4). Nell'uomo, la prima popolazione cellulare che mostra un differenziamento è quella alfa, seguita, alla decima settimana, da quella delta, quindi dalla beta, ed infine dalla PP, quindi si ritiene che le cellule alfa derivino direttamente da un precursore pancreatico unico, esprimente glucagone e derivante dai dotti pancreatici, mentre tutte le altre derivino da cellule pluripotenti intermedie; a sostegno di questa ipotesi c'è il fatto che le cellule endocrine del pancreas fetale sono capaci di sintetizzare tutti e quattro gli

ormoni pancreatici, nell'adulto invece no, si specializzano nella produzione e secrezione di un solo ormone (Greco et Ghirlanda, 1997).

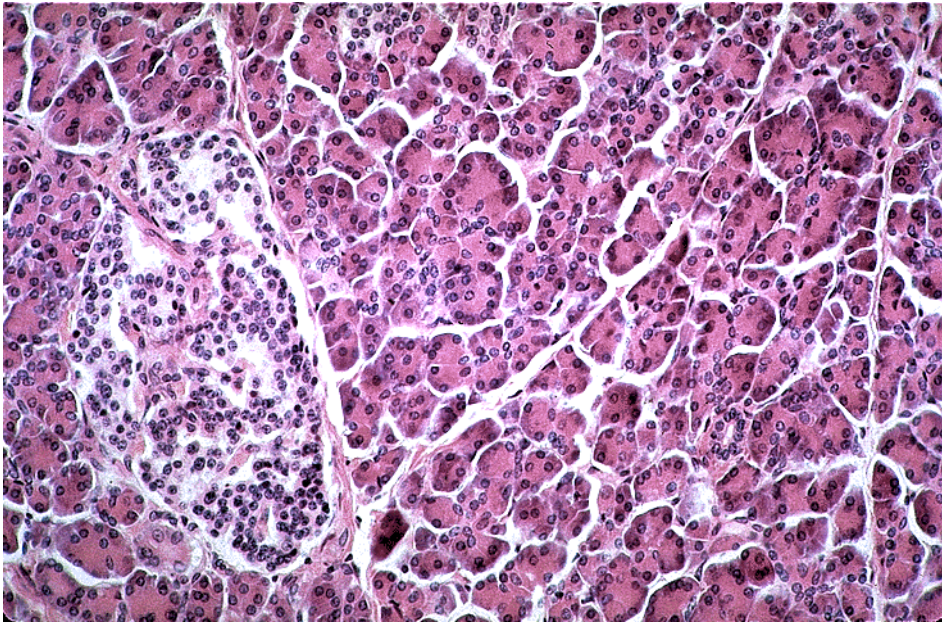


Figura 4 -Sezione istologica Isola di Langerhans umana. Le isole del Langerhans costituiscono la parte endocrina del pancreas e risultano inframezzate al parenchima ghiandolare. La ghiandola risulta lobulata dalla presenza di setti connettivali che ne suddividono il parenchima. Colorazione ematossilina-eosina. Ingrandimento 700x.

Le cellule beta

Le cellule beta (figura 5) sono di forma poliedrica e raggruppate attorno ai capillari, quindi ciascuna ha una faccia a contatto con la parete endoteliale, i granuli al loro interno hanno un diametro di 0,25-0,40 micrometri, e sono di due tipi principali: i granuli maturi, uniformemente distribuiti nel citoplasma, hanno un centro cristallino di forma rettangolare, e contengono essenzialmente insulina in cristalli elettrondensi (esameri di zinco-insulina), i granuli chiari si trovano in prossimità dell'apparato di golgi e formano una massa rotondeggiante, circondata da una membrana di clatrina, infatti contengono soprattutto pro-insulina, precursore dell'insulina (Orci, 1986).

L'insulina agisce come antagonista del glucagone favorendo la polimerizzazione del glucosio, quindi se l'insulina è assente crescerà la concentrazione di glucosio nel sangue, se invece è presente la concentrazione calerà. Oltre ai geni che si occupano della trascrizione dell'insulina (Insulin-1 e -2), sono individuati anche altri marker caratteristici delle cellule beta: IAPP (islet amyloid polypeptide) e GLUT-2, gene che trascrive per il trasportatore del glucosio della cellula beta (Lumelsky et al., 2001).

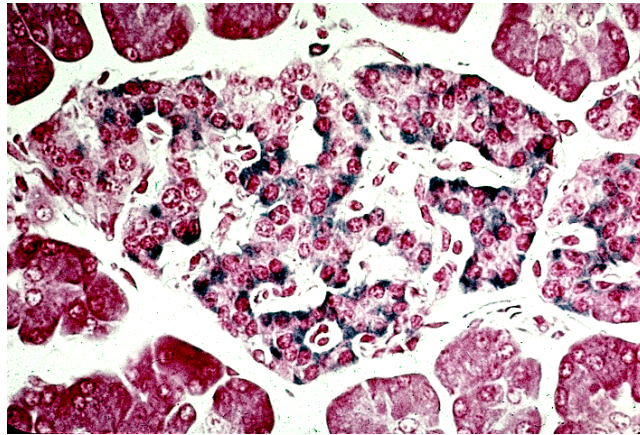


Figura 5 – Sezione istologica di pancreas umano. Dettaglio di Isola di Langerhans in cui sono visibili cellule beta al centro e cellule alfa nella periferia. Colorazione ematossilina-eosina. Ingrandimento 612x.

Le cellule alfa

Le cellule alfa, sono cilindriche e più piccole delle cellule beta, producono e secernono glucagone che antagonizza l'azione dell'insulina riportando a valori normali la concentrazione del glucosio promuovendo l'idrolisi dei depositi di glicogeno.

Le vescicole contenenti glicogeno hanno un diametro compreso fra 0,20-0,30 micrometri, e, analogamente a quelle presenti nelle cellule beta, possono contenere l'ormone in forma più o meno processata a seconda del grado di maturazione dei granuli stessi (Lacy et al., 1979).

Le cellule delta

I granuli delle cellule delta contengono somatostatina, hanno un diametro compreso fra 0,15-0,40 micrometri, e al loro interno l'ormone riempie tutto lo spazio; la somatostatina è un ormone capace di inibire il rilascio dell'ormone somatotropo dall'ipofisi anteriore ed anche la gastrina, gli enzimi pancreatici, l'insulina e il glucagone (Luft et al., 1974).

Le cellule PP

Le cellule PP contengono granuli secretori rotondeggianti e molto piccoli, a differenza delle altre linee ne possiamo trovare anche in posizione extra-insulare e perfino nel tessuto acinare. Queste producono il polipeptide pancreatico di cui ancora non è stato chiarito

pienamente il significato biologico, anche se sicuramente inibisce la secrezione pancreatica esocrina (Williams et Bloom, 1992).

La secrezione insulare

Gli ormoni secreti da questi citotipi quindi, sono coinvolti in processi molto importanti dell'organismo, e soprattutto nella regolazione del metabolismo. In questa risulta essenziale la produzione e la secrezione di insulina attuata dalle cellule beta. La secrezione insulare viene regolata da fattori estrinseci quali: il livello di glucosio ematico, l'azione di ormoni e peptidi insulari e del tratto gastrointestinale, e dall'innervazione autonoma delle isole (Halban et Wier, 1990); la stimolazione colinergica stimola la secrezione di glucagone e insulina, quella adrenergica ha la stessa azione se lega i recettori beta, mentre la inibisce se lega i recettori alfa-2. Ma esistono anche fattori intrinseci, per esempio la capacità delle cellule delle isole di controllarsi reciprocamente tramite gli ormoni prodotti che passano attraverso giunzioni cellulari (Meda et al., 1982), per esempio aumenti di insulina abbassano la secrezione di glucagone (Raskin et al., 1975).

Generalità sull'organogenesi del pancreas

Nei vertebrati tutti gli organi hanno origine dai tre foglietti primitivi o blastomeric: 1) ectoderma che è più esterno dell'embrione e da origine successivamente all'epidermide, alle cellule nervose, all'ipofisi ed alla retina; 2) mesoderma, a collocazione intermedia, che è responsabile dello sviluppo di gran parte del cosiddetto "mesenchima", costituito da sostanza fondamentale di connettivo gelatinoso e da cellule stellate o fusate, riscontrabile in tutti i tessuti trofoconnettivali (fra cui il derma), nel tessuto muscolare liscio ed in quello striato, nonché negli elementi corpuscolati del sangue e della linfa; 3) endoderma, il più interno, da cui generano tutti gli epiteli o rivestimenti interni, sia del tubo digerente che dell'apparato respiratorio e delle vie urinarie, il fegato, il pancreas, gran parte della tiroide, il timo, la prostata (Gilbert, 2001).

Le cellule che compongono l'endoderma sono cellule che risultano sensibilizzate ai fattori di trascrizione che dirigeranno poi il loro destino cellulare, ed il conseguente differenziamento (Gilbert, 2003). E' probabile che già nell'endoderma si formino delle "aree di competenza" che influenzano, in maniera pleiotropica, il differenziamento nei vari tessuti circostanti. Queste aree di competenza si pensa esplicino la loro funzione attraverso dei coattivatori trascrizionali di competenza (FOXA) che danno, appunto, competenza ai geni

dell'endoderma ventrale. Le Proteine FOXA agiscono direttamente sulla cromatina addensata del nucleosoma (indipendentemente dal grado di acetilazione degli istoni), esponendo un dominio genico aperto con la regione del promotore accessibile ai fattori di trascrizione veri e propri. Questi ultimi attivano geni specifici agendo direttamente su quelli esposti dalle proteine FOXA (Lee et al., 2002). L'azione di questi fattori di trascrizione determina una competenza differenziativa delle cellule del pancreas rispetto a quelle del fegato infatti, quelli che attivano nelle cellule la funzione epatica, inibiscono, contemporaneamente, quella pancreatico e viceversa. I fattori di trascrizione, implicati nel processo differenziativo dei due organi, risultano differenti nella composizione e nel loro ruolo coordinato nel controllare "l'accensione" e lo "spegnimento" di geni implicati nel differenziamento (Chakrabarti et Mirmira, 2003). La proliferazione e la morfogenesi del pancreas sono sotto il controllo di molecole di origine mesodermica: fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e fattore di crescita epidermico (EGF). FGF sembra essere necessario anche per la funzione delle cellule beta dell'organismo adulto. Il gene Isl-1 controlla lo sviluppo dell'abbozzo dorsale del pancreas ed induce l'espressione del precursore Pancreas duodenum Homeobox-1 Pdx-1 (Danielle et al., 2004) (Figura 6).

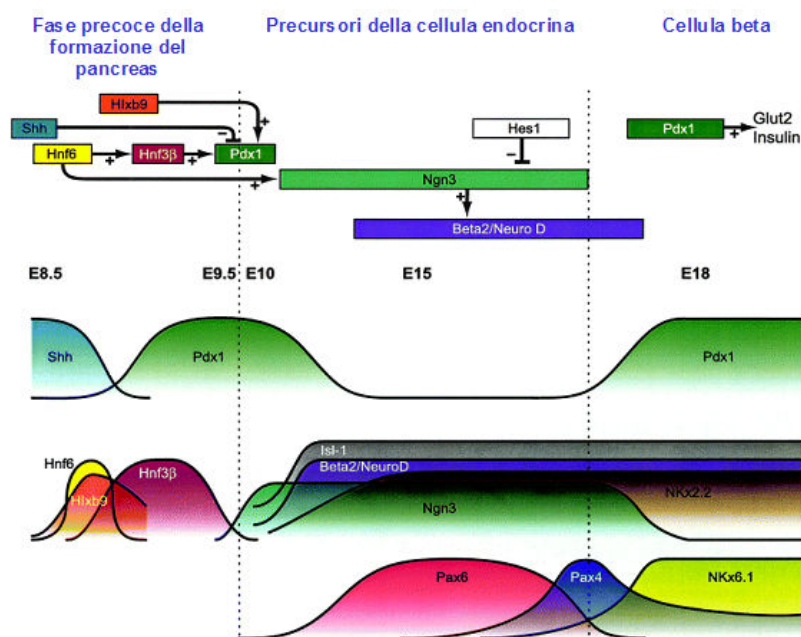


Figura 6 - Espressione sequenziale di alcuni fattori di trascrizione del differenziamento β -cellulare (Differentiation, 2001). Il gene Isl-1 induce l'espressione di PDX-1, che ha un ruolo fondamentale nel differenziamento della cellula beta, nella regolazione della trascrizione dell'insulina e di GLUT-2. Altri fattori di trascrizione specifici nel differenziamento del pancreas endocrino sono Pax-6, Nkx2.2, Nkx6.1, Beta2/Neuro D, e Ngn3, Pax-4 e Pax-6.

Attualmente, si pensa che il prodotto genico Pdx-1 svolga un ruolo primario nell'indurre non solo il differenziamento delle cellule beta pancreatiche ma anche la regolazione della trascrizione dell'insulina e di Glut-2 (Kajimoto et al., 1997; Stoffer et al., 1998; Bernat, 2001). Sulla regolazione del gene dell'insulina intervengono anche altri geni omeotici, quali *lmx-1* e *cdx-3* (German et al., 1992; Rudnick et al., 1994).

Esistono altri fattori di trascrizione specifici che agiscono per il differenziamento endocrino del pancreas come *Pax-6*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, *Beta2/Neuro D*, e *Ngn3*, *Pax-4* e *Pax-6*. Queste proteine sono costituite da omeodomini e vengono espresse anche nel pancreas adulto: *Pax-6* è richiesto per la generazione delle cellule alfa, mentre *Pax-4* è un fattore chiave per il differenziamento delle cellule beta e delle cellule delta.

Un'altra proteina omeodominio è rappresentata da *Nkx2.2* che gioca un ruolo importante nello sviluppo delle cellule beta pancreatiche ed è indispensabile per l'espressione genica dell'insulina (Sussel, 1998). La proteina *Ngn3* è implicata nello sviluppo di tutti e quattro i tipi cellulari (Jensen et al., 2000) ed induce l'espressione di *Beta2/Neuro D*, implicati nella trascrizione del gene dell'insulina.

Ruolo di alcuni fattori di crescita nell'ontogenesi della cellula beta pancreatica

Le isole pancreatiche, fino a poco tempo fa, erano considerate cellule terminali differenziate, incapaci di proliferare.

Studi condotti in diversi laboratori nel corso degli anni hanno dimostrato che le cellule beta possono proliferare in risposta a stimoli fisiologici, fisiopatologici (iperglicemia, gravidanza, pancreatoma) e in risposta a manipolazioni genetiche che possono indurre insulino-resistenza (come l'assenza del recettore insulinico o di una delle molecole IRSs che trasmettono il segnale dell'insulina nella cellula) (Efrat et al., 1996; Sorenson et Brelje, 1997). L'ipoglicemia prolungata, il rimodellamento delle isole materne e fetali dopo il parto, il danno indotto da sostanze tossiche (streptozotocina, interleuchina-1, TNF- α , INF-gamma) e l'attacco autoimmune che si verifica nel diabete di tipo I sono alcune delle condizioni in cui aumenta il numero di cellule beta che vanno incontro a morte cellulare.

Durante la vita fetale e nell'adulto, esisterebbe una riserva di cellule beta staminali, che darebbero luogo alla formazione di nuove isole ("neogenesi delle isole") (Bonner et al., 1993; Fernandes et al., 1997). I precursori cellulari che darebbero origine a queste nuove isole

risiederebbero nel dotto pancreatico, dal dotto principale fino alle piccole ramificazioni o nelle isole di Langerhans (Krakowski et al., 1999).

Sono stati proposti diversi processi: replicazione di cellule beta pre-esistenti, possibilmente attraverso dedifferenziamento, espansione e redifferenziamento (Dor et al., 2004); differenziamento di cellule staminali/progenitrici presenti nell'epitelio duttale; differenziamento di cellule staminali/progenitrici che non provengono dall' isole di Langerhans, dai dotti e dagli acini; transdifferenziamento di cellule acinari (Weir et Weir 2005) (Figura 7).

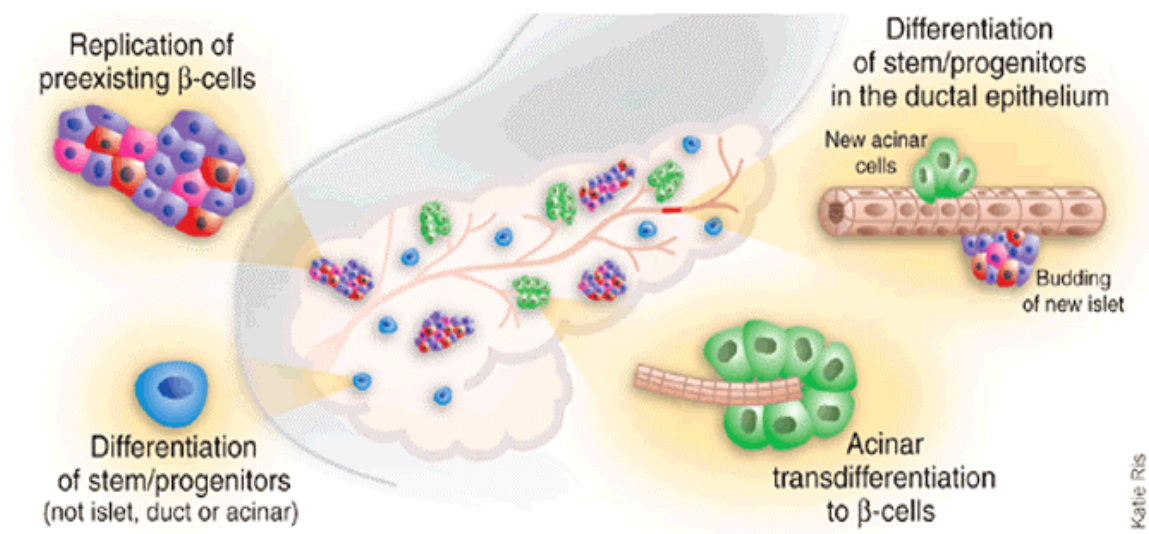


Figura 7- Il pancreas come fonte di nuove cellule beta (Nature biotechnology, 2005). Modelli proposti per la neogenesi delle isole pancreatiche: replicazione di cellule beta pre-esistenti, differenziamento di cellule staminali/progenitrici presenti nell'epitelio duttale, differenziamento di cellule staminali/progenitrici che non provengono dall' isole di Langerhans, dai dotti e dagli acini; transdifferenziamento di cellule acinari

Negli animali adulti, incluso l'uomo, sembra esserci un bilanciamento tra la perdita di cellule beta mature attraverso la morte cellulare e un concomitante processo di proliferazione delle cellule beta già esistenti e di neogenesi. Nei roditori circa il 3% di cellule beta viene rinnovato ogni giorno (Finegood et al., 1995; Swenne, 1992; Miyaura et al., 1991; Scaglia et al., 1995). In questo contesto un gran numero di molecole giocano un ruolo determinante, ad esempio molecole che regolano il segnale ed il ciclo cellulare (IRS-1, e -2, AKT, cdk4, Bcl-2, Bclx (L)), fattori di trascrizione specifici per le isole pancreatiche (Isl-1, Pdx-1, PAX-4 e -6, neurogenina-3) e fattori di crescita (HGF, KGF, PTHrP, GH, PRL, PL, IGF-1 e -2, GLP-1, FGF) che hanno un ruolo importante nel determinare un aumento della proliferazione, della massa e della funzione della cellula beta (Vasavada et al., 2005).

Il fattore di crescita degli epatociti (HGF) è una proteina di origine mesenchimale identificata come un fattore circolante nella rigenerazione del fegato. La forma attiva è rappresentata da un eterodimero costituito da un ponte disolfuro, formato da una catena alfa di 69 kDa e da una catena beta di 34 kDa.

HGF svolge attività mitogenica, motogenica, morfogenetica ed anti-apoptotica in diversi tipi cellulari (Stuart et al., 2000). Per esplicitare le proprie funzioni, HGF si lega con alta affinità ed induce la dimerizzazione di un recettore transmembrana codificato dal protooncogene c-met (p190^{MET}) (Furge et al., 2000).

Diversi studi in vivo ed in vitro hanno evidenziato che HGF è un potente mitogeno per molti tipi cellulari che esprimono c-met, comprese le cellule del tubulo renale, cellule endoteliali, condrociti, osteoblasti e cellule ematopoietiche (Stuart et al., 2000). Inoltre HGF in vitro svolge una forte azione mitogena anche per le isole pancreatiche umane sia fetali che adulte (Otonkoski et al., 1996). Nelle isole fetali umane, HGF incrementa la porzione di cellule insulino-positivo ed il numero di β -cellule replicanti (Otonkoski et al., 1994; Beattie et al., 1996).

In ugual modo, HGF è in grado di incrementare la proliferazione delle β -cellule in isole umane adulte quando vengono mantenute in coltura in una matrice extracellulare (Beattie et al., 1997). Attraverso l'analisi del meccanismo di trasduzione del segnale, è stato visto che HGF nelle cellule di insulinoma di ratto (INS-1) incrementa la replicazione cellulare attraverso l'attivazione delle proteine PI3K e AKT ma non attraverso l'attivazione delle proteine Erk1/Erk2 (Gahr et al., 2002).

In vivo il topo transgenico per HGF un aumento della massa e della proliferazione delle cellule beta risultando in una ipoglicemia ed iperisulemia (Garcia et al., 2000).

Un altro fattore, il KGF (keratinocyte growth factor) membro della famiglia degli FGF leganti eparina, sembra avere un'alta specificità per le cellule epiteliali del pancreas fetale (Movassat et al., 2003). In vivo viene fatto agire su cellule di pancreas fetale umano trapiantate in ratti privati del timo (un organo linfoide primario per il differenziamento dei linfociti T) (Hutchings et al., 1993). Questo trattamento sembra implementare il numero di cellule beta insulino-produttrici, nel giro di otto settimane (Movassat et al., 2003). Grazie a questi risultati KGF risulta capace di stimolare la proliferazione delle cellule beta e di esprimere il suo effetto differenziativo su cellule epiteliali duttali.

La proteina Parathyroid hormone-related (PTHrP) inizialmente identificato, come fattore tumorale responsabile della malignità nell'ipercalcemia umorale, svolge un ruolo fisiologico nello sviluppo e nel differenziamento di diversi organi (Garcia et al., 2002). PTHrP, attraverso

la porzione NH₂-terminale, si lega al proprio recettore associato alla proteina G, in una regione presente nella parte transmembrana definita come PTH1 (PTH1R). La proteina PTHrP viene espressa nei quattro tipi cellulari delle isole di Langerhans (α , β , δ e PP) (Druker, 1989), particolarmente presente nelle cellule beta (Fujinaka et al., 2004), dove, da esperimenti in vitro, induce un effetto mitogenico (Villenuaeva-Penacarillo et al., 1999).

Questo effetto mitogeno di PTHrP sembra essere mediato dall'attivazione della proteina PKC piuttosto che attraverso la produzione di cAMP e l'attivazione di PKA. Recentemente è stato visto che PTHrP stimola la proliferazione nelle cellule INS-1 attraverso l'attivazione di PKC- ζ (Garcia et al., 2005).

Il topo transgenico PTHrP per le cellule beta, creato utilizzando il promotore dell'insulina II del ratto (RIP), mostra iperplasia delle isole, una significativa ipoglicemia sia in condizioni di digiuno che non-digiuno ed una inappropriata iperinsulemia, dovuta ad una sovra-regolazione dell'espressione dell'insulina sia a livello di mRNA che di proteina. L'incremento delle massa delle isole che si osserva nei topi RIP- PTHrP, non sembra essere il risultato di un aumento della proliferazione di cellule beta preesistenti bensì di una diminuzione della frequenza con la quale le cellule beta vanno incontro ad apoptosi e/o neogenesi (Garcia et al., 2001).

Gli ormoni descritti come lattogeni (ormone della crescita o GH, prolattina o PRL e lattogeno placentare o PL) sono considerati potenti induttori della replicazione della cellula beta senza comprometterne l'abilità di produrre insulina (Sorenson et Brelje, 1997).

GH e PRL agiscono sulla divisione delle cellule beta coinvolgendo le proteine Jak/Stat e in modo particolare attraverso la rapida traslocazione nel nucleo di Stat-5b; tuttavia l'effetto di GH è transitorio rispetto a quello osservato per PRL (Brelje et al., 2004). In particolare la replicazione delle cellule beta indotta dalla PRL dipende dall'attivazione delle proteine Jak-2/Stat-5 ed è indipendente dall'attivazione delle proteine Erk1/Erk2, PI3K e PKC; in questo processo la ciclina D2, regolatore del ciclo cellulare, potrebbe essere il possibile gene bersaglio di Stat-5 (Friedrichsen et al., 2001) (Figura 5). Attualmente, non è completamente nota la cascata molecolare della trasduzione del segnale indotta dall'ormone lattogeno placentare nella cellula beta.

Studi in vitro hanno evidenziato che PL esercita sull'isola pancreatica un'azione mitogena più potente di GH o di PRL (Bonner et al., 1989; Korec, 1993). In topi e ratti esistono due forme di PL. La prima forma (PL I) può essere specifica per il mantenimento del corpo luteo, mentre la seconda forma (PL II) può aumentare fino alla fine della gravidanza. PL-I è prodotto dalle cellule del sincizio trofoblasto della placenta (Neville et al., 2002).

Studi condotti in vivo sull'espressione di mPL-I nelle isole pancreatiche di topi transgenici RIP-mPL-I mostrano che l'ormone induce : 1) proliferazione delle cellule beta del pancreas, iperplasia e ipertrofia delle isole con aumento delle dimensioni delle isole; 2) inappropriata iperinsulinemia in quanto i topi risultano ipoglicemici e resistenti al diabete (Vasavada et al., 2000).

Il meccanismo responsabile per l'inappropriata iper-insulinemia e ipo-glicemia nei topi RIP-mPL-I è in parte il risultato dell'iperplasia delle isole, ipertrofia e incremento delle dimensioni. Nell'uomo esistono le due isoforme di PL: A e B, ma solo l'isoforma A è quella principalmente espressa ed attiva (Chen et al., 1989).

Insulina, IGF-I e -II sono importanti regolatori della crescita e della proliferazione durante tutto lo sviluppo e la vita adulta. L'insulina viene secreta dalle cellule beta del pancreas, ha un'emivita breve nell'ordine di pochi minuti ed è presente nel circolo in concentrazioni picomolari. Le proteine IGFs, vengono sintetizzate e secrete principalmente dal fegato ma sono localizzate anche nella maggior parte dei tessuti, sono presenti in circolo a concentrazioni nanomolari con un'emivita in termini di ore, determinata dalla loro interazione con altre proteine di legame (IGFBPs).

L'azione dell'insulina e dell' IGF-I viene mediata attraverso la loro interazione con recettori ad attività tirosin-chinasica, IR (recettore insulinico) e IGF-IR (IGF-I recettore), rispettivamente. Tutti e tre i peptidi vengono espressi nel pancreas a diversi stadi del suo sviluppo. L'insulina è presente prima nello sviluppo precoce del pancreas e poi continua ad essere espressa dalle cellule beta in età adulta. La proteina IGF-II viene espressa nel tessuto endocrino del pancreas durante la vita fetale e alla nascita sia nei ratti che nell'uomo, l'espressione, quindi, diminuisce nel pancreas adulto e rimane ristretta alle cellule beta. La proteina IGF-I, viene espressa dopo sette giorni dalla nascita, nel ratto principalmente nel tessuto duttale ed acinare, e la sua espressione aumenta con l'età.

Studi in vitro che in vivo hanno evidenziato che l'insulina, IGF-I e-II una forte azione mitogena nella cellula beta (Lue et al., 2004).

La proteina Glucagone-like peptide 1 (GLP-1) viene secreto dalle cellule L del piccolo e grande intestino, del cervello e delle isole pancreatiche (Druker, 2001). La funzionalità di GLP-1 viene regolata attraverso una molecola recettoriale proteina-G associata, GLP-1R.

GLP-1 controlla i livelli di glucosio nel sangue stimolando la secrezione di insulina, la biosintesi dell'insulina, la proliferazione delle cellule beta, la neogenesi delle isole ed inibendo il rilascio di glucagone (Druker, 2003). Diversi studi in vitro hanno mostrato che

GLP-1 ed i suoi analoghi sono in grado di indurre proliferazione delle cellule sia nelle isole di roditori che in linee cellulari di insulinoma (Li et al., 2005; Perfetti et Hui 2004; Trumper et al., 2002). Questo effetto proliferativo non è additivo al glucosio e sembra coinvolgere l'attivazione di alcuni geni come c-jun, jun D, nur 77 e c-fos (Buteau et al., 2001), ed l'azione di molecole come PI3K, PKB/AKT e PKC- ζ (Wang et al., 2004) (Figura 8).

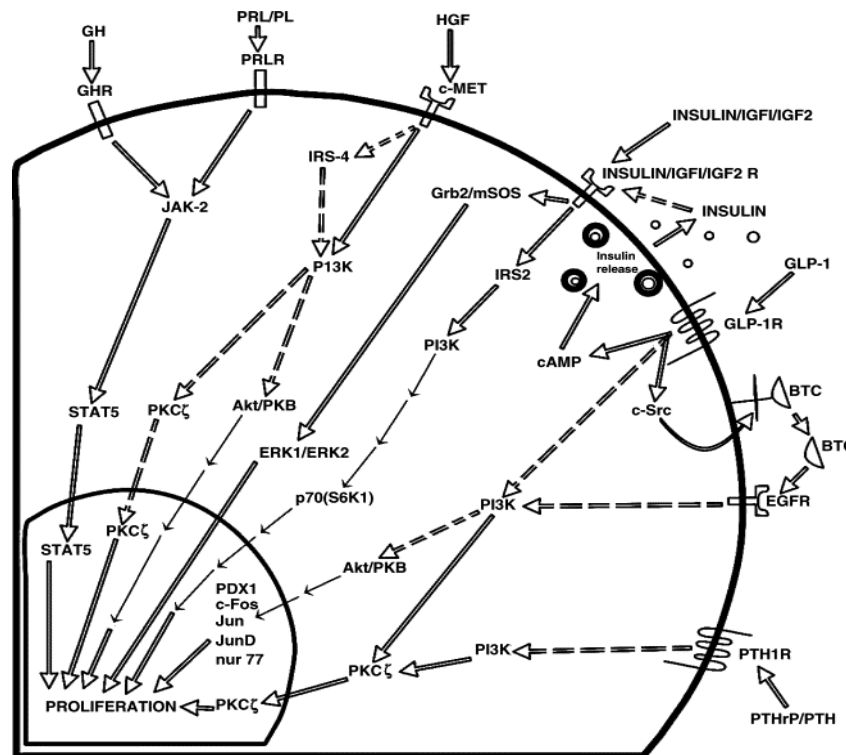


Figura 8- Molecole coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale, indotti dall'interazione di differenti fattori di crescita con i propri recettori di membrana, durante la proliferazione della cellula beta pancreatica (IJBCD, 2005).

Per dimostrare l'importanza del fattore di trascrizione Pdx-1 nel mediare l'effetto proliferativo indotto da GLP-1 nelle cellule beta sono stati utilizzati topi con il gene Pdx-1 beta-cellulare specifico inattivo (Pdx-1 $-/-$). La proliferazione mediata dalla molecola exendina-4 (analogo di GLP-1) veniva bloccata nelle isole pancreatiche isolate da questi topi, suggerendo che l'espressione di Pdx-1 è essenziale per l'effetto proliferativo indotto da exendina-4 (Li et al., 2005). Inoltre exendina-4 induce l'espressione di Pdx-1 in isole fetali umane in coltura e promuove la maturazione funzionale e la proliferazione delle isole (Movassat et al., 2002).

Il segnale intracellulare mediato da FGF (fattore di crescita dei fibroblasti) è implicato in diversi meccanismi cellulari che regolano la proliferazione e il differenziamento in particolare nella genesi del pancreas (Smallwood et al., 1996). La classe di FGFs è costituita da 19 peptidi correlati che regolano molti segnali cellulari quali la mitogenesi, l'angiogenesi e la morfogenesi.

Da studi condotti in animali geneticamente modificati mediante knock-out del recettore per FGF è emerso un ruolo importante nell'ontogenesi della cellula beta pancreatica mediato da FGFs.

In particolare, in vivo, è stato visto che in cellule epiteliali embrionali del pancreas di ratti i recettori per FGF-1 e FGF-2 sono funzionalmente espressi; in particolare l'espressione degli mRNA di FGF1R e FGF2R si mantiene elevata durante tutta le fase di sviluppo precoce del pancreas. In vitro quando FGF2 viene addizionato a cellule epiteliali in coltura è in grado di indurre proliferazione (Le Bras et al., 1998).

Inoltre FGF-2 ha un effetto chemiotattico sulle cellule epiteliali duttali umane (PANC-1) stimolando la formazione di aggregati simili alle isole pancreatiche, caratterizzati dall'espressione di insulina, glucagone e PDX-1 (Hardikar et al., 2003).

Il segnale intracellulare mediato da FGF (fattore di crescita dei fibroblasti) è implicato in diversi meccanismi cellulari che regolano la proliferazione e il differenziamento in particolare nella genesi del pancreas (Smallwood et al., 1996). La classe di FGFs è costituita da 19 peptidi correlati che regolano molti segnali cellulari quali la mitogenesi, l'angiogenesi e la morfogenesi.

Da studi condotti in animali geneticamente modificati mediante knock-out del recettore per FGF è emerso un ruolo importante nell'ontogenesi della cellula beta pancreatica mediato da FGFs.

In particolare, in vivo, è stato visto che in cellule epiteliali embrionali del pancreas di ratti i recettori per FGF-1 e FGF-2 sono funzionalmente espressi; in particolare l'espressione degli mRNA di FGF-1R e FGF-2R si mantiene elevata durante tutta le fase di sviluppo precoce del pancreas. In vitro quando FGF-2 viene addizionato a cellule epiteliali in coltura è in grado di indurre proliferazione (Le Bras et al., 1998).

Inoltre FGF-2 ha un effetto chemiotattico sulle cellule epiteliali duttali umane (PANC-1) stimolando la formazione di aggregati simili alle isole pancreatiche, caratterizzati dall'espressione di insulina, glucagone e PDX-1 (Hardikar et al., 2003).

Ormoni lattogeni

L'ormone lattogeno placentare (PL), anche noto come somatomammotropina corionica (CS) (Barrera et al., 1983; Grumbach et al., 1964), il GH e la PRL fanno parte di una grande famiglia di ormoni polipeptidici omologhi, comuni a specie diverse, dai primati ai pesci telostei (Nicoll et al., 1986). L'ormone PL viene prodotto esclusivamente dalla placenta durante la gravidanza mentre l'ormone GH e PRL dalla ghiandola pituitaria. PL e GH sono composti da 191 residui aminoacidici; nella specie umana possiedono un'omologia di sequenza aminoacidica dell'85%, (Niall et al., 1971), mentre i corrispondenti RNA messaggeri mostrano omologia di sequenza nucleotidica superiore al 90% (Shineet al., 1977; Martial et al., 1979; Serby et al., 1984). La prolattina umana (hPRL), mostra un minore grado di omologia strutturale con GH umano (hGH) e l'ormone placentare umano (hPL) (circa 23%) (Shome et Perlow, 1977).

Gli effetti biologici di questi ormoni sono molteplici e diversificati. L'ormone hGH ha attività somatogenica, lattogenica, lipolitica; hPRL ha attività lattogenica; l'attività di hPL è meno descritta in letteratura, ma l'ormone sembra essere coinvolto nell'allattamento, nella modulazione della secrezione insulinica, nella crescita e nel metabolismo fetale (Chawla et al., 1983). L'ormone lattogeno placentare appartiene ad una superfamiglia genica (45 kb) di polipeptidi ormonali. Il locus genico è localizzato sul braccio q del cromosoma 17 rispettivamente nella regione 17q22-q24 (Figura 9) (Owerbach, 1980; Gorge et al., 1981; Barsh et al., 1983; Hirt et al., 1987) ed include cinque geni disposti nel seguente ordine dal terminale 5' al 3': l'ormone della crescita umano normale (hGH-N), uno pseudogene dell'ormone della crescita (hGH-L), l'isoforma A dell'ormone lattogeno placentare (hPL-A), la variante placentare dell'ormone della crescita (hGH-V) e infine l'isoforma B dell'ormone lattogeno placentare (hPL-B) (Che et al., 1989). Ciascuno di questi geni è costituito da quattro introni e cinque esoni e ciascun gene codifica per una proteina di circa 22-24 kDa; l'espressione del gene hGH-N è individuata a livello delle cellule somatotrope site nella parte anteriore dell'ipofisi, mentre l'espressione del gene hPL-A/B è a carico, esclusivamente, delle cellule del sinciziotrofoblasto della placenta e quella del gene hGH-V è localizzata solo in alcune cellule del sinciziotrofoblasto (Williams et Boime, 1980; Jara et al., 1989; Scippo et al., 1993).

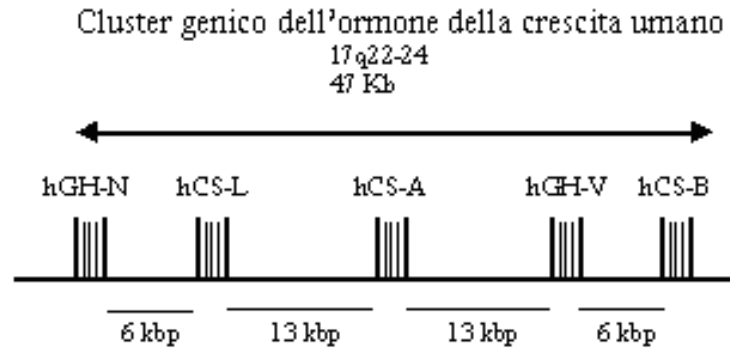


Figura 9 - Schema strutturale dell'organizzazione genomica del locus genico degli ormoni hGH e hCS (sinonimo hPL) localizzati sul braccio q del cromosoma 17 nella regione 17q22-24.

I tre ormoni polipeptidici appartengono alla superfamiglia delle citochine, che comprende oltre ai tre ormoni altre molecole come l'eritropoietina, l'interleuchina-6 (IL-6) e la leptina. Analogamente alle citochine, GH, PRL e PL risultano essere costituiti da quattro alfa-eliche, la cui struttura quaternaria si presenta come una lunga catena aminoacidica, mantenuta avvolta su sé stessa da due ponti disolfuri, caratterizzata da una orientazione delle prime due eliche parallele l'una all'altra ma antiparallele alle ultime due, motivo up-up-down-down (Somers et al., 1994).

La funzionalità degli ormoni GH, PRL e PL è regolata dalla presenza di relative molecole recettoriali. Il recettore per l'ormone della crescita (GHR) e quello per la prolattina (PRLR) appartengono ad una classe della superfamiglia dei recettori delle citochine. I geni che codificano per PRLR e per GHR nell'uomo sono localizzati sul cromosoma 5 nella regione p13-p14 (Arden et al., 1990).

L'ormone della crescita

Il gene hGH-N codifica per un primo prodotto di 190 residui aminoacidici denominato hGH, con peso molecolare di 22 kDa, e per un secondo prodotto di 175 residui aminoacidici con peso molecolare di 20 kDa, mancante, rispetto al primo, di una corta sequenza di 15 residui, dal 32esimo al residuo 46esimo, denominata porzione F44, (Singh et al., 1974; Lewis et al., 1980; Moore et al., 1982) fondamentale nell'interazione di hGH con il recettore della prolattina. La rimozione di tale sequenza determina, infatti, la perdita dell'attività lattogena dell'ormone stesso (Peterson et Brooks, 1997; Peterson et Brooks, 2004). La proteina GH corrispondente ad un peso molecolare di 20 kDa mantiene le attività somatotrope, ma presenta una ridotta attività lattogena (Tsunekawa et al., 1999).

La cellula risponde rapidamente al GH attraverso la fosforilazione e l'attivazione della proteina Jak-2 (Carter et al., 1996). L'attivazione di Jak-2 induce la fosforilazione del recettore di GH stesso e di diversi substrati intracellulari come le proteine: Stat-1, -3 e -5 che regolano la trascrizione di una varietà di geni; substrato del recettore insulinico IRS-1 e -2, che regolano l'espressione genica, la sintesi di proteine, la mitogenesi ed il metabolismo del glucosio; le proteine Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) come ERK-1 e -2, proteine che sono implicate nella regolazione della crescita e del differenziamento cellulare (Carter et al., 1996). L'attivazione delle proteine MAPK indotte dall'interazione di GH con il recettore è dipendente da una porzione ricca in prolina presente nella sequenza aminoacidica del dominio citoplasmatico del recettore di GH (box1), direttamente coinvolto nel legame con la proteina Jak2. Quando la box-1 viene eliminata, o i residui di prolina vengono mutati in residui di alanina, il recettore di GH non è capace di indurre l'attivazione delle proteine MAPK, cosicché vengono inibite la sintesi proteica e la proliferazione cellulare (Moller et al., 1992). I meccanismi di trasduzione del segnale sembrano avere basi comuni, ma seguire vie differenti, anche per la stessa molecola, a seconda dei tessuti implicati. Così si osserva che nel tessuto muscolare e nel fegato di ratti normali viene attivata la proteina Stat, ma non IRS-1 (Chow et al., 1996).

Negli adipociti di ratto si osserva che GH induce la fosforilazione della proteina IRS-1 attraverso Jak-2 (Ridderstrale et al., 1996; Carter et al., 1996).

La prolattina

La prolattina è presente in tutti i vertebrati, pesci compresi, ma in questi ultimi sono riscontrabili delle differenze nella composizione aminoacidica. La proteina umana contiene circa 197-199 aminoacidi con peso molecolare di 26 kDa. Il gene che codifica per la prolattina è localizzato sul cromosoma 6, è composto da cinque esoni e da quattro introni con una lunghezza complessiva di circa 10 kb (Bole-Feysot et al., 1998). L'ormone viene secreto dalla adenoipofisi della sotto il controllo ipotalamico tramite fattori inibitori e/o stimolatori. Gli effetti inibitori sono dominanti e sono mediati principalmente dalle dopamine, mentre molecole tra cui il fattore di rilascio tiroideo (TRH), l'ossitocina, e le neurotensine attivano la secrezione della prolattina.

La prolattina legandosi a specifici recettori di membrana stimola la ghiandola mammaria dell'organismo femminile alla produzione degli enzimi necessari alla sintesi dei componenti organici del latte ed induce lo sviluppo della mammella determinando la durata della lattazione.

Recentemente è stato dimostrato che la ghiandola mammaria è anch'essa un organo endocrino capace di produrre GH (Mole et al., 2000), prolattina (Clevenger et Plank, 1997), leptina (Woodside et al, 2000), e peptide relativo all'ormone paratiroideo (PTHrP) (Lippuner et al., 1996). Tutti e quattro gli ormoni sono secreti all'interno del latte e una minima quantità di GH e PTHrP sono secreti nel plasma con effetti metabolici. La prolattina non sembra avere ruoli sistemici, ma attraverso un effetto autocrino, svolge una importante azione tumorigenica sulle stesse cellule che secernono l'ormone (Neville et al., 2002).

La prolattina viene prodotta anche dall'adenoipofisi maschile; tuttavia in questo caso il suo significato funzionale è sconosciuto, anche se in alcuni casi, elevate concentrazioni di prolattina (iperprolattinemia) nell'uomo, sono associate a disfunzioni patologiche della sessualità e in molti casi associati a tumori della ghiandola pituitaria. Si suppone che il meccanismo che induce una alterata produzione di PRL nell'uomo è associato ad una ridotta secrezione del testosterone (Buvat, 2003). L'attivazione della trasmissione del segnale indotto dalla prolattina, avviene attraverso il legame della PRL ad uno specifico recettore di membrana (PRLR). La proteina PRLR appartiene alla stessa famiglia del recettore di GH. L'associazione ormone-recettore, implica a livello del DNA nucleare, un aumento della trascrizione degli RNA messaggeri corrispondenti agli enzimi caseina e lattosio che devono essere trascritti e tradotti. La proteina Jak-2, è costitutivamente associata al recettore per la prolattina, tale interazione (Jak-2-PRLR) porta all'attivazione delle proteine Stats con l'attivazione delle proteine Fyn (o anche di Src chinasi), Shc, SOS, Grb2, Ras, Raf (Piccoletti et al., 1994; Das et Vonderhaar, 1996).

L'ormone lattogeno placentare

L'ormone lattogeno placentare (PL) costituito da un'unica catena peptidica con peso molecolare di 22 kDa viene prodotto esclusivamente dalle cellule del sincizio trofoblasto della placenta nelle prime settimane di gravidanza per poi passare nel sangue materno. La quantità secreta aumenta fino a livelli molto elevati se confrontati con quelli degli analoghi ormoni ipofisari. L'ormone lattogeno placentare risulta essere il principale fattore per l'incremento dimensionale osservato nelle isole pancreatiche e per l'aumento nella secrezione dell'insulina osservato durante la gravidanza in roditori e presumibilmente anche nell'uomo (Parsons et al., 1992; Brelje et al., 1993; Brelje et al., 1997).

PL stimola la sintesi di glicogeno, il trasporto di aminoacidi, la sintesi di DNA, la produzione di insulin-like growth factor (IGF) nei tessuti fetali (Fowlkes et Freemark, 1993). L'Insulina e l'Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) svolgono un ruolo importante nel normale sviluppo fetale e

neonatale. La placenta è un organo ricco di recettori per l'insulina e per IGF-1, localizzati a livello del sincizio trofoblasto.

Alcuni studi hanno evidenziato che alterazioni della struttura e della funzione della placenta possano alterare il normale sviluppo fetale (Caufriez et al., 1994).

Durante la seconda metà della gravidanza PL contribuisce a creare una condizione di ridotta sensibilità materna all'azione insulinica. Tali effetti si esplicano principalmente attraverso la riduzione della sensibilità della cellula beta pancreatica agli stimoli secretivi, una ridotta sensibilità dei tessuti bersaglio all'insulina ed un aumento della lipolisi (Forsyth, 1994; Goffin et Kelly, 1996). Questi riarrangiamenti metabolici determinano una maggiore disponibilità di amminoacidi e di glucosio per il feto. Al termine della gravidanza l'ormone PL è presente nel siero materno con una concentrazione pari a 10µg/ml mentre la concentrazione dell'ormone della crescita (GH) placentare è di 20ng/ml (Frankenne et al., 1988). La secrezione del GH placentario viene modulata dalla concentrazione del glucosio circolante, che invece non influisce sulla secrezione dell'ormone PL (Patel et al., 1995). Durante la gravidanza l'ormone GH ipofisario viene completamente rimpiazzato dal corrispondente placentare (Chiang et Nicoll, 1992; Frankenne et al., 1988; Frankenne et al., 1990; Igout et al., 1988). Contrariamente a quello ipofisario il GH placentare viene secreto continuamente e non ad intervalli (Eriksson et al., 1989).

Non essendo presente il GH placentare nel sangue fetale, la modulazione dell'ormone placentare da parte del glucosio determina un controllo sul metabolismo materno atto a proteggere il feto dalla carenza di nutrienti (Barbour et al., 2004). PL è presente nel sangue fetale raggiungendo i valori massimi, circa 82 ng/ml, tra la 12esima e la 20esima settimana di gravidanza e poi decade a meno dell'1% dei livelli materni al termine della gravidanza (Hill et al., 1988).

L'ormone lattogeno placentare si lega al recettore del GH e/o della PRL, ma sembra, inoltre, legare un suo specifico recettore (Neville et al., 2002). Studi di competizione molecolare per l'attività biologica dell'ormone lattogeno placentare, condotti su fibroblasti fetali ovis, suggeriscono che tale ormone interagisce con un distinto e unico recettore per PL (Freemark et Handwerger, 1989; Fowlkes et Freemark, 1993) ed inoltre l'ormone viene internalizzato e riciclato per retroendocitosi senza essere degradato. Dati sul complesso PL-recettore, indicano che il recettore abbia un peso molecolare di circa 108 kDa (Fowlker et Freemark, 1993). Studi precedenti hanno evidenziato, utilizzando saggi competitivi, che le proprietà di legame di PL con il recettore sono analoghe ma distinte dal legame con il recettore di GH e di PRL (Freemark et al., 1987). Nonostante la sequenza aminoacidica dell'ormone PL sia per l'85%

identica alla sequenza dell'ormone GH i due ormoni possiedono notevoli differenze nelle proprietà di interazione con il recettore per GH (Lowman et al., 1991).

L'ormone lattogeno placentare umano (hPL) lega 2300 volte piu' debolmente il recettore GH umano (hGHR). Mentre entrambi gli ormoni mostrano la stessa affinità di legame per il recettore della prolattina (Lowman et al, 1991). Ad oggi non è ancora stato identificato il recettore specifico per l'ormone lattogeno placentare e la via completa di trasduzione del segnale. L'unico dato riportato in letteratura, riporta il coinvolgimento delle proteine Jak/Stat e di altre molecole fosforilate non identificate in cellule di tumore mammario (MCF7) (Takeda et al., 1997).

Scopo della tesi

Recenti studi hanno dimostrato che il trapianto di isole rappresenta una valida alternativa al trattamento dei pazienti con Diabete di Tipo-1, ma la scarsità di materiale biologico a disposizione impedisce a questa tecnica di diventare una terapia su larga scala. Sono in corso molteplici studi rivolti all'analisi dei meccanismi che governano la proliferazione e/o il differenziamento della beta cellula a partire da altre popolazioni cellulari in condizioni fisiologiche e/o patologiche. Tali studi coinvolgono il ruolo di fattori di crescita, di molecole del segnale intra-cellulare, di regolatori del ciclo cellulare.

Nella seguente tesi di dottorato, è stato eseguito uno studio sul ruolo biologico dell'ormone Lattogeno Placentare Umano (hPL-A), sull'espansione ed il differenziamento delle cellule epiteliali del dotto pancreatico (linea PANC-1) in cellule insulari.

Obiettivi di questo lavoro sono:

- 1) l'ottenimento della proteina ricombinante hPL-A pura all'analisi di spettrometria di massa e biologicamente attiva
- 2) l'analisi della traduzione del segnale indotto da hPL-A nelle cellule PANC-1;
- 3) lo studio degli effetti morfologici e molecolari dell'azione di hPL-A nel nostro modello cellulare mediante analisi di immunofluorescenza valutando l'espressione di marcatori molecolari tipici delle β -cellule (Insulina, Peptide-c, Glut-2 e Pdx-1)
- 4) l'analisi proteomica (2D-Gel ed Ettan Dige) delle proteine differenzialmente espresse nelle cellule PANC-1 di controllo, siero deprivate e siero deprivate e/o stimulate con hPL-A per 24-48-96 ore
- 5) l'identificazione delle proteine di interesse mediante spettrometria di massa.

CAPITOLO II

ESPRESSIONE E PURICAZIONE DELL'ORMONE hPL-A

Introduzione

Della grande famiglia di ormoni polipeptidici omologhi, comuni a specie diverse, dai primati ai pesci telostei, fanno parte l'ormone lattogeno placentare (PL), anche noto come somatomammotropina corionica (CS) (Grumbach et al., 1964; Barrera et al., 1983), l'ormone della crescita (GH) e la prolattina (PRL) (Nicoll, 1986).

PL e GH nella specie umana possiedono un'omologia di sequenza aminoacidica dell'85%, (Niall et al., 1971), mentre la prolattina umana (hPRL), mostra un minore grado di omologia strutturale con GH umano (hGH) e l'ormone placentare umano (hPL) (circa 23%) (Shome et Parlow, 1977).

Da alcuni anni si invoca la presenza di elementi cellulari in grado di differenziarsi in cellule beta o in altre cellule che compongono il pancreas (Dor et al., 2004; Weir et Weir 2005).

Le cellule staminali/progenitrici stimolabili sarebbero presenti sia nell'epitelio duttale sia nelle isole di Langerhans. Un gran numero di molecole potrebbero avere un ruolo determinante nel differenziamento in cellule beta a partire dai precursori. Ad esempio fattori di crescita come HGF, KGF, PTHrP, GH, PRL, PL, IGF-1 e -2, GLP-1 ed FGF hanno un ruolo importante nel determinare un aumento della proliferazione, della massa e della funzione della beta-cellula (Vasavada et al., 2005).

La funzione biologica dell'ormone lattogeno placentare non è stata ancora del tutto chiarita. Alcune evidenze lo indicano come il principale fattore per l'incremento dimensionale nelle isole pancreatiche e della secrezione insulinica in roditori in gravidanza e presumibilmente anche nell'uomo (Brelje et al., 1993; Brelje et Sorenson, 1997; Parsone et al., 1992). Inoltre, potrebbe stimolare precursori delle cellule beta staminali, che darebbero luogo alla formazione di nuove isole ("neogenesi delle isole") (Bonner et al., 1993; Fernandes et al., 1997) sia durante la vita fetale che nell'adulto (Krakowski , 1999).

In questa parte della ricerca è stato ottimizzato un metodo di espressione e purificazione dell'ormone lattogeno placentare umano hPL (isoforma A), in quanto non reperibile commercialmente, con lo scopo di ottenere la molecola pura da utilizzare negli esperimenti di stimolazione cellulare.

Materiali e Metodi

L'espressione e la purificazione dell'ormone lattogeno placentare umano, isoforma A, non reperibile commercialmente, sono state sviluppate sequenzialmente con due metodiche in modo da ottenere una proteina ricombinante pura, funzionale e in quantità sufficiente per approntare i saggi biologici del disegno sperimentale.

1) Metodo-1 di espressione e purificazione di hPL-A

Trasformazione di DNA plasmidico in batteri competenti

L'ormone PL umano (hPL) (precisamente l'isoforma A) è stato espresso e purificato sotto forma di proteina ricombinante: hPL-A.

Per l'espressione è stato utilizzato il plasmide costituito dal vettore pBR322 modificato (phPL 4828). Il plasmide phPL 4828 oltre a contenere la sequenza di cDNA codificante per la proteina ricombinante hPL-A nei siti di restrizione enzimatica *Ava*I e *Kpn*I, un sito specifico per la resistenza all'antibiotico ampicillina, un sito per l'espressione periplasmatica della proteina ricombinante (*stl*) ed un sito che permette l'espressione della proteina ricombinante in un terreno povero di fosfati (*Ppho*) (Lowman, 1991).

Un'aliquota di 0.3 µg (circa 0.3 µl) del plasmide di phPL 4828 è stata trasformata nei batteri di *E. Coli* utilizzando un'aliquota di 5 µl di cellule competenti commerciali DH5α ed incubando in ghiaccio per 30 min in tubi di polistirene Falcon 2063.

Quindi è stato eseguito lo "shock termico" a 42°C per 1 min e successivamente il campione veniva incubato in ghiaccio per 2 min. Venivano aggiunti 500 µl di mezzo di cultura S.O.C. (2% triptone, 0,5% estratto di lievito, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Mg SO₄, 20 mM glucosio, pH 7,00) e il campione è stato incubato per 45 min a 37°C in agitazione (velocità 250 rpm). Aliquote batteriche, 50-100 µl, sono state seminate su piastre di LB/agar (per 20 piastre è stata preparata una soluzione di terreno sciogliendo 10 pasticche di LB e 7,5 gr. di bacto-agar in 500 ml di acqua bidistillata; il terreno di coltura veniva autoclavato per 20 min ad 1 atmosfera, quindi portato alla temperatura di 50°C in un bagnetto termostato ed è stato addizionato con 100 µg/ml di ampicillina. Per ogni piastra sono stati aliquotati 25 ml della soluzione di LB-agar le piastre sono state lasciate solidificare per una notte e poi conservate a 4°C al buio. Le piastre sono state incubate per tutta la notte a 37°C. La piastra contenente le colonie batteriche è stata conservata a 4°C. Singole colonie venivano successivamente utilizzate per la preparazione di DNA plasmidico e per l'espressione della proteina ricombinante hPL-A.

Mini preparazione di DNA plasmidico

Per la purificazione del DNA plasmidico da cellule batteriche, una singola colonia è stata prelevata da una piastra di LB-agar, ed inocolata in 3 ml di LB contenente 100 µg/ml di ampicillina. Il mini inoculo, così preparato, è stato incubato in vigorosa agitazione (300 rpm) a 37°C per una notte (una crescita troppo prolungata induce morte cellulare per lisi con perdita del plasmide). Il mini inoculo è stato trasferito in tubo eppendorf da 1,5 ml e la sospensione batterica è stata sedimentata per due centrifugazioni successive a 14000xg per 5 min in una centrifuga da banco OLE DICH. Il supernatante era decantato ed il tubo capovolto su un foglio di carta bibula per eliminare il liquido in eccesso.

Per la purificazione del DNA plasmidico è stato utilizzato il protocollo QIAprep Spin Miniprep. Seguendo il protocollo della casa fornitrice il lisato batterico era sedimentato per centrifugazione a 14000xg per 10 min. Il supernatante è stato applicato sulla colonna cromatografica a scambio ionico fornita dalla casa produttrice e il DNA plasmidico recuperato per centrifugazione a 14000xg per 30-60 sec. La colonna cromatografica era quindi lavata con 0,5 ml di tampone PB e successivamente con 0,75 ml di tampone PE. Il DNA plasmidico era infine eluito con 50 µl di tampone EB (10 mM Tris-Cl pH 8.5) in tubi eppendorf da 1,5 ml centrifugando la colonna cromatografica a 14000xg per 30-60 sec. Il DNA plasmidico così ottenuto è stato analizzato per il contenuto del nostro inserto di DNA di interesse (hPL-A) mediante digestione enzimatica. Un microgrammo di cDNA plasmidico purificato come descritto precedentemente è stato digerito con due enzimi di restrizione: KpnI e AvaI, che tagliano in modo asimmetrico.

Per primo è stato utilizzato 1 µl di enzima KpnI (1 µl corrisponde a 10 UI di enzima che digeriscono 1 µg di DNA), in presenza del tampone a basso sale indicato dalla casa fornitrice, in un volume finale di 15 µl a 37°C per 1 ora. Successivamente è stato aggiunto alla miscela 1 µl dell'enzima AvaI, in presenza del tampone ad alto sale corrispondente, in un volume finale di 20 µl a 37°C per 1 ora. Il campione digerito è stato poi analizzato per elettroforesi su gel di agarosio 1% (1 gr di agarosio in 100 ml di tampone per elettroforesi TBE 1x). La migrazione elettroforetica evidenziava il vettore e l'inserto.

Maxi preparazione di DNA plasmidico

La Maxi preparazione a differenza della Mini preparazione di DNA plasmidico, consente di ottenere una quantità di DNA plasmidico maggiore, circa 500 µg. Una singola colonia batterica è stata prelevata da una piastra di LB/agar/ampicillina ed incubata in 3 ml di LB contenente 100 µg/ml di ampicillina. L'inoculo è stato incubato in vigorosa agitazione

(250 rpm) a 37°C per una notte. Un ml della coltura batterica è stato inoculato in 100 ml di LB contenente 100 µg/ml di ampicillina e il maxi inoculo così preparato, incubato per una notte in agitazione (250 rpm) a 37°C.

Il maxi inoculo è stato successivamente trasferito in contenitori Beckman, provvisti di tappo a vite, da 200 ml e la sospensione batterica è stata sedimentata per centrifugazione a 6000xg per 15 min a 4°C in centrifuga Avanti-J Beckman.

Il DNA plasmidico è stato purificato con il kit della QIAGEN-tip 500. Seguendo il protocollo della casa fornitrice il lisato batterico è stato quindi sedimentato per centrifugazione a 20000xg per 30 min a 4°C in centrifuga Avanti-J Beckman. La colonna cromatografica, QIAGEN-tip 500, fornita dalla casa produttrice era equilibrata per gravità con 10 ml di tampone QBT. Dopo due lavaggi successivi della resina con 30 ml di tampone QC il DNA plasmidico era recuperato eluendo la colonna cromatografica con 15 ml di tampone QF.

L'acido nucleico è stato quindi precipitato aggiungendo 10,5 ml di isopropanolo a temperatura ambiente e centrifugando la soluzione a 15000xg per 30 min a 4°C in centrifuga Avanti-J Beckman. Il precipitato di DNA è stato lavato con 5 ml di etanolo al 70% e recuperato centrifugando a 15000xg per 10 min in centrifuga da banco OLE DICH. Il DNA sedimentato sul fondo della provetta è stato fatto asciugare per 5-10 min, in modo tale da far evaporare l'etanolo, dopodiché veniva risospeso in un appropriato volume di 10 mM Tris-Cl pH 8.5 e conservato a -20°C. Il DNA proveniente dalla Maxi preparazione è stato utilizzato successivamente per l'espressione della proteina ricombinante hPL-A.

Espressione della proteina ricombinante hPL-A

L'espressione della proteina hPL-A avviene in un terreno di coltura povero di fosfati AP5 (3 ml di glucosio al 25%, 1.1 gr di casaminoacidi, 0.15 gr di estratto di lievito, 0.8 ml di 1M MgSO₄, 0.5350 gr di NH₄Cl, 0.0375 gr di KCl, 35 ml di 1M NaCl, 60 ml di 1M trietanolamina per un volume finale di 500 ml) grazie alla presenza del sito Ppho, a monte del nostro cDNA di interesse, nel vettore di espressione phPL, che permette di esprimere il cDNA relativo alla proteina di interesse e ridurre l'espressione delle proteine batteriche.

Una singola colonia è stata prelevata da una piastra batterica di LB/agar/ampicillina contenente le colonie di cellule batteriche DH5α trasformate con il cDNA di hPL-A ed è stata inoculata in 3 ml di terreno di coltura LB/ampicillina a 37 °C a 250 rpm per tutta la notte.

Un ml di inoculo è stato diluito in 100 ml di terreno di coltura AP5 contenente 100 µg/ml di ampicillina. Quindi l'inoculo è stato incubato a 37°C per 24 ore in agitazione (250 rpm) per l'espressione della proteina ricombinante hPL-A.

Purificazione della proteina ricombinante hPL-A

La purificazione della proteina hPL-A prevede almeno tre fasi di arricchimento dopo l'espressione della proteina in terreno povero di fosfati: 1) precipitazione in ammonio solfato saturo al 90% 2) dialisi 3) cromatografia a scambio ionico.

Precipitazione in Ammonio Solfato saturo al 90 %

L'inoculo batterico ottenuto dalla crescita in terreno povero di fosfati è stato centrifugato per 5 min a 6000 rpm a 4°C in centrifuga Avanti-J Beckman. Il precipitato batterico è stato incubato per 20 min in ghiaccio secco e successivamente risospeso in 1 ml di tampone 10mM Tris-Cl pH 8,0 (questo procedimento induce la lisi delle pareti batteriche liberando la proteina nel mezzo liquido). I residui della parete batterica sono stati separati dalle proteine centrifugando la sospensione batterica a 4°C per 10 min a 12000xg, in centrifuga da banco OLE DICH in tubi Eppendorf da 2.0 ml.

Il supernatante ("shockate") è stato recuperato in un tubo eppendorf da 2.0 ml e le proteine precipitate per aggiunta di 1 ml di ammonio solfato saturo al 90% (83,3 gr di ammonio solfato $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ vengono aggiunti lentamente a 124.5 ml di H₂O bidistillata mantenuta costantemente ad una temperatura di 50-80°C). L'ammonio solfato è uno dei sali maggiormente utilizzati per la precipitazione di proteine. La diversa concentrazione salina permette di precipitare proteine di diverso peso molecolare.

Il campione è stato incubato a temperatura ambiente per 1 ora agitando occasionalmente per inversione. Le proteine precipitate in ammonio solfato sono state centrifugate a 4°C per 20 min a 12000xg in centrifuga da banco OLE DICH. Il precipitato è stato risospeso in un volume di 50-200 µl di PBS 1X e conservato a -20°C prima delle successive fasi di purificazione ed analisi qualitativa del campione.

Dialisi

La fase successiva di purificazione rappresentata dalla dialisi permette di eliminare l'ammonio solfato permettendo alla proteina hPL-A di riacquistare la sua conformazione funzionale. La dialisi avviene per mezzo di una membrana porosa (tubo da dialisi) che scambia con la soluzione in cui è immersa, provvista di pori di grandezza tale da permettere il passaggio di molecole al di sotto dei 15000 daltons, quindi la nostra proteina di interesse, che pesa circa 22000 daltons, veniva trattenuta all'interno. Per ogni dialisi si sono utilizzati 2 litri di PBS 1x (1,7 mM KH₂PO₄ 5,0 mM Na₂HPO₄ 0,15 M NaCl, pH 7,2 con NaOH). La dialisi è stata effettuata a 4°C su un agitatore magnetico che, mediante un magnetino, ha consentito uno scambio omogeneo della soluzione tra l'interno e l'esterno della membrana da dialisi.

Due litri di tampone sono stati utilizzati per la dialisi di 1,0-1,2 ml di campione. Per una dialisi completa sono stati eseguiti cinque cambi di tampone ad intervalli di 5 ore.

Infine il campione è stato recuperato in un tubo Eppendorf da 1.5 ml e conservato a -20°C prima della fase successiva di purificazione per cromatografia.

Cromatografia su colonna

L'ultima fase di purificazione della nostra proteina di interesse ha compreso l'analisi per "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC). Questo è un sistema di purificazione per cromatografia largamente utilizzato per le proteine in quanto permette la separazione di biomolecole in forma attiva pur sfruttando un sistema pressorio.

Il sistema utilizzato comprende un controller programmabile (Gradient Programmer GP-250 Plus) per sviluppare e controllare automaticamente la procedura di separazione; due pompe per la distribuzione di due diversi tamponi; un miscelatore per assicurare un accurato e riproducibile gradiente di eluizione; valvole per l'iniezione dei campioni e il controllo del percorso del flusso; un monitor per la misura del profilo cromatografico attraverso gli UV (Control Unit UV-1); un recorder (REC 102) per documentare attraverso un grafico il profilo cromatografico; un collettore di frazioni (Gradi Frac); una colonna cromatografica per purificare la miscela proteica ottenuta dalla purificazione in ammonio solfato saturo al 90%.

Come colonna cromatografica è stata utilizzata la Mono Q HR 5/5, una resina scambiatore di anioni forte che lega le biomolecole negativamente caricate liberandole poi gradatamente al crescere della concentrazione salina. La colonna cromatografica suddetta ha un volume di base pari a 1 ml ed è stata predisposta per un flusso di lavoro di 0.5-2 ml/min per una pressione massima esercitata dalle pompe di 5MPa. Il meccanismo di purificazione prevede l'utilizzo di due tamponi, precedentemente sonicati per 30 min (la sonicazione permette di prevenire la formazione di bolle d'aria all'interno della colonna cromatografica), il tampone A (10 mM Tris-Cl pH 8,0) per equilibrare la colonna applicato alla pompa A, e il tampone B (10 mM Tris-Cl pH 8,0 2M NaCl) per generare un gradiente lineare salino da 0 M a 2M applicato alla pompa B.

Prima di applicare il campione in colonna cromatografica bisognava eseguire alcune operazioni preliminari. La colonna cromatografica conservata in acqua ed etanolo al 20% a 4°C , veniva lavata facendo passare, prima H_2O bidistillata precedentemente sonicata, poi il tampone A per 5 min ad una portata di 1 ml/min. Il campione ottenuto dalla fase di purificazione in ammonio solfato era centrifugato per 5 min a 10000xg in centrifuga da banco

OLE DICH per sedimentare sali e altri contaminanti, in modo da non ostruire la colonna cromatografica.

Il programma di purificazione impostato sul controller, prevede tre fasi fondamentali. Nella prima fase la colonna è stata equilibrata facendo passare 2 ml del tampone A. Nella seconda fase il campione è stato iniettato in colonna attraverso un tubo in silicone da 500 µl (Loop), precedentemente lavato con acqua e tampone A, per mezzo di una microsiringa Hamilton da 500 µl. Nella terza fase il campione veniva eluito con una pendenza lineare del tampone B, con un gradiente da 0% a 100% del tampone B, in un volume totale di 40 ml.

Frazioni da un ml ciascuna sono state raccolte attraverso un raccoglitore di frazioni (Gradi Frac), quindi è stata valutata la densità ottica a 280 nm per mezzo di uno spettrofotometro LKB Biochrom, con una cuvetta al quarzo per rilevare la presenza di proteine. Le frazioni con un valore di assorbanza compreso tra 0.008-0.504 nm sono state analizzate in 12,5% SDS-PAGE. Per evidenziare le bande corrispondenti alle proteine separate, il gel è stato colorato con una soluzione contenente il Blu di Coomassie (125 ml isopropanolo, 50 ml acido acetico, 0,25 gr Coomassie blu, 325 ml di H₂O distillata), che lega le proteine e quindi decolorato in una soluzione contenente: 75 ml di acido acetico, 250 ml di metanolo, 675 ml H₂O distillata.

Sui campioni che risultavano positivi per la proteina di interesse è stata valutata l'esatta concentrazione proteica con il metodo Bradford, quindi sono stati conservati a -20°C. Terminata la purificazione la colonna cromatografica era lavata con H₂O bidistillata e successivamente con una soluzione di acqua ed etanolo al 20%, quindi conservata a 4°C.

2) Metodo-2 di espressione e purificazione di hPL-A

Subclonaggio del cDna di hPL-A nel vettore pETM-11

Il cDNA di hPL-A è stato estratto dal vettore originario phPL4828 per digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione KpnI ed AvaI. Utilizzando la tecnica di reazione a catena della polimerasi (PCR) il cDNA di hPL-A è stato modificato per inserire i siti di taglio specifici NcoI ed XhoI per il subclonaggio successivo nel vettore di espressione pETM-11. Il plasmide pETM-11 contiene diversi siti di restrizione enzimatica, un sito specifico per la resistenza ad un antibiotico, la kanamicina, un promotore costitutivo T7 lac, un sito per l'espressione della proteina ricombinante, un sito per l'espressione di una coda di istidine nella regione N-terminale ed un sito proteasico per l'enzima TEV (tabacco etch virus).

Ligazione del cDna di hPL-A nel vettore plasmidico pETM-11

Il vettore plasmidico pETM-11 e il cDNA di hPL-A modificato attraverso la reazione di PCR, sono stati sottoposti a digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione NcoI e XhoI (pETM-11^{NcoI/XhoI}, hPL^{NcoI/XhoI}) al fine di linearizzare le molecole. Le estremità libere sono state defosforilate con la fosfatasi alcalina (CIP) per 15 min a 37°C per evitare la ciclizzazione del vettore. Successivamente la reazione di ligazione era eseguita aggiungendo 3 µl del vettore pETM-11^{NcoI/XhoI} concentrato 40 ng/µl, 0,8 µl del cDNA di hPL^{NcoI/XhoI} concentrato 150 ng/µl, 2 µl del tampone 2 (5X), 4,2 µl di acqua bidistillata, 10 µl del tampone 1 (2X), 1 µl di DNA ligasi. Il campione è stato incubato a temperatura ambiente per tutta la notte a 16°C. Una aliquota di 15 µl è stata utilizzata per la trasformazione in E.coli.

Trasformazione del plasmide pETM-11/hPL-A in E.coli

Il plasmide pETM-11/hPL-A è stato trasformato in E.coli. Un'aliquota da 50µl di cellule batteriche competenti commerciali E. coli BL21(DE3) conservata a -80°C era scongelata in ghiaccio e incubata per 30 min in ghiaccio con 2 µl del plasmide di interesse utilizzando i tubi Falcon 2063. Si procedeva allo "shock termico" a 42°C per 42 sec e successivamente il campione è stato incubato in ghiaccio per 1 min. Sono stati aggiunti 250 µl di mezzo di coltura S.O.C. (2% triptone, 0.5% estratto di lievito, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Mg SO₄, 20 mM glucosio, pH 7,0) e il campione è stato incubato per 1 ora a 37°C in agitazione (250 rpm). La trasformazione (250 µl) è stato seminata su piastra di LB/agar/Kanamicina (30 µg/ml) ed incubata per tutta la notte a 37°C. La piastra contenente le colonie batteriche è stata conservata a 4°C. Singole colonie sono state successivamente utilizzate per la preparazione di DNA plasmidico e per l'espressione della proteina ricombinante hPL-A.

Mini preparazione del Dna plasmidico pETM-11/hPL-A

Per la purificazione di DNA plasmidico da cellule batteriche, il DNA proviene da una singola colonia batterica isolata, selezionatasi positivamente perché il plasmide contiene il gene resistente all'antibiotico, nel caso specifico kanamicina presente nel terreno di crescita. Una singola colonia non contiene una quantità di plasmide sufficiente da poter essere purificato, quindi è necessario amplificare il DNA in una coltura liquida, dalla quale viene purificato il plasmide contenente il frammento di DNA di interesse.

Una singola colonia è stata prelevata da una piastra di LB-agar, ed inoculata in 3 ml di LB contenente 30 µg/ml di kanamicina. Il mini inoculo, così preparato, è stato incubato in

vigorosa agitazione (250 rpm) a 37°C per una notte (una crescita troppo prolungata induce morte cellulare per lisi con perdita del plasmide). Il mini inoculo è stato trasferito in tubo eppendorf da 1,5 ml e la sospensione batterica è stata sedimentata per due centrifugazioni successive a 14000xg per 5 min in una centrifuga da banco OLE DICH. Il supernatante è stato decantato ed il tubo capovolto su un foglio di carta bibula per eliminare il liquido in eccesso.

Per la purificazione del DNA plasmidico è stato utilizzato il protocollo QIAprep Spin Miniprep, designato per la purificazione di circa 20 µg di DNA plasmidico ad alta replicazione. Il sedimento batterico è stato risospeso in 250 µl di tampone P1 con RNase A e trasferito in tubi da microcentrifuga. Il precipitato batterico è stato lisato in condizioni alcaline usando una soluzione di NaOH/SDS (tampone P2). L'SDS, contenuto nel tampone P2 solubilizza i fosfolipidi e i componenti proteici della membrana cellulare, mentre le condizioni alcaline, dovute alla presenza della soluzione di NaOH, denaturano il DNA plasmidico e cromosomiale.

Durante la lisi batterica è necessario prevenire la contaminazione del DNA plasmidico con quello cromosomiale, dato che le colonnine cromatografiche QIAprep non sono in grado di separare i due diversi acidi nucleici. È utile evitare un'agitazione vigorosa del campione per prevenire la frammentazione dei cromosomi batterici e la liberazione di frammenti di DNA cromosomiale nel supernatante. La lisi alcalina è stata neutralizzata e stabilizzata aggiungendo alla sospensione 350 µl di tampone N3 ad alta concentrazione salina che denatura le proteine, il DNA cromosomiale, i detriti cellulari e precipita l'SDS, mentre il DNA plasmidico rimane in soluzione. È importante in questa fase di purificazione miscelare la sospensione quattro-sei volte gentilmente per assicurare una completa precipitazione.

Il lisato batterico è stato sedimentato per centrifugazione a 14000xg per 10 min. Il supernatante è stato applicato sulla colonna cromatografica a scambio ionico fornita dalla casa produttrice e il DNA plasmidico recuperato per centrifugazione a 14000xg per 30-60 sec. La colonna cromatografica è stata quindi lavata, secondo la procedura ed i tamponi forniti dalla casa produttrice, con 0,5 ml di tampone PB e successivamente con 0,75 ml di tampone PE. Il DNA plasmidico è stato infine eluito con 50 µl di tampone EB (10 mM Tris-Cl pH 8,5) in tubi eppendorf da 1,5 ml centrifugando la colonna cromatografica a 14000xg per 30-60 sec. Il DNA plasmidico così ottenuto è stato analizzato per il contenuto del nostro inserto di DNA di interesse (hPL-) mediante digestione enzimatica.

Maxi preparazione del Dna plasmidico di pETM-11/hPL-A

La Maxi preparazione a differenza della Mini preparazione di DNA plasmidico, consente di ottenere una quantità di DNA plasmidico maggiore, circa 500 µg. Nel caso specifico è stato utilizzato il kit QIAGEN-tip 500.

Una singola colonia batterica è stata prelevata da una piastra di LB/agar/kanamicina ed incubata in 3 ml di LB contenente 30 µg/ml di kanamicina. L'inoculo è stato incubato in vigorosa agitazione (250 rpm) a 37°C per una notte. Un ml della coltura batterica è stata inoculato in 100 ml di LB contenente 30 µg/ml di kanamicina e il maxi inoculo così preparato è stato incubato per una notte in agitazione (250 rpm) a 37°C.

Il maxi inoculo è stato successivamente trasferito in contenitori Beckman, provvisti di tappo a vite, da 200 ml e la sospensione batterica sedimentata per centrifugazione a 6000xg per 15 min a 4°C in centrifuga Avanti-J Beckman.

Il DNA plasmidico è stato purificato con il kit della QIAGEN-tip 500. Seguendo il protocollo ed i tamponi della casa fornitrice, il sedimento batterico è stato risospeso in 10 ml di tampone P1 con RNase A. Le pareti batteriche sono state lisate aggiungendo alla sospensione 10 ml di tampone P2 (NaOH/SDS), agitando poi gentilmente quattro-sei volte per inversione e incubando per 5 min a temperatura ambiente.

È utile evitare un'agitazione vigorosa per non inquinare il DNA plasmidico con quello cromosomiale. La lisi alcalina è neutralizzata e stabilizzata aggiungendo alla sospensione 10 ml di tampone P3 che, creando condizioni ad alta concentrazione di sale causa la denaturazione delle proteine, del DNA cromosomiale, dei detriti cellulari e la precipitazione di SDS, mentre il DNA plasmidico rimane in soluzione. È importante in questa fase miscelare la sospensione immediatamente quattro-sei volte gentilmente ed incubare a temperatura ambiente per 20 min assicurando una completa precipitazione dei detriti cellulari.

Il lisato batterico è stato quindi sedimentato per centrifugazione a 20000xg per 30 min a 4°C in centrifuga Avanti-J Beckman. La colonna cromatografica, QIAGEN-tip 500, fornita dalla casa produttrice è stata equilibrata per gravità con 10 ml di tampone QBT. Dopo due lavaggi successivi della resina con 30 ml di tampone QC il DNA plasmidico è stato recuperato eluendo la colonna cromatografica con 15 ml di tampone QF.

L'acido nucleico è stato quindi precipitato aggiungendo 10,5 ml di isopropanolo a temperatura ambiente e centrifugando la soluzione a 15000xg per 30 min a 4°C in centrifuga Avanti-J Beckman. Il precipitato di DNA è stato lavato con 5 ml di etanolo al 70% e recuperato centrifugando a 15000xg per 10 min in centrifuga da banco OLE DICH.

Il DNA sedimentato sul fondo della provetta è stato fatto asciugare per 5-10 min, in modo tale

da far evaporare l'etanolo, dopodiché veniva risospeso in un appropriato volume di 10mM Tris-Cl pH 8,5 e conservato a -20°C per essere utilizzato successivamente nella trasformazione in batteri e quindi per l'espressione della proteina ricombinante hPL-A.

Espressione della proteina ricombinante hPL-A

Pre-inoculo

L'espressione della proteina hPL-A avviene in un terreno minimo contenente, per un litro di soluzione, 500 μl 1M CaCl_2 , 500 μl 1M MgSO_4 , 100 ml 1M KPi pH 7,0 (sciogliere 53g KH_2PO_4 e 107g K_2HPO_4 in ddH_2O portando a volume finale di 1 l), 5,0 g glucosio e 1,0 g $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$. A 100ml di terreno minimo così preparato in una beuta da un litro sono stati aggiunti: Biotina ad una concentrazione finale di 5 μM (si prepara uno stock 100X sciogliendo 0,122 g di Biotina in 1 l di acqua bidistillata agitando la soluzione con un magnete tutta la notte), Tiamina ad una concentrazione finale di 2,4 $\mu\text{g/ml}$, Kanamicina ad una concentrazione finale di 30 $\mu\text{g/ml}$, FeSO_4 ad una concentrazione finale di 3,6 $\mu\text{g/ml}$. Si porta la soluzione al volume finale con acqua bidistillata sterile e si procede ad inoculare 1/4 delle colonie presenti sulla piastra. Il pre-inoculo è stato incubato per tutta la notte (16/18 ore) a 37°C in agitazione a 250 rpm.

Inoculo e induzione

Si dividono 200 ml di coltura batterica in 5 beute da 2l ciascuna. Si procede ad incubare a 37°C in agitazione (250rpm) finché la crescita batterica, misurata con assorbanza a 600 nm, non risulta compresa tra 0,7-0,8 nm. Si induce quindi con IPTG (0,4 mM finali) per 3 ore a 37°C in agitazione (250 rpm).

Purificazione della proteina ricombinante hPL-A

- Lisi dei batteri

L'inoculo batterico è stato centrifugato per 45 min a 5000 rpm a 4°C in centrifuga Avanti-J Beckman. Il precipitato batterico è stato risospeso in 25 ml di tampone di lisi contenente 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% di Tween-20. 1 compressa di inibitori di proteasi (CompleteEDTA-Free) è stata aggiunta dopo che i batteri sono stati risospesi.

- Solubilizzazione dei corpi inclusi

Le proteine sovra-esprese possono precipitare sotto forma di corpi di inclusione: questo facilita il recupero e la purificazione della proteina ricombinante, poiché i corpi inclusi sono di norma molto omogenei e formati solo dalla proteina di interesse. D'altra parte, la

rinaturazione della proteina partendo dai corpi inclusi è spesso difficile e devono essere studiate procedure speciali per una corretta organizzazione strutturale della proteina stessa. Nel nostro caso la proteina hPL-A era espressa nei corpi inclusi. I batteri, quindi, sono stati risospesi in tampone di lisi e la soluzione è stata sonicata per 1 min, e quindi lasciata in ghiaccio 2 minuti; tale procedura è stata ripetuta per cinque volte di seguito. L'inoculo è stato centrifugato per 30 min a 13000 rpm a 4°C in centrifuga Avanti-J Beckman per sedimentare i corpi inclusi. Questi sono stati lavati per tre volte con 50 mM Tris pH 8,0/1mM EDTA, centrifugando ogni volta 15 min a 13000 rpm a 4°C. Il sedimento è stato risospeso in 25 ml di tampone 50 mM Tris-HCl pH 8,0/6M Guanidinio/HCl, incubato per 2 ore a temperatura ambiente e successivamente a 4°C in agitazione per tutta la notte, al fine di favorire la rottura dei corpi inclusi.

Al termine dell'incubazione il campione è stato centrifugato a 13000 rpm per 15 min a 4°C. Si recuperava il supernatante e veniva determinata la concentrazione proteica con il saggio Bradford da cui risultavano 60-90 mg di proteine/litro di coltura batterica. Per mantenere ridotto il ponte cisteinico presente al terminale carbossilico di hPL-A, si aggiungeva al campione 2beta- mercaptoetanolo 10 mM finale.

Cromatografia per affinità con chelanti di metalli

Per la purificazione di una proteina ricombinante dotata di una coda di istidine affinità viene impiegata una cromatografia di affinità in cui la fase stazionaria è costituita da una resina cromatografia alla cui matrice polimerica è adeso un opportuno ligando. Il legame coda di istidine-ligando, e quindi il legame proteina-resina, può essere modulato da soluti presenti nella fase mobile permettendo di operare in condizioni in cui, una volta allontanate le proteine ricombinanti, la proteina di interesse deve essere rilasciata dalla resina (eluizione). Operando su piccola scala è possibile procedere utilizzando una cromatografia "in batch". Una procedura "in batch", anziché utilizzare una resina impaccata in una colonna, prevede la semplice aggiunta della resina alla soluzione proteica da sottoporre a purificazione. In una procedura "in batch" la separazione tra fase solida e fase liquida è resa possibile dalla più elevata densità della fase solida (resina cromatografia) che può quindi essere isolata mediante sedimentazione in centrifuga. Proteine dotate di coda di istidine possono essere convenientemente purificate mediante la tecnica denominata cromatografia di affinità su metallo chelato (metal chelate chromatography). Nel sistema da noi utilizzato per la purificazione di hPL-A, è stata utilizzata la resina al nichel Ni-NTA Superflow (nichel-nitrilotriacetic acid). L'imidazolo compete con la coda di istidine per la chelazione del

metallo, determinando il rilascio della proteina di fusione dalla resina, che può essere così recuperata sotto forma di soluto. La capacità di legame della resina Ni-NTA è di 5-10 mg di proteina per ogni ml di resina.

Si procedeva a lavare la resina con acqua bidistillata, per eliminare la soluzione di etanolo in cui era conservata, ed infine si equilibrava con 5 volumi di colonna in tampone 50 mM Tris-HCl pH 8,0/6 M Guanidinio-HCl, 10 mM β -mercaptoetanololo, 100 mM NaCl, (lo stesso tampone in cui è sospesa la proteina di interesse). La proteina ricombinante è stata incubata per 1 ora e 30 min con la resina, in un becker con un magnetino in agitazione ad una temperatura di 4° C. La miscela, contenente la proteina di interesse (hPL-A) e la resina sono state caricate su colonnina (Chromatographi columns) lavando con cura il becker con altri 10ml di tampone 50 mM Tris-HCl pH 8,0 100mM NaCl, 6 M Guanidinio-HCl, 10 mM β -mercaptoetanololo in modo tale da recuperare tutta la proteina. La resina contenuta nella colonnina è stata lavata con 50 ml di tampone 50 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 6 M Guanidinio-HCl 10 mM β -mercaptoetanololo 5 mM Imidazolo. L'imidazolo è necessario per eliminare le proteine contaminanti non legate alla resina. Si procedeva all'eluizione della proteina ricombinante hPL-A con 5 volumi di colonna di tampone 50 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 6 M Guanidinio-HCl 10 mM β -mercaptoetanololo 200 mM Imidazolo. La completa eluizione della proteina è stata determinata mediante saggio Bradford. Si sono ottenuti 45 mg di proteina in 30 ml di tampone di eluizione. Infine l'eluato è stato separato in SDS-PAGE al 12.5% e le proteine rivelate mediante la colorazione al Blu di Coomassie e/o colorazione argentea, con un protocollo che sarà descritto nel capitolo dedicato alla proteomica (Capitolo V).

Dialisi

La fase successiva di purificazione è stata la dialisi che ha permesso di arricchire la preparazione del nostro campione di interesse e soprattutto, diminuire la presenza del Guanidinio/HCl e di far riacquistare alle proteine la loro conformazione funzionale.

La membrana da dialisi da noi utilizzata è provvista di pori di grandezza tale da permettere il passaggio di molecole al di sotto dei 15000 Daltons, e quindi di trattenere la nostra proteina di interesse, che pesa circa 22000 Daltons. Inoltre il Guanidinio/HCl (che ha una dimensione inferiore a 15000 Daltons) che denatura la h-PL deve essere eliminato in quanto la proteina di interesse deve presentarsi nella sua forma attiva per essere utilizzata nei saggi biologici. Nel nostro caso 0,5-1 mg/ml di proteina sono stati dializzati in tampone contenente 50mM Tris-HCl pH 8,0 1M Guanidinio-HCl 2% Glicerolo 0,2 mM Glutazione ossidato 2 mM Glutazione

ridotto in rapporto 1:100 con il volume della proteina. La dialisi è stata effettuata a 4°C su un agitatore magnetico. Sono stati dunque, eseguiti altri due passaggi di dialisi in tampone 50 mM Tris-HCl pH 8,0. Al termine della dialisi il campione è stato centrifugato 15 minuti a 13000 rpm a 4°C e recuperato il supernatante si ripeteva quindi la cromatografia di affinità nelle stesse condizioni precedentemente descritte senza il β -mercaptoetanololo.

Taglio proteolitico

La TEV Protease è il nome comune per indicare il dominio catalitico di 27 kDa della Nuclear Inclusion a (NIa), proteina codificata dal tabacco etch virus (TEV), utilizzata come reagente per il taglio di proteine ricombinanti. La TEV Protease riconosce un epitopo lineare nella forma E-Xaa-Xaa-Y-Xaa-Q-(G/S), con taglio preferenzialmente tra Q e G oppure tra Q e S. L' epitopo più comunemente usato è ENLYFQG, e cambiamenti nelle posizioni P4 e P2 riducono progressivamente l'efficienza proteolitica. L'enzima ha un'attività di base ad un pH compreso tra 4 e 9. La digestione avviene tipicamente tutta la notte a temperatura ambiente (20°) oppure a 4° C. Una aliquota di 0,3 mg/ml di proteasi TEV è stata scongelata (0.3 mg/ml di TEV tagliano 30 mg di proteina) ed aggiunta all'eluato proveniente dal secondo passaggio cromatografico in Ni-NTA. L'azione proteolitica dell'enzima TEV avviene per dialisi. La miscela contenente la proteina di interesse e la TEV è stata dializzata a 4°C per tutta la notte nel tampone contenente 50 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 1% Glicerolo. La mattina seguente è stata eseguita una seconda dialisi a temperatura ambiente (20°C) per circa 4 ore per favorire la reazione enzimatica dell'enzima TEV. La successiva fase prevede l'utilizzo di un terzo passaggio su cromatografia per affinità (Ni-NTA), tale da permettere la purificazione della proteina ricombinante hPL-A priva della coda di istidine. La proteina è stata recuperata dalla dialisi ed è stata letta la concentrazione con il metodo Bradford: si ottenevano circa 45 mg/30 ml. Sono stati prelevati 1-2 ml di resina Ni-NTA nichel la quale è stata lavata con acqua bidistillata e successivamente equilibrata con tampone contenente 50 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl e infine incubata con la proteina per 45 min a 4° C in un Becker in agitazione con un magnetino. La soluzione contenente la proteina più la resina è stata impaccata su colonnina (Chromatography columns BIO RAD), raccogliendo la soluzione di passaggio. Si procede quindi alla lettura della concentrazione con il saggio Bradford e alla visualizzazione dei campioni in SDS-PAGE 12,5%. La concentrazione proteica dopo il secondo passaggio cromatografico risulta essere di circa 43 mg in 30 ml di volume finale. La proteina è stata dializzata in tampone 50 mM Tris-HCl pH8,0 100mM NaCl al fine di eliminare l'imidazolo dalla soluzione.

Cromatografia liquida su colonna: “Fast Protein Liquid Chromatography”

L'analisi per “Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC) permette la separazione di biomolecole in forma attiva pur sfruttando un sistema pressorio. Il sistema da noi utilizzato è costituito da un controller programmabile (Gradient Programmer GP-250 Plus) per sviluppare e controllare automaticamente la procedura di separazione; da due pompe per la distribuzione di due diversi tamponi; un miscelatore per assicurare un accurato e riproducibile gradiente di eluizione; valvole per l'iniezione dei campioni e il controllo del percorso di flusso; un monitor per la misura del profilo cromatografico attraverso gli UV (Control Unit UV-1); un recorder (REC 102) per documentare attraverso un grafico il profilo cromatografico; un collettore di frazioni (Gradi Frac); colonne cromatografiche per la separazione delle proteine. I passaggi cromatografici in FPLC sono stati eseguiti a 4°C.

Cromatografia ad esclusione di peso molecolare

La colonna Superdex 75 è stata progettata per la separazione cromatografica in funzione della dimensione molecolare. La selettività di questa colonna, ha permesso di risolvere peptidi e proteine in un range di peso molecolare compreso tra 3000-70 000 Da. La colonna ha un volume di base pari a 319-330 ml ed è predisposta per un flusso di lavoro di 0,9-4,4 ml/min, con una pressione massima esercitata dalle pompe di 0,5 MPa. Il meccanismo di purificazione ha previsto l'utilizzo di un solo tampone contenente 50 mM Tris-HCl pH 8,0 con 150 mM NaCl.

Prima di applicare il campione in colonna cromatografica si sono eseguite alcune operazioni preliminari. La colonna cromatografica conservata in acqua ed etanolo al 20% a 4°C, è stata lavata facendo passare 400 ml di H₂O bidistillata precedentemente sonicata. E' stata quindi equilibrata con due volumi di colonna (circa 640 ml) di tampone 50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl ad un flusso di 1ml/min. Il campione è stato concentrato a 10 ml utilizzando i concentratori e dializzatori a membrana applicato sulla colonna cromatografia attraverso l'ausilio di un loop da 10 ml. La proteina prima di passare in colonna risultava essere concentrata circa 60 mg in 10 ml. Il campione fluiva in colonna utilizzando 350 ml di tampone 50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl ad un flusso di 1ml/min, raccogliendo frazioni da 4 ml ciascuna. In base all'equilibratura della colonna Superdex 75, effettua tramite

delle proteine a peso molecolare noto, recuperavamo le frazioni intorno al peso molecolare di 20 kDa. Le aliquote da 20 µl sono state analizzate per il loro contenuto proteico su SDS-PAGE 12,5%. Le frazioni contenenti la proteina di interesse sono state riunite e si sono ottenuti circa 7 mg/l. La proteina è stata dializzata tutta la notte a 4°C in agitazione lenta, in tampone 50 mM Tris-HCl pH 8,0/20 mM NaCl.

Cromatografia a scambio cationico

L'analisi cromatografia in Resource Q utilizza la capacità di lavorare come scambiatore cationico forte che lega le biomolecole cariche negativamente, liberandole poi gradatamente al crescere della concentrazione salina. La colonna ha un volume di base di 1 ml ed è predisposta per un flusso di lavoro di 1-10 ml/min, con una pressione massima esercitata dalle pompe di 1,5 MPa. Il protocollo di purificazione prevede l'utilizzo di due tamponi, precedentemente filtrati e sonicati per 30 min, comunemente indicati come il tampone di partenza 20 mM Tris-HCl pH 8,0 e il tampone di eluizione 20 mM Tris-HCl pH 8,0/1 M NaCl. La concentrazione massima di proteina da applicare in colonna è pari a 25 mg. Prima di applicare il campione in colonna cromatografica sono state eseguite alcune operazioni preliminari. La colonna cromatografica conservata in acqua ed etanolo al 20% a 4°C, è stata lavata facendo passare 10 volumi di colonna (CV) di H₂O bidistillata precedentemente sonicata, in seguito è stata equilibrata facendo passare 5 CV di tampone di partenza, 10 CV di tampone di eluizione ed infine 5 CV di 2% di tampone di eluizione ad un flusso di 1 ml/min. Successivamente il campione proveniente dalla purificazione in Superdex 75 26/60 è stato iniettato in colonna attraverso un Super Loop da 50 ml. Si procedeva alla eluizione attraverso un gradiente lineare da 2%-100% di tampone di eluizione in un volume totale di 20 ml raccogliendo frazioni da 1 ml. Le proteine eluite in ciascun tubo sono state visualizzate in SDS-PAGE 12,5% con una colorazione al Coomassie. Le frazioni contenenti la proteina di interesse (dalla frazione 5 alla 13 nel caso specifico) sono state riunite e la concentrazione proteica risultava di circa 6 mg/l. La proteina di interesse, è stata quindi dializzata (in rapporto di 1:100 rispetto al campione di proteina purificata) in tampone 20 mM Tris-HCl pH 8,0/10 mM NaCl procedendo per 3 cambi di dialisi al fine di diminuire la concentrazione salina.

Cromatografia a scambio anionico

La cromatografia a scambio anionico in Mono Q HR 5/5, è costituita da una resina a scambiatore di anioni forte che lega le biomolecole negativamente caricate liberandole poi gradatamente al crescere della concentrazione salina e differisce dalla precedente perché la

resina è costituita da sferule più piccole e quindi risulta in una migliore separazione.

La colonna utilizzata aveva un volume di base pari a 1 ml ed era predisposta per un flusso di lavoro di 1-10 ml/min, con una pressione massima esercitata dalle pompe di 1.5 MPa. Il meccanismo di purificazione ha previsto l'utilizzo di due tamponi, precedentemente filtrati e sonicati per 30 min, comunemente indicati come lo tampone di partenza 20 mM Tris-HCl pH 8,0 e il tampone di eluizione 20 mM Tris-HCl pH 8,0 1 M NaCl. La concentrazione massima di proteina da caricare in colonna è stata di 25 mg. Prima di applicare il campione in colonna cromatografica sono state eseguite alcune operazioni preliminari. La colonna cromatografica conservata in acqua ed etanolo al 20% a 4°C, è stata lavata facendo passare 10 volumi di colonna (CV) di H₂O bidistillata precedentemente sonicata, e fatta equilibrare con 5 CV di tampone di partenza, 10 CV del tampone di eluizione ed infine altri 5 CV di 2% di tampone di eluizione ad un flusso di 1 ml/min. Il campione proveniente dalla purificazione su Resource Q è stato applicato in colonna attraverso un Super Loop da 50 ml.

L'eluizione del campione è avvenuta con una pendenza lineare dal 2% al 100% del tampone B (10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1M NaCl) in un volume totale di 20 ml, raccogliendo frazioni di 1 ml ciascuna. Le proteine eluite in ciascun tubo sono state visualizzate in SDS-PAGE 12,5% con una colorazione al Coomassie. Le frazioni contenenti la proteina di interesse (dalla frazione 5 alla 13 nel caso specifico) sono state riunite e la concentrazione proteica risultava di circa 6 mg/l.

La proteina di interesse, è stata quindi dializzata (in rapporto di 1:100 rispetto al campione di proteina purificata) in tampone 20 mM Tris-HCl pH 8,0 con 10 mM NaCl procedendo per 3 cambi di dialisi al fine di diminuire la concentrazione salina. Successivamente, la proteina è stata conservata aggiungendo 10 mM di sodio azide al campione di 9 ml, veniva flussata in azoto liquido ed aliquotata 100 µg in eppendorf da 1.5 ml e conservata a -80°C per essere successivamente utilizzata nei saggi biologici.

Analisi elettroforetica

Il gel di agarosio da noi usato per analizzare il DNA plasmidico, proveniente dalle mini o maxi preparazioni, o il DNA digerito con enzimi di restrizione, è un gel neutro, dove il DNA migra come molecola a doppia elica. Il gel di poliacrilammide con SDS viene invece utilizzato per analizzare i campioni di proteine in forma denaturata. Per il gel neutro si utilizza un gel di agarosio all'1% in tampone TBE 1x. L'agarosio così sciolto viene equilibrato a 50°C in un bagnetto termostato per far scendere la temperatura senza dare inizio alla polimerizzazione, quindi viene aggiunto Bromuro di Etidio, 2.5 µl per ogni 50 ml di

soluzione. Il gel polimerizzato viene quindi sistemato nell'apposita cella elettroforetica riempita con il tampone di corsa TBE 1x, quindi chiuso il circuito con dei cavetti elettrici viene applicato un voltaggio pari a 100 volts per 80 min circa. Insieme ai campioni migra un marker di DNA il 1kb DNA Ladder 1x che ci consente di stimare la grandezza (in paia di basi) dei frammenti di DNA.

Il gel entro cui avviene la migrazione elettroforetica dei campioni proteici da analizzare è costituito da una concentrazione pari al 12,5% di acrilammide. I campioni da separare in SDS-PAGE sono stati dapprima bolliti per 5 min in un tampone di caricamento 1x (tampone di caricamento 3x, 3.75 ml upper tris 4x, 1.5 ml 2 β -mercaptoetanolo, 0.9 gr SDS, 3 ml glicerolo, 4 mg blu di bromofenolo, portare a volume finale di 10 ml con H₂O bidistillata) e poi raffreddati in ghiaccio per altri 5 min prima di essere caricati su gel. Una volta caricati i campioni la corsa elettroforetica procedeva, nel caso di mini gel (5 x 8 cm) utilizzati per l'analisi qualitativa della proteina ricombinante hPL-A purificata, prima a 80 volts per 30 min per consentire l'impacchettamento delle proteine nello stacking gel (4% di acrilammide), poi a 120 volts per la separazione delle stesse nel running gel. Per evidenziare le bande corrispondenti alle proteine separate, il gel è stato colorato per 30 min con una soluzione contenente il Blu di Coomassie (125 ml isopropanolo, 50 ml acido acetico, 0,25 gr Coomassie blu, 325 ml di H₂O distillata). Il gel è stato quindi decolorato "over night" in una soluzione contenente: 75 ml di acido acetico, 250 ml di metanolo, 675 ml H₂O distillata.

Analisi di spettrometria di massa

Per verificare che la proteina ricombinante hPL-A fosse stata purificata da contaminanti, è stata eseguita analisi di spettrometria di massa, con strumenti che saranno descritti nel capitolo dedicato alla proteomica (Vedere capitolo V).

Risultati

Durante il primo e secondo anno di dottorato è stata messa a punto la metodica di espressione e purificazione dell'ormone lattogeno placentare umano (isoforma A) secondo due metodiche. La prima metodica utilizzata si riferisce a quella riportata in letteratura (Lowman et al., 1991) con la quale sono stati ottenuti circa 500 µg di proteina ricombinante per litro di coltura batterica.

Secondo questa metodica il DNA plasmidico phPL4828 (Figura 10), codificante per la proteina hPL-A, è stato espresso in batteri di *E. coli* (ceppo DH5α) coltivati in un terreno povero di fosfati al fine di favorire l'espressione della proteina di interesse.

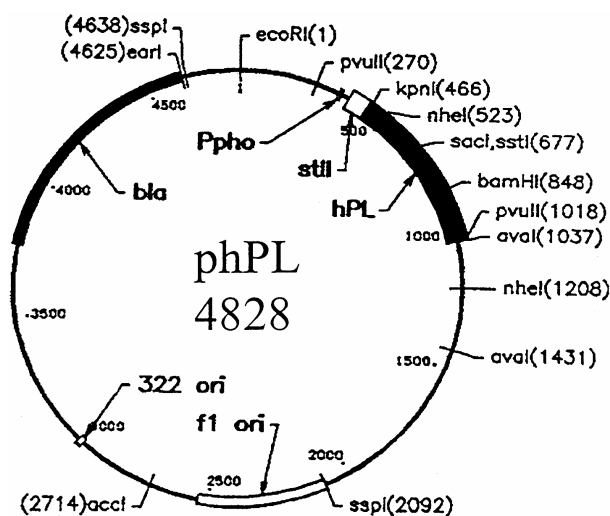


Figura 10 - Mappa del plasmide phPL 4828.

hPL: cDNA codificante la proteina ricombinante hPL-A; *still*: sequenza nucleotidica per l'espressione della proteina ricombinante hPL-A nello spazio periplasmatico; *Ppho*: sequenza nucleotidica che consente l'espressione della proteina hCSA in terreni poveri di fosfati; *AvaI*: sito di restrizione riconosciuto dall'enzima di restrizione *AvaI*; *KpnI*: sito di restrizione riconosciuto dall'enzima di restrizione *KpnI*.

Successivamente ad una precipitazione in solfato di ammonio saturo e due fasi successive di cromatografia a scambio ionico la proteina purificata è risultata pura al 90-95% all'omogenità elettroforetica valutata con la colorazione in Coomassie (figura 11).

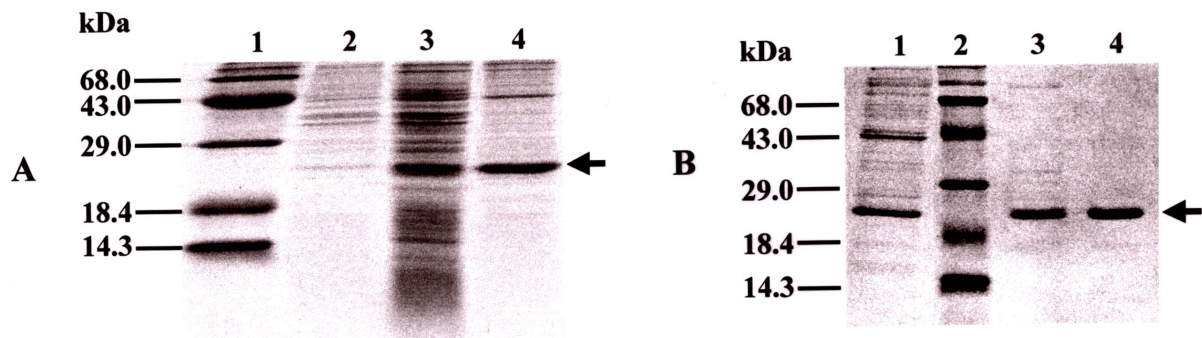


Figura 11 - SDS-PAGE al 12.5% di aliquote recuperate durante la fase di espressione e purificazione della proteina ricombinante PL-A.

Pannello A: marker di proteine a peso molecolare noto (corsia 1), proteine contenute nel terreno di coltura batterica dopo induzione di hPL-A in terreno povero di fosfati (corsia 2), "shockate" di proteine fuoriuscite dallo spazio periplasmatico della parete batterica (corsia 3), proteine precipitate in ammonio solfato saturo al 90% (corsia 4).

Pannello B: contenuto proteico dopo dialisi (corsia 1), marker di proteine a peso molecolare noto (corsia 2), frazioni proteiche dopo cromatografia a scambio ionico per FPLC (corsie 3-4). Le frecce indicano la banda relativa alla proteina ricombinante hPL-A.

Una successiva analisi del prodotto proteico con la colorazione più sensibile che utilizza i Sali di nitrato d'Argento ha evidenziato alcune tracce di proteine contaminanti (figura 12).

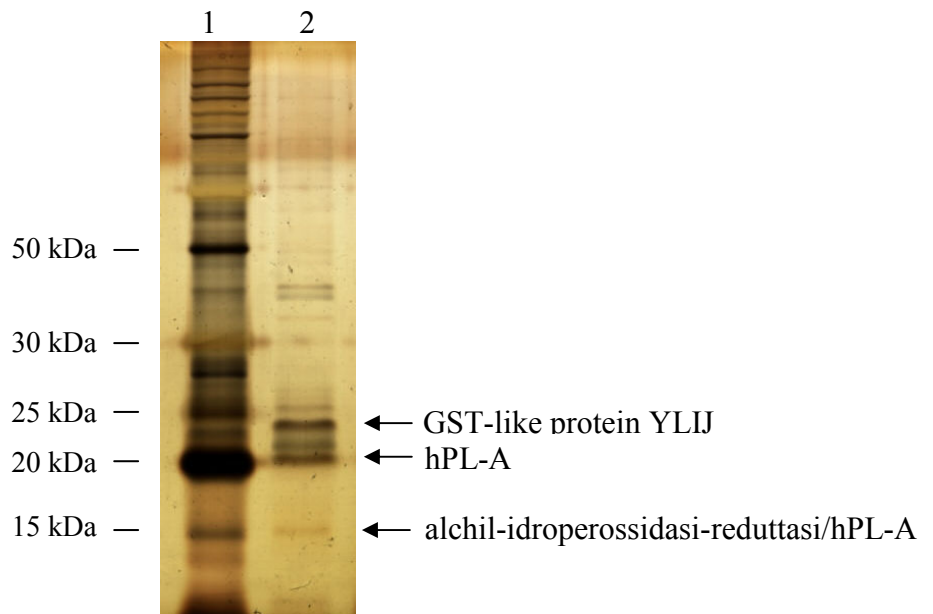


Figura 12 - 12.5% SDS-PAGE e rivelazione delle proteine con colorazione AgNO_3 .

Corsia 1, marker di proteine a peso molecolare noto. Corsia 2 aliquota di 5 μl di hPL-A dopo l'ultima fase di purificazione con il metodo Lowman. Le frecce indicano con a) ipotetica proteina GST-like YLIJ *E. coli* K12, b) hPL-A, c) alchil-idrossiperossidasi-reduttasi/hPL-A le proteine identificate all'analisi di spettrometria di massa.

L'analisi in banca dati degli spettri dei digesti triptici ottenuti per spettrometria di massa (MALDI-TOF) ha identificato la proteina hPL-A e due proteine contaminanti di E. coli: 1) la proteina GST-like YLIJ (23 kDa) e 2) la proteina batterica alchil-idrossiperossidasi-reduttasi. Per eliminare le contaminanti proteiche, è stato quindi necessario modificare la procedura di purificazione introducendo una cromatografia ad esclusione di peso molecolare (Superdex 75 26/60) prima dell'ultima fase cromatografica a scambio ionico. La proteina ricombinante di interesse compariva come unica banda all'analisi elettroforetica, ma l'analisi in spettrometria di massa indicava che era stata eliminata la contaminante GST-like, mentre risultava ancora presente la contaminante batterica alchil-idroperossidasi-reduttasi (figura 13).

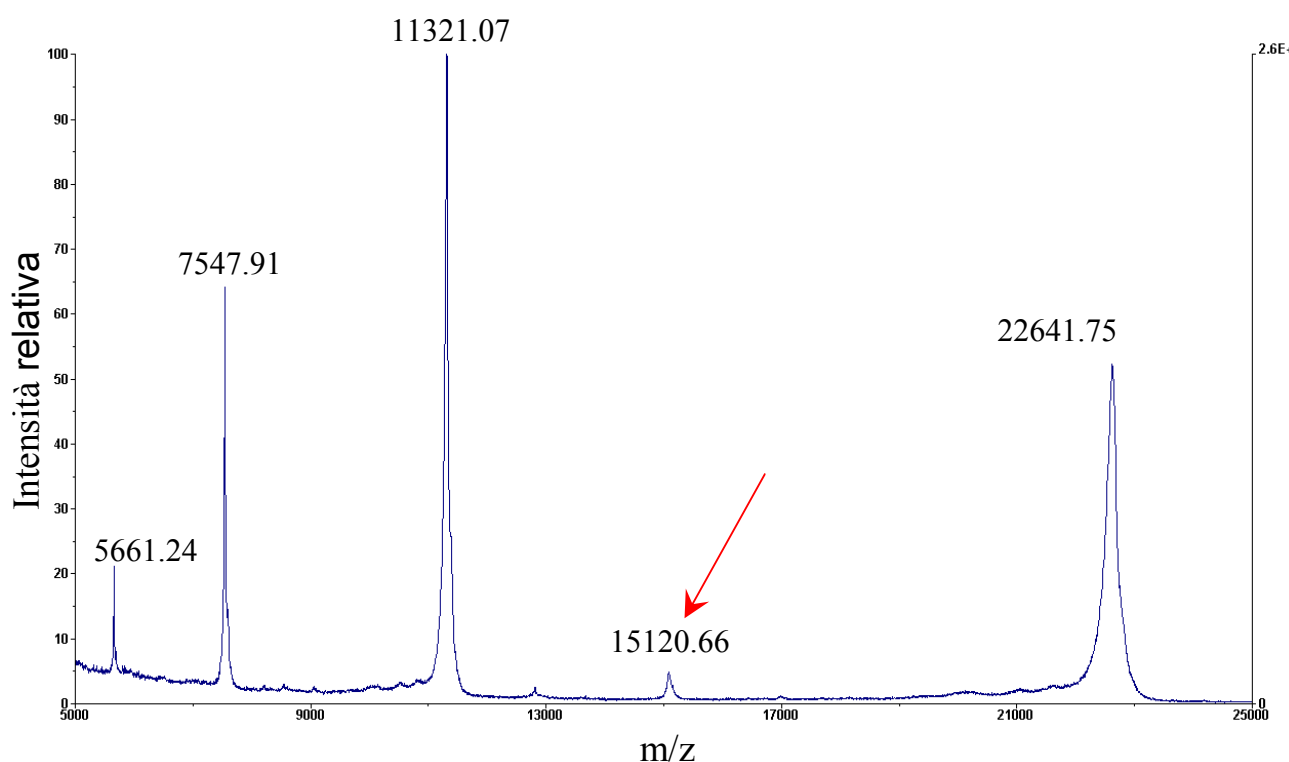


Figura 13 – Spettro di massa eseguito al MALDI-TOF in modalità lineare.

Al rapporto massa-carica pari a 22641.75 corrisponde lo ione monovalente dell'ormone lattogeno placentare, ai rapporti massa-carica 11321.07; 7547.91 e 5661.24 rispettivamente gli ioni doppia carica, tripla carica e quadrupla carica dello stesso ormone lattogeno placentare.

Il rapporto massa-carica pari a 15120.66 corrisponde al peso molecolare della contaminante batterica alchil-idroperossidasi-reduttasi.

La necessità di ottenere la proteina ricombinante hPL-A in forma pura e in concentrazione adeguata (mg/l di coltura batterica) per i successivi saggi biologici ci ha condotto a sviluppare una nuova metodica di espressione e purificazione. Il nuovo metodo ha previsto l'utilizzo del vettore inducibile forte T7. Il cDNA di hPL-A è stato perciò subclonato nei siti di clonaggio NcoI e XhoI nel nuovo vettore di espressione pETM-11 (Figura 14) ed il plasmide pETM-11/hPL-A è stato trasformato nel ceppo BL21 (DE3) di *E. coli*.

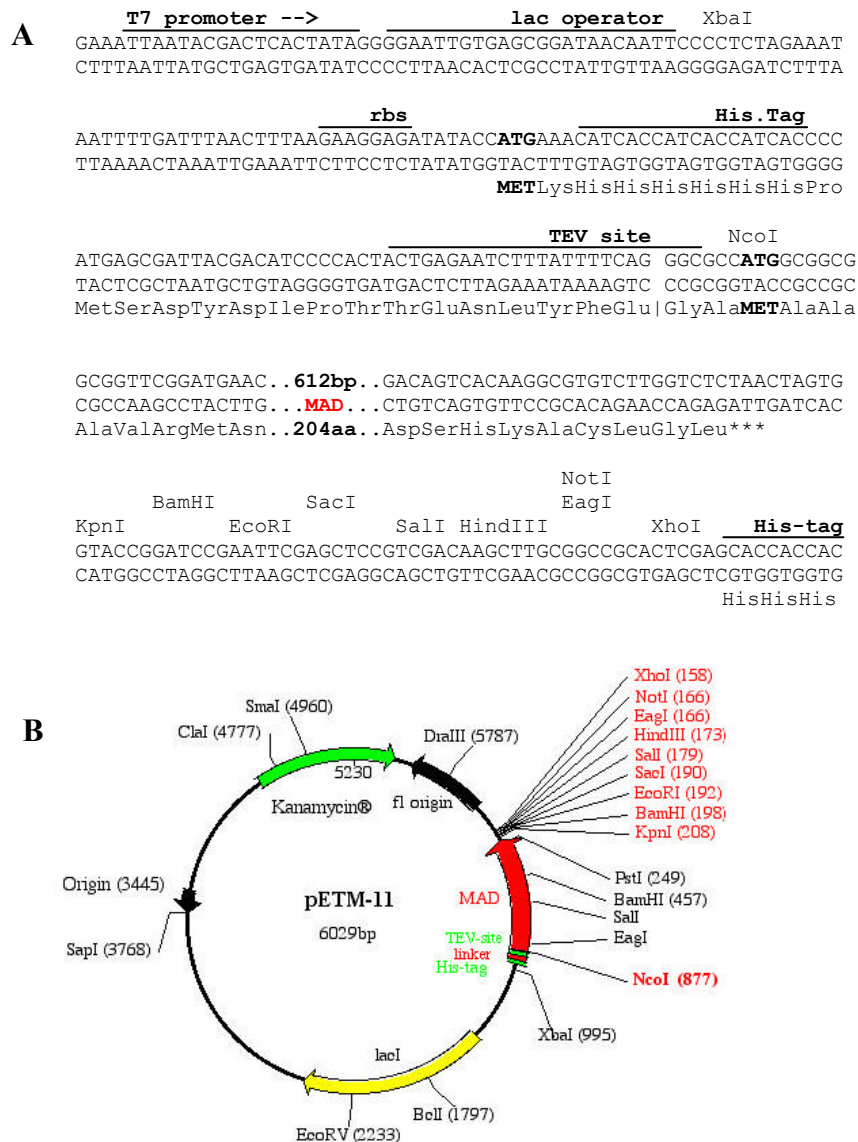


Figura 14 - Mappa del vettore plasmidico pETM-11 e sequenza Nucleotidica del sito di clonaggio del vettore. Pannello A. Sequenza nucleotidica del plasmide pETM-11 recante il gene per l'espressione della proteina ricombinante hPL-A. *T7 promoter*: promotore inducibile di origine virale; *lac operator*: operone lattosio per l'espressione della proteina hPL-A dopo induzione con IPTG nel mezzo di coltura; *TEV site*: sequenza nucleotidica codificante per il sito proteolitico; *His-tag*: sequenza codificante per la coda di istidine; *NcoI*: sito di restrizione riconosciuto dall'enzima di restrizione NcoI; *XhoI*: sito di restrizione riconosciuto dall'enzima di restrizione XhoI. Pannello B. Mappa del plasmide pETM-11 utilizzato per l'espressione della proteina ricombinante in *E. coli* ceppo BL21 (DE3)

Con questa metodica hPL-A è stata espressa non nel supernatante, ma nei corpi inclusi batterici. La proteina ricombinante è stata estratta dai corpi inclusi mediante solubilizzazione con tampone contenente Guanidinio/HCl 6M/Tris-HCl pH 8,0.

Per mezzo di fasi successive di dialisi è stato eliminato progressivamente l'agente denaturante per permettere alle proteine di riformare la propria corretta struttura tridimensionale. L'ulteriore fase di purificazione ha previsto una cromatografia di affinità, in cui la proteina di interesse ha interagito con la resina di nichel mediante code di istidine, eliminate successivamente con un taglio proteolitico dell'enzima TEV. La proteina ricombinante hPL-A è stata ulteriormente purificata attraverso successive fasi di cromatografia: 1) esclusione di peso molecolare (Superdex 75 26/60), e 2) scambio ionico (RESOURCE Q, prima, e Mono Q, dopo).

Il campione, puro all'omogeneità elettroforetica è stato analizzato per spettrometria di massa (Figura 15). L'analisi MALDI-TOF ha identificato nel campione di hPL-A così purificato ancora la contaminante batterica alchil-idroperossidasi-reduttasi. Nel tentativo di eliminare tale proteina abbiamo proceduto, quindi, introducendo nel nuovo metodo un'ulteriore fase che utilizzasse il fatto che la proteina hPL-A era provvista di coda di istidine rispetto alle proteine contaminanti che invece ne erano prive. Dopo solubilizzazione dei corpi inclusi in presenza di guanidinio/HCl 6M abbiamo aggiunto alla sospensione proteica, 2-beta-mercaptoetanololo 10 mM. La soluzione è stata analizzata in cromatografia di affinità (Ni^{2+}) nelle stesse condizioni descritte precedentemente. In queste condizioni fortemente denaturanti e riducenti è stata garantita l'impossibilità d'interazione tra le contaminanti e la proteina di interesse, poiché in assenza di organizzazione strutturale non possono esservi interazioni specifiche. Il passaggio di purificazione per affinità al Nichel è risultato efficace perché hPL-A, nonostante si trovasse in condizioni fortemente riducenti, presentava la coda di istidine che le permettevano di legarsi alla resina di affinità, mentre le contaminanti non avevano alcuna possibilità d'interazione né con la resina né con hPL-A. Abbiamo proceduto con una dialisi per eliminare il guanidinio e per permettere alla proteina di riassumere la sua corretta conformazione terziaria. A questo punto il metodo è proseguito con il secondo passaggio cromatografico su Ni-NTA (Tabella 1 – Schema riassuntivo del metodo ottimizzato).

L'analisi di spettrometria di massa sul digesto triptico del campione proteico così ottenuto, ha identificato peptidi relativi unicamente alla proteina hPL-A (Figure 16, 17) e l'analisi di spettrometria di massa eseguita sul campione non digerito con tripsina ha confermato il

peso molecolare atteso di hPL-A dopo il taglio proteolitico dell'enzima TEV. (Figure 18 e 19). Inoltre i saggi biologici per verificare l'attività dell'ormone (vedere capitolo III) sono risultati positivi.

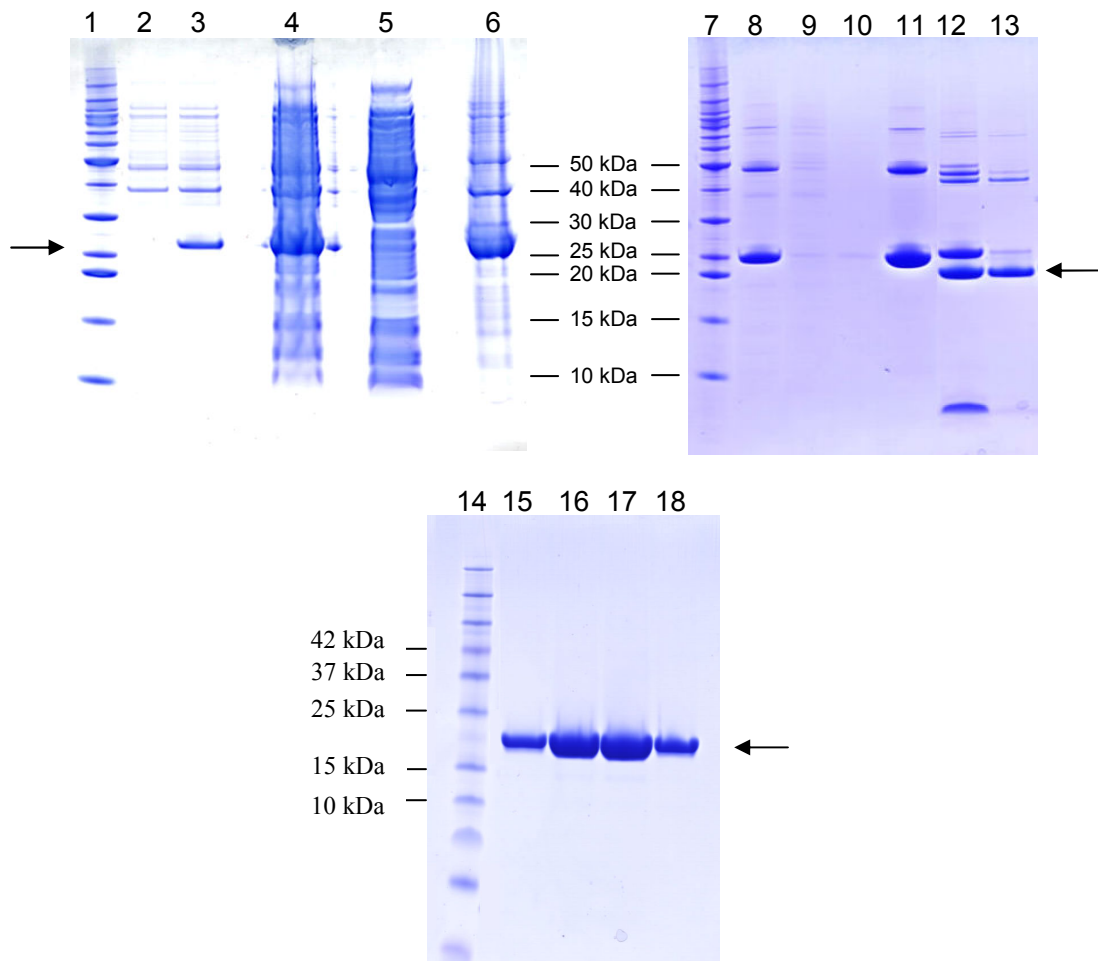


Figura 15 - SDS-PAGE al 12.5% di aliquote ottenute durante le fasi per la purificazione della proteina ricombinante (hPL-A).

Marker di proteine a peso molecolare noto (*corsie 1, 7 e 15*), proteine contenute nel terreno di coltura prima dell'induzione (*corsia 2*), dopo induzione con IPTG (*corsia 3*), totale di proteine batteriche dopo lisi cellulare (*corsia 4*), supernatante (*corsia 5*), corpi di inclusione precipitati dopo centrifugazione (*corsia 6*), dialisi proteica (*corsia 8*), Flow trough delle proteine caricate su cromatografia ad esclusione di peso molecolare (*corsia 9*), eluizione proteica con 5mM Imidazolo (*corsia 10*), eluizione della proteina hPL-A con 200 mM Imidazolo (*corsia 11*), taglio proteolitico con l'enzima TEV (*corsia 12*), hPL-A senza la coda di istidine (*corsia 13*), eluato proveniente dalla cromatografia su colonna ad esclusione di peso molecolare Superdex75 (*corsie 15*), eluato proveniente dalla cromatografia su colonna a scambio ionico ResourceQ (*corsia 16*), eluato proveniente dalla cromatografia su colonna a scambio ionico MonoQ (*corsia 17*), dialisi proteica (*corsia 18*). Le frecce indicano la banda relativa alla proteina ricombinante hPL-A.

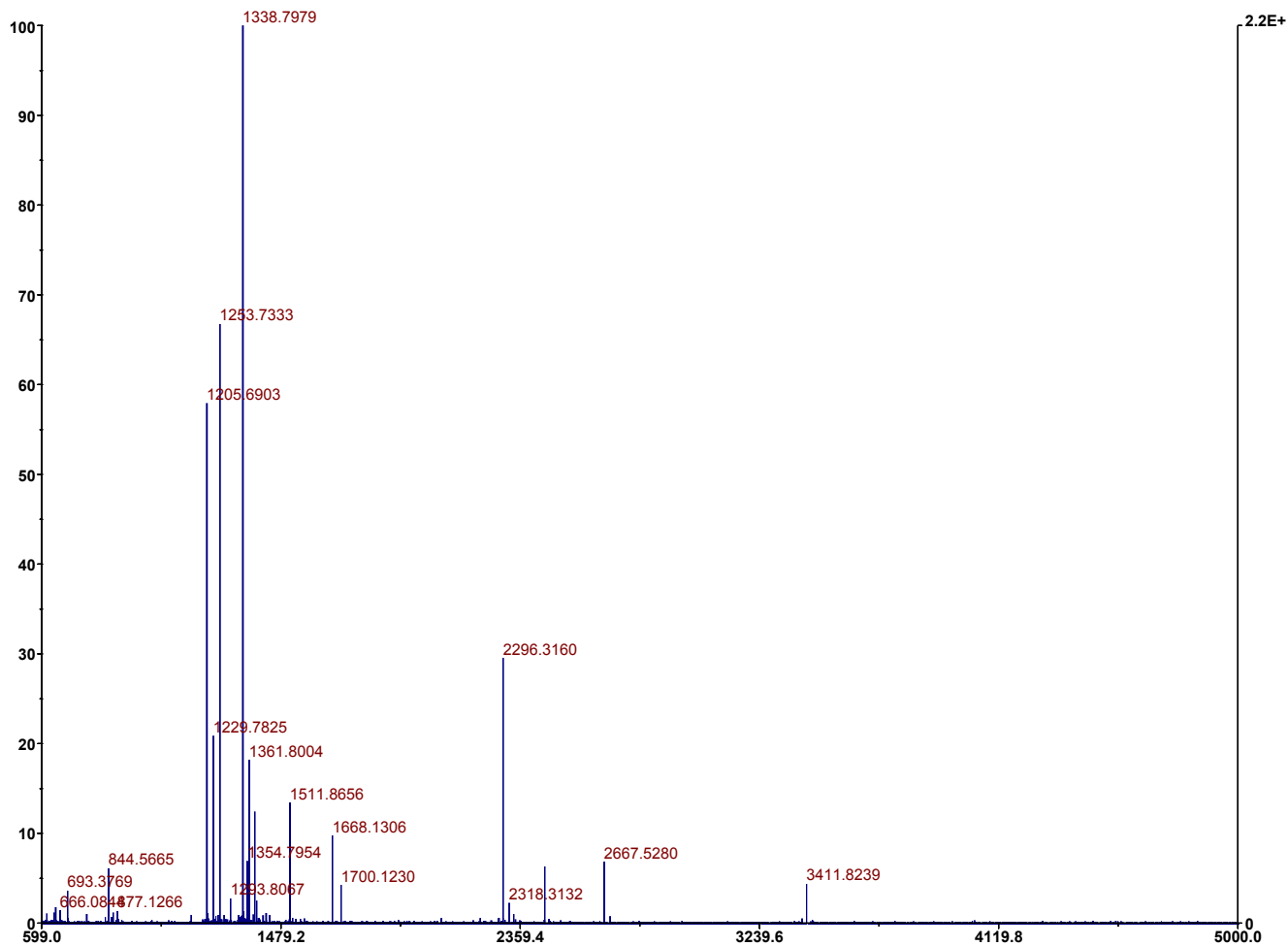


Figura 16- Analisi peptidica di hPL-A in spettrometria di massa (MALDI-TOF).
 La Figura mostra i picchi relativi all'analisi in spettrometria di massa del digesto triptico della proteina ricombinante hPL-A ottenuta con il *metodo ottimizzato*.

MASCOT **SCIENCE** Mascot Search Results

Protein View

Match to: **gi|229451** Score: **193** Expect: **1.5e-13**
placental lactogen

Nominal mass (M_r): **22522**; Calculated pI value: **5.33**
 NCBI BLAST search of [gi|229451](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: **21**
 Number of mass values matched: **14**
 Sequence Coverage: **65%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 VQIVPLSR**LF DHAMLQAHRA HQLAIDTYQE FEETYIPKQ** KYSFLHDSQT
51 SFCFSDSIPT PSNMEETQ**QK SNLELLRISL LLIESWLEPV RFLRSMFANN**
101 LVYD**TSDD YHLLKDLQEG IETLMGRLED** GSRRTGQILK QTYS**KFD**TNS
151 **HHDALLKNY GLLYCFR**KDM DKVETFLRMV** QCR**SVESGCG F

Show predicted peptides also

Sort Peptides By Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
9 - 19	1338.7979	1337.7906	1337.6662	0.1244	0	R.LFDHAMLQAHRA
9 - 19	1354.7954	1353.7881	1353.6612	0.1270	0	R.LFDHAMLQAHRA Oxidation (M)
20 - 38	2296.3160	2295.3087	2295.1059	0.2028	0	R.AHQLAIDTYQFEETYIPK.D
20 - 41	2667.5280	2666.5207	2666.2864	0.2344	1	R.AHQLAIDTYQFEETYIPKQK.Y
71 - 77	844.5665	843.5592	843.4814	0.0778	0	K.SNLELLR.I
78 - 91	1668.1306	1667.1233	1666.9657	0.1576	0	R.ISLLLLIESWLEPV.R
95 - 115	2448.3156	2447.3083	2447.0951	0.2133	0	R.SMFANNLVYDTSDDYHLLK.D
116 - 127	1361.8004	1360.7931	1360.6656	0.1275	0	K.DLQEGIETLMGR.L
146 - 158	1511.8656	1510.8583	1510.7164	0.1419	0	K.FDTNSHHDALLK.N
159 - 167	1205.6903	1204.6830	1204.5699	0.1132	0	K.NYGLLYCFR.K
168 - 178	1381.8452	1380.8379	1380.7071	0.1308	2	R.KDMDKVETFLR.M
169 - 178	1253.7333	1252.7260	1252.6121	0.1139	1	K.DMDKVETFLR.M
173 - 178	764.5017	763.4944	763.4228	0.0716	0	K.VETFLR.M
179 - 183	693.3769	692.3696	692.3098	0.0598	0	R.MVQCR.S

No match to: 1208.6964, 1229.7825, 1293.8067, 1388.7406, 1423.8610, 1700.1230, 3411.8239

Figura 17- Analisi peptidica in banca dati.

La figura illustra l'identificazione dei picchi peptidici mostrati in Figura 16 tramite l'analisi delle sequenze aminoacidiche nella banca dati **nrNCBI** attraverso l'uso del motore di ricerca **Mascot (UK)** (http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view): la sequenza aminoacidica di 14 peptidi su 21 analizzati identifica la proteina hPL-A, coprendo per il 65% la sequenza aminoacidica della proteina stessa.

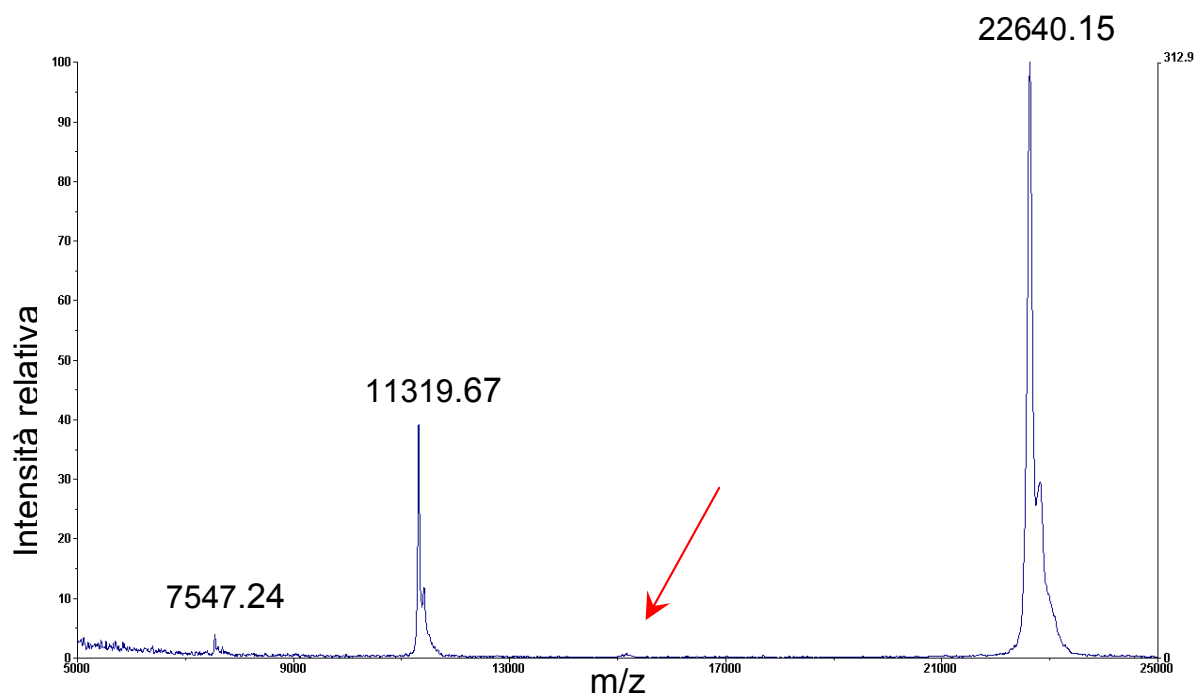


Figura 18 - Spettro di massa eseguito al MALDI-TOF in modalità lineare.

Al rapporto massa-carica pari a 22640.15 corrisponde lo ione monocarica dell'ormone lattogeno placentare (hPL-A), ai rapporti massa-carica 11319.67 e 7547.24 rispettivamente gli ioni doppia carica e tripla carica dello stesso ormone lattogeno placentare.

Il picco di rapporto massa-carica 15120.66, evidenziato in figura 13, e corrispondente al peso molecolare della contaminante batterica alchil-idroperossidasi-reduttasi, dopo la purificazione di hPL-A con il metodo ottimizzato è assente.

```
GAMAVQTVPLSRLFDHAMLQAHRAHQLAIDTYQEFETYIPKDQKYSFLHDSQTS
FCFSDSIPTPSNMEETQQKSNLELLRISLLIESWLEPVRFLRSMFANNLVYDTSDS
DYHLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSRRTGQILKQTYSKFDTNSHNHDALLKNYGLLY
CFRKDMDKVETFLRMVQCRSVEGSCGF
```

Figura 19- Sequenza amminoacidica corrispondente al peso molecolare atteso di hPL-A.

Il peso molecolare atteso (PM atteso = 22639.62Da) dell'ormone lattogeno placentare (hPL-A), dopo il taglio proteolitico con enzima TEV, concorda con il peso molecolare osservato agli spettri di massa delle figure 13 e 18 (PM osservato= 22640.15 Da).

SCHEMA del METODO 2 di ESPRESSIONE & PURIFICAZIONE DI hPL-A

1. trasformazione;
2. pre-inoculo;
3. inoculo;
4. induzione con IPTG;
5. lisi batterica tramite sonicazione;
6. centrifugazione dei corpi inclusi;
7. solubilizzazione corpi inclusi in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8,0, guanidinio/HCl 6M, β -mercaptoetanolo 10 mM;
8. cromatografia per affinità (Ni-NTA) in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8,0, guanidinio/HCl 6M, β -mercaptoetanolo 10mM, ed eluizione con lo stesso tampone in presenza di imidazolo 200 mM;
9. dialisi (1:100) in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8,0 guanidinio/HCl 1M, glutazione ossidato 0.2 mM, glutazione ridotto 2 mM;
10. cromatografia per affinità (Ni-NTA) ed eluizione della proteina hPL-A con tampone Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, imidazolo 200 mM;
11. taglio proteolitico con l'enzima TEV per la rimozione della coda di istidine in dialisi;
12. cromatografia per affinità (Ni-NTA) e recupero della proteina hPL-A nella soluzione di lavaggio;
13. cromatografia per gel filtrazione (Superdex 75 H/R 26/60);
14. dialisi in tampone Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 10 mM;
15. cromatografia a scambio ionico (Resource Q);
16. dialisi in tampone Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 10 mM;
17. cromatografia a scambio ionico (Mono Q HR 5/5);
18. dialisi in tampone Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 10 mM.

Tabella1- La tabella riassume i passaggi dell'espressione e purificazione della proteina ricombinante hPL-A con il metodo ottimizzato.

Sono fondamentali: 1) l'espressione genica sotto l'azione del promotore forte T7 (che permette di ottenere milligrammi di prodotto); 2) una coda di istidina legata alla proteina ricombinante che introduce nella purificazione una cromatografia per affinità; 3) il successivo processo in ambiente riducente (*beta-Mercaptoetanolo*) per ostacolare l'interazione della proteina alchilidrossiperossidasi-reduttasi batterica con hPL-A.

Discussione

Lo studio riportato in questa tesi ha previsto l'utilizzo dell'ormone lattogeno placentare umano (hPL-A) non reperibile commercialmente. E' stato quindi necessario sviluppare il metodo di espressione e purificazione come descritto in letteratura (Lowman et al., 1991). Questo metodo è stato successivamente modificato ed ottimizzato per i nostri studi di interesse. L'ottimizzazione del metodo di purificazione di hPL-A, si è resa necessaria per due motivi fondamentali: 1) la proteina era espressa sotto l'azione del promotore della fosfatasi alcalina, che è un promotore debole, in quantità di microgrammi e quindi non sarebbe stato possibile utilizzare lo stesso preparato per tutte le prove sperimentali; 2) nel nostro caso, la proteina ricombinante di interesse ha purificato insieme a contaminanti batteriche (le proteine alchil-idrossiperossidasi-reduttasi e glutatione-S-transferasi (GST)). La proteina alchil-idrossiperossidasi-reduttasi, a causa del peso molecolare simile alla proteina hPL-A, rispettivamente 15 kDa e 22 kDa, non si è potuta eliminare con la separazione cromatografica (Gel Filtration e/o scambio ionico, procedura che ha permesso di eliminare la contaminante GST-like). La proteina alchil-reduttasi, agisce nelle cellule come antiossidante, attraverso l'attività perossidasi, secondo la reazione $\text{ROOH} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ (Wood et al., 2003). I risultati ottenuti hanno evidenziato che hPL-A e la proteina alchil-idrossiperossidasi-reduttasi presentano anche un simile punto isoelettrico (pI) di 5,2 e 5,5. Nel metodo descritto in letteratura (Lowman et al,1991) non si fa riferimento al problema della contaminante proteica batterica, probabilmente perchè il ceppo di E. Coli 16C9 utilizzato per far esprimere la proteina ricombinate nel lavoro originario, e che noi non potevamo reperire commercialmente, era differente da quello da noi utilizzato (DH5 α). Il metodo di purificazione da noi ottimizzato, ha previsto quindi, l'espressione genica sotto l'azione del promotore forte T7 e questo ha permesso di ottenere milligrammi di prodotto utili per le tutte sperimentazioni successive. Per risolvere il problema della contaminazione proteica è stato cambiato il vettore di espressione: il vettore di espressione che abbiamo utilizzato contiene una coda di istidina legata alla proteina ricombinante (successivamente rimossa) che introduce nella purificazione una cromatografia per affinità. È stato comunque fondamentale il successivo processo in ambiente riducente (beta-Mercaptoetanol) per ostacolare l'interazione della proteina alchilidrossiperossidasi-reduttasi batterica con hPL-A, durante le fasi di purificazione. In conclusione la proteina ricombinante hPL-A, così ottenuta, è risultata pura all'omogeneità elettrofotetica, all'analisi di spettrometria di massa e funzionale ai saggi biologici.

CAPITOLO III

VIA DI INDUZIONE INTRACELLULARE DELL'ORMONE LATTOGENO PLACENTARE NELLE CELLULE DEL DOTTO PANCREATICO

Introduzione

L'ormone lattogeno placentare (PL), l'ormone della crescita (GH) e la prolattina (PRL) rappresentano delle proteine omologhe derivanti da un unico gene ancestrale (Goffin et al., 1996; Sorenson et Brelje, 1997). PL e GH sono composti da 191 residui aminoacidici; nella specie umana possiedono un'omologia di sequenza aminoacidica dell'85%, (Niall et al., 1971) mentre la prolattina umana (hPRL), mostra un minore grado di omologia strutturale con GH umano (hGH) e l'ormone placentare umano (hPL) (circa 23%) (Shome et al., 1977).

Gli effetti biologici di GH, PRL e PL sono molteplici e diversificati, e questi ormoni polipeptidici appartengono alla superfamiglia delle citochine (Somerset et al., 1994). L'ormone hGH ha attività somatogenica, lattogenica, lipolitica; hPRL ha attività lattogenica; l'attività di hPL è meno descritta in letteratura, ma l'ormone sembra essere coinvolto nell'allattamento, nella modulazione della secrezione insulinica, nella crescita e nel metabolismo fetale (Chawla et al., 1983).

Diversi studi hanno indicato che GH, PRL e PL sono potenti induttori della replicazione della beta cellula pancreatica, senza compromettere la sua capacità di produrre insulina (Galsgaard et al., 1999; Sorenson et Brelje, 1997).

La funzionalità degli ormoni GH, PRL e PL è regolata dalla presenza di relative molecole recettoriali. Il recettore per l'ormone della crescita (GHR) e quello per la prolattina (PRLR) appartengono ad una classe della superfamiglia dei recettori delle citochine (Kelly et al., 1991). La sequenza aminoacidica di GHR e di PRLR mostra un'omologia del 20% e la struttura terziaria risulta costituita da tre domini:

- 1) dominio extracellulare interagisce con un ligando attivandolo e conferendogli specificità;
- 2) dominio transmembrana formato da circa 25 aminoacidi;
- 3) dominio citoplasmatico responsabile del meccanismo di inizio per la trasmissione del segnale all'interno della cellula che coinvolge le proteine Janus Kinase (Jak), una famiglia di tirosin-chinasi recettore-associate note come Jak -1, -2, -3 che si fosforilano e si associano a fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia delle proteine Signal Transducers and Activators of Transcriptions (Stats) (Beverly et Heweston, 2005) costituita da otto membri:

Stat-1 (α e β), Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5a, Stat-5b, Stat6 (Darnell, 1997). Una volta attivate le Jak si legano al dominio SH2 delle proteine Stat facendole entrare a fare parte del complesso recettore-Jak. Quindi le proteine Stat, fosforilate, si dissociano dal recettore. Il dominio SH2 della proteina Stat rilasciata dal complesso Jak/Stat media il legame ad una fosfotirosina situata su un'altra proteina Stat, formando un dimero della proteina Stat che dal citoplasma trasloca nel nucleo, dove in combinazione con altre proteine di regolazione genica, si lega ad un elemento specifico sul DNA stimolando la trascrizione (Calò et al., 2003).

La cellula risponde rapidamente al GH attraverso la fosforilazione e l'attivazione della proteina Jak-2 (Carter et al., 1996). L'attivazione di Jak-2 induce la fosforilazione del recettore di GH stesso e di diversi substrati intracellulari come le proteine: Stat-1, -3 e -5 che regolano la trascrizione di una varietà di geni; IRSs (Substrato del recettore insulinico) 1 e 2, che regolano l'espressione genica, la sintesi di proteine, la mitogenesi ed il metabolismo del glucosio; le proteine MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) come ERK-1 e -2, che sono implicate nella regolazione della crescita e del differenziamento cellulare (Carter et al., 1996).

I meccanismi di trasduzione del segnale sembrano avere basi comuni, ma seguono vie differenti a seconda dei tessuti implicati, anche per la stessa molecola. Nel tessuto muscolare e nel fegato di ratti normali GH attiva la proteina Stat, ma non IRS-1 (Chow et al., 1996), mentre negli adipociti di ratto si osserva che GH induce la fosforilazione della proteina IRS-1 attraverso Jak-2 (Ridderstrale et Tornquist, 1996; Carter et al., 1996).

L'attivazione della trasmissione del segnale indotto da PRL avviene attraverso il legame della PRL ad uno specifico recettore di membrana (PRLR). L'associazione ormone-recettore, implica a livello del DNA nucleare, un aumento della trascrizione degli RNA messaggeri corrispondenti agli enzimi caseina e lattosio che devono essere trascritti e tradotti. La proteina Jak-2, è costitutivamente associata al recettore per la prolattina, tale interazione (Jak-2-PRLR) porta all'attivazione delle proteine Stats (Stat-5) con l'attivazione delle proteine Fyn (o anche di Src chinasi), Shc, SOS, Grb2, Ras, Raf (Piccoletti et al., 1994; Das et Vonderhaar, 1996). E' stato anche dimostrato, nell'ambito di studi riguardanti la progressione del carcinoma mammario, che PRL è in grado di attivare oltre al pathway di Stat-5, anche un segnale intracellulare in cui sono coinvolti Ras-Raf-Erk1/2, PI3K-AKT e PCK (Clevenger et al., 2003).

L'ormone lattogeno placentare si lega al recettore del GH e/o della PRL con diversa affinità di legame, ma sembra, inoltre, legare un suo specifico recettore (Neville et al., 2002). Studi di competizione molecolare per l'attività biologica dell'ormone lattogeno placentare, condotti su

fibroblasti fetali ovini, suggeriscono che tale ormone interagisce con un distinto e unico recettore per PL (Freemark et al., 1992; Fowlkes et al., 1993) ed inoltre l'ormone viene internalizzato e riciclato per retroendocitosi senza essere degradato. Dati sul complesso PL-recettore, indicano che il recettore abbia un peso molecolare di circa 108 kDa (Fowlker et al., 1993). Ad oggi non è ancora stato identificato il recettore specifico per l'ormone lattogeno placentare né la via completa di trasduzione del segnale. L'unico dato riportato in letteratura, riporta il coinvolgimento delle proteine Jak/Stat e di altre molecole fosforilate non identificate in cellule di tumore mammario (MCF7) (Takeda et al., 1997).

GH e PRL agiscono sulla divisione β -cellulare attraverso le vie di trasduzione del segnale precedentemente descritte, anche se l'effetto di GH è transitorio rispetto a quello osservato per PRL (Brelje et al., 2004). Studi in vitro hanno evidenziato che PL esercita sull'isola pancreaticata un'azione mitogena più potente di GH o di PRL (Korec, 1993; Bonner et al., 1989). Poiché non è ancora stata descritta la cascata del segnale intracellulare indotta da hPL, coinvolta nel meccanismo, nostro obiettivo è stato quello di analizzare alcune delle molecole attivate nel segnale intracellulare indotto da hPL-A sulla linea cellulare duttale PANC-1.

Abbiamo preso in esame due delle possibili proteine a valle del segnale: Akt e MAP Kinase Erk1 e 2 (p44/42), che agiscono rispettivamente inibendo l'apoptosi e regolando la crescita cellulare ed il differenziamento (Marshall et al., 1995; Hill et Treisman, 1995; Franke et al., 1997).

Materiali e Metodi

Le cellule PANC-1 crescono in aderenza formando un monostrato epitelioide. Il terreno di coltura (DMEM ad alto glucosio contenente 4mM di L-glutamina) è stato addizionato con 1,5 g/L di sodio bicarbonato (NaHCO_3), 10 % di FBS e 100 units/ml penicillina/streptomina e sono state mantenute in coltura a 37°C in presenza del 5 % di CO_2 e 95 % di umidità.

Le cellule PANC-1 sono state seminate in piastre per colture cellulari da 10 cm ad una densità di 2×10^6 /pozzetto e lasciate aderire tutta la notte a 37°C, 5 % di CO_2 e 95 % di umidità nel loro terreno di coltura DMEM ad alto glucosio completo di siero.

Le cellule sono state quindi siero deprivate per una notte ed il terreno è stato addizionato con 0,1 % di BSA e successivamente sono state stimulate con l'ormone hPL-A alla concentrazione di 500 ng/ml per cinque e per quindici minuti.

Dopo questa stimolazione le cellule sono state lavate con tampone di lavaggio, (137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,6, 1 mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , contenente 100 μM $\text{*Na}_3\text{VO}_4$) lisate con tampone di lisi NP-40 pH 7,6 (137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,6, 1 mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 1,5% NP-40, 10 % glicerolo, 2mM EDTA, 2mM *PMSF , 2 mM $\text{*Na}_3\text{VO}_4$, 10 mM *NaPP , 10 mM *NaF , 8 $\mu\text{g/ml}$ *leupeptina), raccolte e trasferite in tubi eppendorf da 1,5 ml, lasciate ad incubare in ghiaccio per 20 min. e centrifugate a 10000 g per 10 min. in centrifuga da banco OLEDICH. La concentrazione delle proteine totali è stata determinata con il metodo Bradford.

I lisati proteici delle cellule PANC-1 (controllo, siero deprivate, stimulate con hPL-A a 5 e 15 minuti) sono stati separati in SDS-PAGE al 10 % e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. I campioni da separare in SDS-PAGE sono stati dapprima bolliti per 5 min. in un tampone di caricamento 1x (Loading Buffer 3x, 3,75 ml upper tris 4x, 1,5 ml 2 β -mercaptoetanolo, 0,9 gr SDS, 3 ml glicerolo, 4 mg blu di bromofenolo, portato a volume finale con 10 ml con H_2O bidistillata) e poi raffreddati in ghiaccio per altri 5 min. prima di essere analizzati in Western-blot.

La separazione elettroforetica delle proteine è stata eseguita per due ore e mezza a temperatura ambiente ad 80 volts costanti.

Il processo di trasferimento è stata eseguito utilizzando il tampone Tris/Glicina (25 mM Tris e 192 mM Glicina) con 20 % di metanolo e dura in media un'ora e mezza applicando agli elettrodi una differenza di potenziale di 100 volts costanti.

Al termine del trasferimento la membrana è stata incubata per un ora in una soluzione di 1x TBS (20 mM Tris base, 137 mM NaCl pH 7,6 con HCl), contenente 0.1% Tween-20 (TBS-T 0,1%) e 5% di latte in polvere privo di grassi per permettere di bloccare i siti di interazione idrofobica. Dopo tre lavaggi in TBS-T 0.1%, la membrana di nitrocellulosa, è stata incubata con gli anticorpi specifici per le proteine Akt fosforilato (Ser 473) e/o Phospho Erk1 e 2 (p44/42) MAP Kinase (Thr 202-tyr 204) a 4°C per tutta la notte con costante agitazione. Si sono eseguiti altri tre lavaggi per 5 min. con TBS-T 0.1% e la membrana è stata ulteriormente incubata in una soluzione contenente come anticorpo secondario un anti-rabbit coniugato con un enzima perossidasi. Le proteine sono state rilevate tramite Chemiluminescenza Enzimatica (ECL).

Per normalizzare il contenuto proteico la membrana è stata incubata in una soluzione di “stripping”, seguendo il protocollo della casa fornitrice e quindi immunoincubata con l’anticorpo primario anti-Akt totale e/o anti- Erk1 e 2 (p44/42) MAP Kinase totale.

*inibitori delle proteasi, utilizzati al momento dell’uso

Risultati

Le proteine estratte dalle cellule PANC-1 di controllo, siero deprivate, e stimulate con hPL-A a tempi di 5 e 15 minuti, sono state analizzate in Western Blot per visualizzare le proteine coinvolte nel segnale intracellulare. Abbiamo preso in esame due delle possibili proteine a valle del segnale: MAPK p44/p42 (Erk-1 e -2) ed AKT. La Figura 19/A e la Figura 19/B mostrano nelle corsie C e D, che lo stimolo indotto da hPL-A nelle cellule PANC-1, coinvolge la via di trasduzione del segnale di MAPK p44-p42 e AKT. In seguito allo stimolo di hPL-A, MAPK p44-p42 e AKT vengono fosforilate a 5 minuti e raggiungono la massima fosforilazione a 15 minuti. Il grado di fosforilazione è nullo nelle cellule di controllo e molto debole in quelle siero deprivate (rispettivamente corsie A e B della Figura 19/A e 19/B).

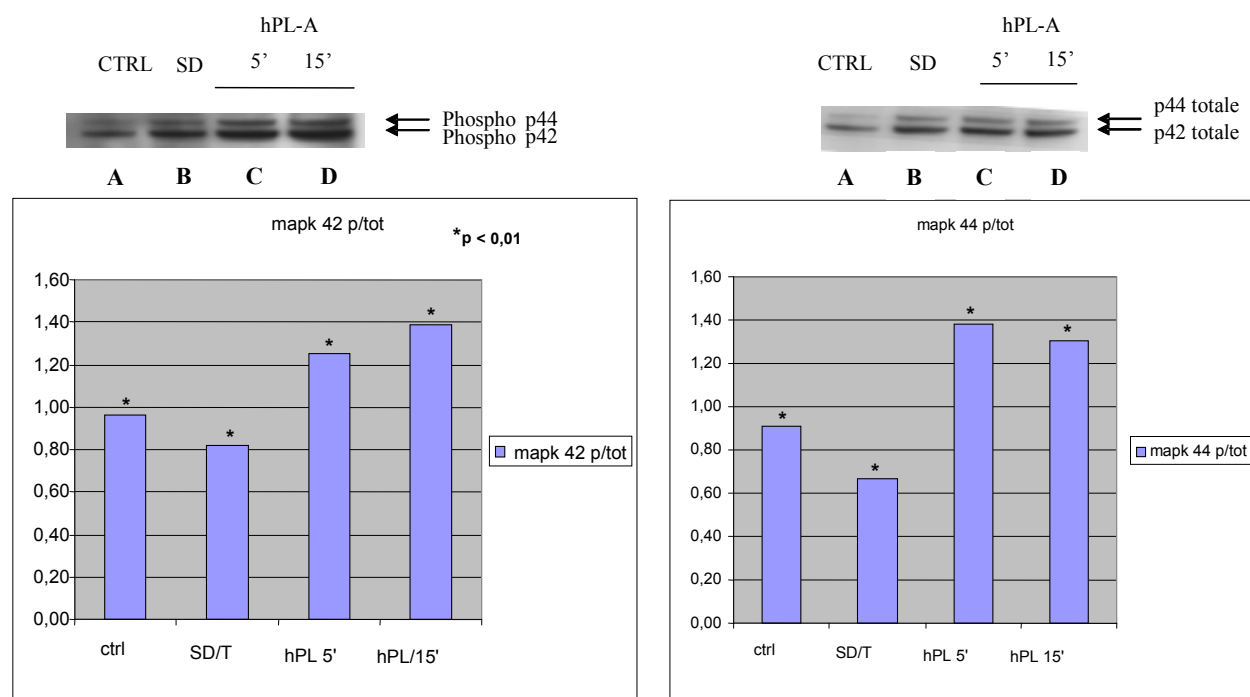


Figura 19/A- Analisi Western blot delle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale indotto da hPL-A nelle cellule PANC-1. 50 µg di proteine estratte dalle cellule PANC-1 cresciute in terreno completo, siero deprivate (SD) e/o stimulate con 500 ng/ml di hPL-A a tempi di 5 e 15 min, sono state separate in SDS-PAGE al 10% e trasferite su membrana di nitrocellulosa. Il grado di fosforilazione di ciascuna proteina è stato analizzato incubando con l'anticorpo anti-fosfo MAPK p44-p42 (Pannello di sinistra). Il contenuto proteico è stato normalizzato incubando con il rispettivi anticorpo totale (Pannello di destra).

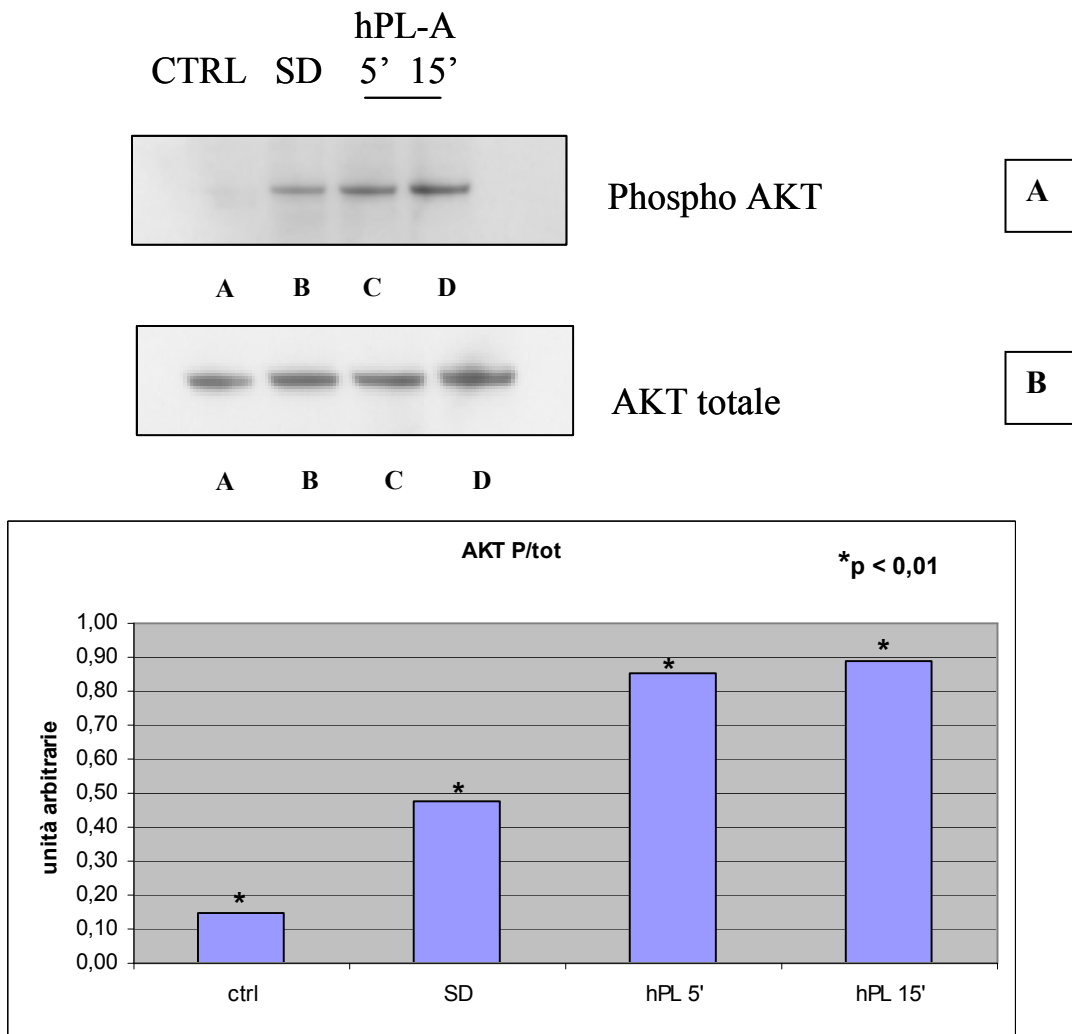


Figura 19/B- *Analisi Western blot delle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale indotto da hPL-A nelle cellule PANC-1. 50 µg di proteine estratte dalle cellule PANC-1 cresciute in terreno completo, siero deprivate (SD) e/o stimulate con 500 ng/ml di hPL-A a tempi di 5 e 15 min, sono state separate in SDS-PAGE al 10% e trasferite su membrana di nitrocellulosa. Il grado di fosforilazione di ciascuna proteina è stato analizzato incubando con l'anticorpo anti-fosfo AKT (Pannello A). Il contenuto proteico è stato normalizzato incubando con il rispettivi anticorpo totale (Pannello B).*

Discussione

Gli ormoni lattogenici (GH, PRL, PL) sono proteine omologhe che si pensa derivino da un comune gene ancestrale (Goffin et al, 1996; Sorenson et Stout, 1995; Sorenson et al, 1997).

Queste tre proteine condividono proprietà biochimiche e strutturali di cui si è già accennato precedentemente. Le proteine PRL e PL trasmettono il loro segnale attraverso il recettore di PRL (PRLR). PRLR ed il recettore di GH (GHR) appartengono alla superfamiglia dei recettori delle citochine ed agiscono attraverso l'attivazione del complesso Jak/Stat (Bole-Feysot et al., 1998). Il ruolo dei lattogeni nella regolazione dell'omeostasi del glucosio è stata studiata per molti anni, ma solo dopo gli anni '60 è stato mostrato il loro effetto direttamente sulle isole pancreatiche. Il GH attiva una cascata di reazioni di traduzione del segnale che sembra coinvolgere alcune molecole note, tra cui: Jak/Stat, IRSs, p85, AKT, MAPK/Erks (Carter et al., 1996). Tuttavia, vi sono alcune differenze di cascata di reazione intracellulare poichè il segnale indotto da GH coinvolge le proteine intracellulari differentemente in base al tipo cellulare in esame (ad esempio epatociti ed adipociti) (Argetsinger et Carter, 1996; Ridderstrale et Torquist, 1996; Darnell, 1994).

Per quanto riguarda il signaling indotto da PRL attraverso il proprio recettore PRLR in letteratura è riportato il coinvolgimento della proteina Jak-2, che risulta costitutivamente associata al recettore per la prolattina. Tale interazione (Jak-2-PRLR) porta all'attivazione delle proteine Stats (Stat-5) con l'attivazione delle proteine Fyn (o anche di Src chinasi), Shc, SOS, Grb2, Ras, Raf (Piccoletti et al., 1994; Das et Vonderhaar, 1996); ma recentemente è stato dimostrato, nell'ambito di studi riguardanti la progressione del carcinoma mammario, che PRL è in grado di attivare oltre al pathway di Stat-5, anche un segnale intracellulare in cui sono coinvolti Ras-Raf-Erk1/2, PI3K-AKT e PCK (Clevenger et al., 2003).

Nel caso specifico di PL, l'unico dato riportato in letteratura, che descrive le proteine coinvolte nel segnale di traduzione, si riferisce all'attivazione, in cellule di tumore mammario umano (linea MCF7), del complesso Jak/Stat e alla fosforilazione di alcune proteine, che però, non sono state identificate (Takeda et al., 1997).

Dallo studio svolto dalla Dott.ssa G. Donadel del laboratorio del Prof. Lauro è stato osservato che lo stimolo indotto da hPL-A sulla cellula beta pancreatica, come quello indotto da hGH e PRL, promuovono l'attivazione delle proteine a valle del segnale Akt e MAPK (ERK-1e-2/p44/42), inducendo l'attivazione del metabolismo, della crescita e della proliferazione (dati in pubblicazione). L'attivazione della proteina Akt da parte hPL-A nelle cellule PANC-1 siero

deprivate può essere indice di inibizione del fenomeno apoptotico, dato che la Dott.ssa Donadel ha dimostrato l'attività antiapoptotica di hPL-A sia su linee cellulari murine e di ratto sia su isole umane utilizzate per il trapianto (dati in pubblicazione). Dati avallati dalla letteratura che descrivono l'inibizione della morte cellulare programmata come evento concomitante alla fosforilazione di Akt (Costoja et al., 1999; Dickson et al., 2004). I risultati ottenuti sulla linea cellulare PANC-1 indicano che l'attivazione della fosforilazione delle proteine Akt e MAPK (ERK-1e-2/p44/42), indotta dallo stimolo di hPL-A, promuove la sopravvivenza cellulare, inibendo il processo apoptotico (Marshall et al., 1995; Hill et Treisman, 1995; Franke et al., 1997) indotto da siero deprivazione. Questi risultati sono confermati dall'osservazione che le cellule differenziate con hPL-A si mantengono vitali oltre le tre settimane, mentre le cellule siero deprivate ma non stimolate con l'ormone vanno incontro a morte.

CAPITOLO IV

hPL-A INDUCE IL DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE DUTTALI IN CELLULE INSULINO-SIMILI

Introduzione

Contrariamente alla vecchia concezione di cellule differenziate terminalmente, le cellule beta pancreatiche possono aumentare la loro numerosità sotto stimolo sia *in vivo* che *in vitro* (Efrat et al., 1996; Sorenson et al., 1997). La loro capacità “staminale” si esprime sia aumentando la replicazione cellulare (proliferando) sia agendo sul differenziamento di popolazioni cellulari differenti in cellule beta (Itkin-Ansari et al., 2004). In tema di differenziamento beta cellulare sono stati proposti diversi modelli: 1) replicazione di cellule beta pre-esistenti, attraverso dedifferenziamento, espansione e redifferenziamento (Dor et al., 2004); 2) differenziamento di cellule staminali/progenitrici presenti nell’epitelio duttale (Gmyr et al., 2001); 3) differenziamento di cellule staminali/progenitrici che non provengono dalle isole di Langerhans, dai dotti e dagli acini; 4) transdifferenziamento di cellule acinari (Weir et Weir, 2005). Negli ultimi anni, gli studi per curare il diabete si sono spostati verso la possibilità di effettuare trapianti di beta cellule negli individui con diabete di tipo 1, ma la scarsità di materiale biologico a disposizione impedisce a questa tecnica di diventare una terapia su larga scala. Al riguardo molteplici laboratori nel mondo hanno indirizzato i loro studi verso: 1) i meccanismi che portano al differenziamento delle beta cellule 2) i fattori di trascrizione che attivano e regolano questo processo differenziativo e, 3) lo sviluppo di metodiche per realizzare cellule beta e/o loro surrogati che siano potenzialmente trapiantabili nei pazienti diabetici (Trucco, 2005). Un gran numero di fattori di crescita hanno mostrato aumentare la proliferazione delle beta cellule, la massa e la loro funzione. Tra i fattori di crescita è noto che l’ormone lattogeno placentare (PL), prodotto dalla placenta, esclusivamente durante la gravidanza, è il fattore principalmente responsabile dell’incremento della massa delle isole pancreatiche e della loro funzione durante la gestazione (Parson et al., 1992; Brelje et al., 1993; Brelje et al., 1997). PL esercita una maggiore attività mitogena sulle cellule beta pancreatiche rispetto all’ormone delle crescita (GH) e alla prolattina (PRL) (Bonner et al., 1989; Korec, 1993). In questa parte di lavoro di tesi, è stato valutato il ruolo biologico dell’ormone hPL-A, (il cui metodo ottimizzato di espressione e purificazione è descritto in questa tesi), sull’espansione ed il differenziamento delle cellule epiteliali del dotto pancreatico

(linea cellulare PANC-1) in cellule esprimenti insulina. Attraverso l'analisi di immunofluorescenza abbiamo seguito la formazione di aggregati simili alle isole pancreatiche e la secrezione di insulina da parte di questi ultimi, nonché l'espressione di marcatori molecolari tipici delle cellule beta (Peptide-c, Glut-2, Pdx-1 ed Insulina).

Materiali e Metodi

Analisi morfologica e di immunofluorescenza

Le cellule PANC-1 crescono in aderenza formando un monostrato epitelioido. Il terreno di coltura (DMEM ad alto glucosio contenente 4mM di L-glutamina) è stato addizionato con 1,5 g/L di sodio bicarbonato (NaHCO_3), 10 % di FBS e 100 units/ml penicillina/streptomina. La suddetta linea è stata mantenuta in coltura a 37°C in presenza del 5 % di CO_2 e 95 % di umidità. Le cellule PANC-1 sono state seminate in piastre per colture cellulari da 150mm alla concentrazione rispettivamente di: controllo (CTRL) $1,5 \times 10^6$; siero deprivato (SD) 4×10^6 ; siero deprivato trattato con hPL-A (SD+hPL-A) 4×10^6 e lasciate aderire per una notte nel loro terreno di coltura a 37°C, 5 % di CO_2 e 95 % di umidità. Le cellule sono state siero deprivato e mantenute in terreno contenente 1% BSA, transferrina (1,1mg/L) e stimolate con hPL-A (500ng/ml) a tempi di 24-48-96 ore. Prima della siero deprivazione, le cellule sono state lavate per due volte con 20 ml di PBS 1x ed esposte a trattamento con lo stesso lotto di tripsina-EDTA 1x diluita al momento dell'uso 1:2 in PBS 1x per 60-120 secondi a temperatura ambiente, controllando al microscopio ottico di aver indotto un parziale distacco delle cellule dalla superficie della piastra di coltura. Al termine del trattamento per l'analisi morfologica le cellule sono state fotografate al microscopio ottico (ingrandimento 20x). Per l'analisi di immunofluorescenza le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti al buio, sono stati eseguiti due lavaggi con PBS 1x e per ultimo un lavaggio in H_2O bidistillata (H_2O dd). Le cellule sono state quindi permeabilizzate con metanolo al 50 % per 5 min. (- 20°C), e si sono quindi effettuati tre lavaggi da 5 min. con PBS 1x. e successivamente si sono delineati gli spots con la pap-pen (è una "penna" specifica per poter delineare delle aree di cellule sulla piastra di coltura, e per poterle poi asservire al microscopio a fluorescenza). Dopo la permeabilizzazione, per ciascun spot, le cellule sono state incubate in Tris-glicina buffer pH 7,5 (25mM Tris-HCl pH 7,5 e 192 mM Glicina) addizionato con 10% di siero della stessa specie in cui veniva isolato l'anticorpo secondario, per un 1 ora a temperatura ambiente. Al termine le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario d'interesse diluito in PBS-T 0.1% (contenente 0.1% Tween-20), in questo caso sono stati utilizzati come anticorpi primari, anti-Insulina umana (diluito 1:100), anti-peptide C umano (diluito 1:100), policlonale anti-Pdx-1 (diluito 1:100), policlonale anti-Glut-2) (diluito 1:100) per tutta la notte a 4°C. Al termine sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS 1x, le cellule sono state incubate con anticorpo secondario, anti-guinea pig per l'insulina coniugato con la

rodamina Red TM (fluorescenza in rosso) (diluito 1:500) e anti-rabbit per Pdx-1, Glut-2 e peptide C, FITC-coniugato (fluorescenza in verde) (diluito 1:1000), per 45 minuti a temperatura ambiente e si è aggiunto il DAPI (per la colorazione dei nuclei). Al termine sono stati eseguiti cinque lavaggi con PBS 1x ed il vetrino copri-oggetto è stato montato mediante MOVIOL, e lasciato asciugare per tutta la notte. Le cellule sono state quindi osservate al microscopio a fluorescenza (Ingrandimento 20X).

Risultati dell' analisi morfologica delle cellule PANC-1 stimulate con hPL-A

La linea cellulare PANC-1 (adenocarcinoma duttale umano) è stata utilizzata come modello sperimentale per questa seconda fase del nostro studio, in cui ci proponiamo di indagare sul ruolo biologico di hPL-A sulla possibilità di differenziare cellule duttali in cellule insulinomimetiche. La Figura 20 mostra i risultati dell'analisi morfologica delle cellule PANC-1 stimulate e non, a tempi diversi, con i fattori di crescita hPL-A per 96 ore.

Le cellule, prima del trattamento, sono state parzialmente distaccate con tripsina e quindi le cellule di controllo sono state addizionate del terreno completo; ai restanti campioni è stato addizionato il terreno privo di siero in cui era presente transferrina (aiuta l'aggregazione cellulare) e/o il fattore di crescita hPL-A.

Il Pannello A mostra che la morfologia delle cellule PANC-1 di controllo, non trattate con i fattori di crescita, è di tipo epiteliale con cellule molto grandi. Nel Pannello B è mostrata la morfologia delle cellule cresciute in terreno terreno privo di siero addizionato con transferrina e si osserva che le cellule mantengono un aspetto generalmente di tipo epiteliale ma più insulare rispetto al campione di controllo. Le cellule cresciute in terreno siero deprivato con transferrina addizionato con hPL-A mostrano uno spiccato fenomeno di aggregazione con cellule più tondeggianti che formano degli aggregati simili alle isole pancreatiche (Pannello C).

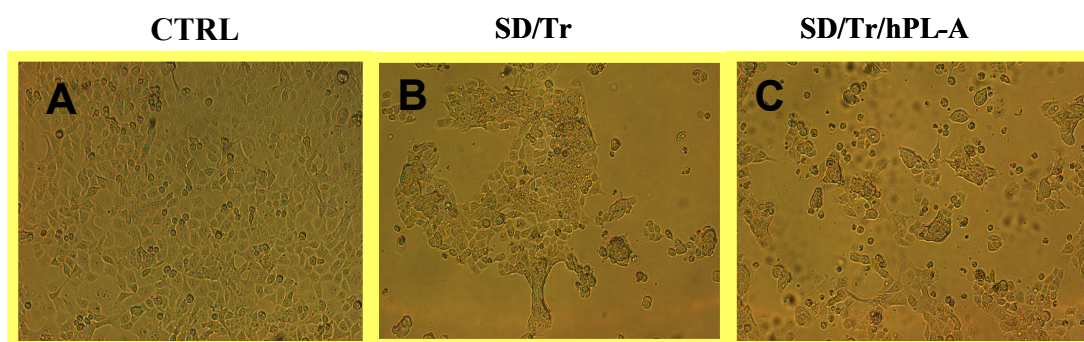


Figura 20 - Analisi Morfologica delle cellule PANC-1 stimulate con hPL-A .

Le cellule PANC-1 sono state seminate in piastre da 150 mm rispettivamente alle concentrazioni: controllo (CTRL) $1,5 \times 10^6$; siero deprivato (SD) 4×10^6 ; siero deprivato trattato con hPL-A (SD+hPL-A) 4×10^6 , lasciate aderire per una notte, sottoposte ad un breve trattamento con tripsina (30-60 sec.). E' stato, quindi, addizionato per 96 ore terreno completo nelle cellule di controllo (Pannello A); terreno siero deprivato con 0,1% BSA e Transferrina (SD/Tr) (Pannello B); terreno siero deprivato con 0,1% BSA/Transferrina/500ng/ml hPL-A (Pannello C).

Risultati dell'analisi di Immunofluorescenza di cellule PANC-1 stimulate con hPL-A

L'analisi morfologica mostra che le cellule PANC-1 trattate con hPL-A modificano la loro morfologia da un tipo epitelioide a cellule con un aspetto tondeggianti che crescono in aggregati molto simili alle isole pancreatiche.

L'analisi di immunofluorescenza mostra che questo cambiamento morfologico si associa al differenziamento delle cellule duttali in cellule che sintetizzano proteine e fattori del differenziamento specifici per le cellule beta pancreatiche, come illustrato in Figura 21.

Nella corsia riferita alle cellule PANC-1 di controllo si osserva che i nuclei, in blu, sono distribuiti uniformemente e le cellule non mostrano positività per nessuna delle proteine specifiche per le cellule beta: Insulina, Peptide-C, Glut-2 e Pdx-1 (Figura 21 A, D, G ed L).

Le cellule PANC-1 trattate con tripsina e addizionate con terreno siero deprivato con transferrina, non mostrano una crescita uniforme a monostato, come le cellule di controllo, altresì formano degli aggregati cellulari, simili ad isolotti, che non esprimono i marcatori specifici per la cellula beta pancreatica (Figura 21 E, H ed M). Solo l'insulina viene debolmente espressa (Figura 21 B).

Le stesse cellule mantenute per 96 ore nel terreno delle cellule siero deprivate addizionato con il fattore di crescita hPL-A mostrano la formazione di aggregati cellulari tondeggianti di varie dimensioni, le cui cellule esprimono Insulina (Figura 21 C), Peptide-C (Figura 21 F), Glut-2 (Figura 21 I) ed infine il fattore di trascrizione Pdx-1 (Figura 21 N).

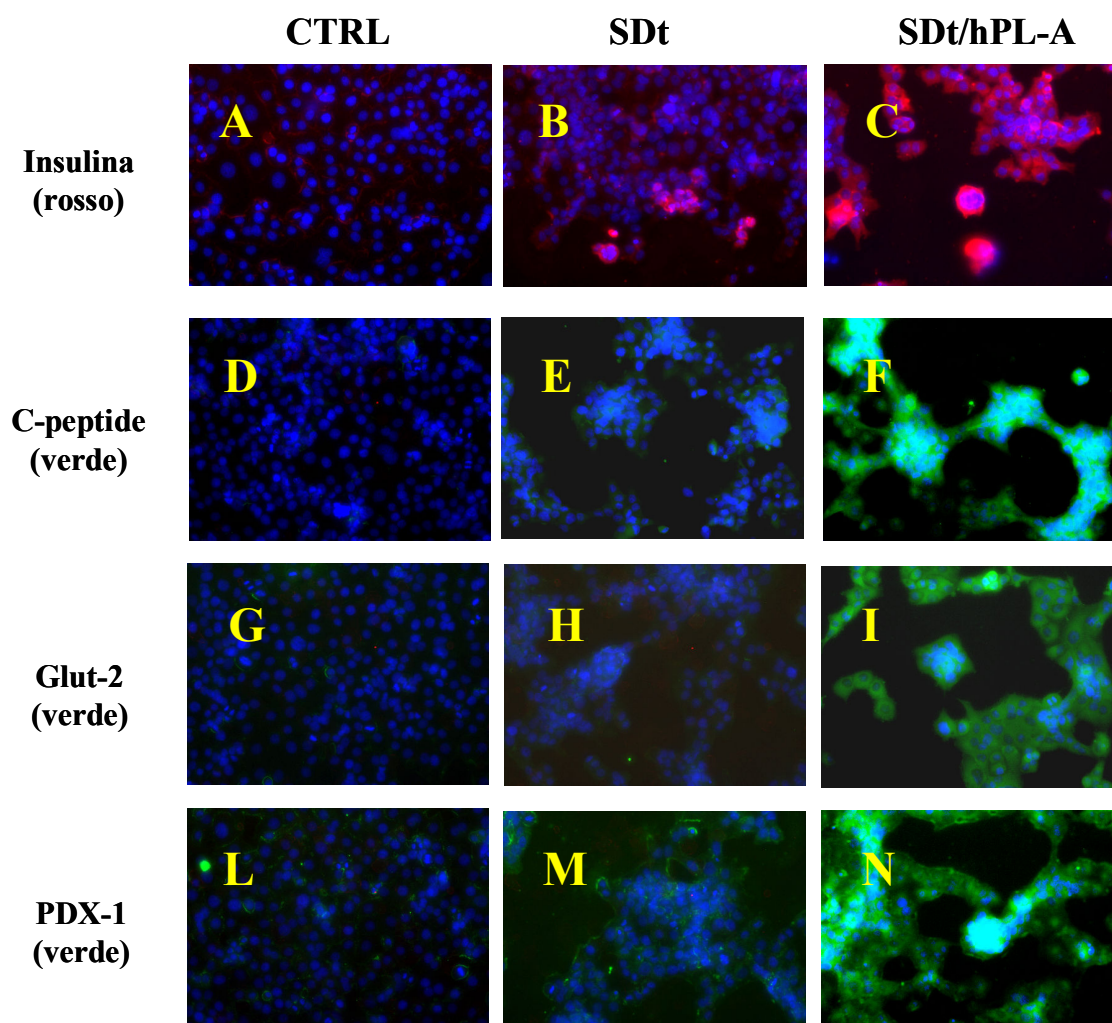


Figura 21 - Analisi di Immunofluorescenza di cellule PANC-1 stimulate con hPL-A.

Le cellule PANC-1 sono state seminate in piastre da 150 mm rispettivamente alle concentrazioni: controllo (CTRL) $1,5 \times 10^6$; siero deprivate (SDt) 4×10^6 ; siero deprivate trattate con hPL-A (SDt/hPL-A) 4×10^6 , lasciate aderire per una notte, sottoposte ad un breve trattamento con tripsina (30-60 sec.). Quindi è stato addizionato terreno siero deprivato con 0,1% BSA, Transferrina e 500ng/ml hPL-A per 96 ore. Le cellule sono state fissate in 4% Paraformaldeide, permeabilizzate con Metanolo 50% e, quindi, incubate con il rispettivo anticorpo primario: anti-Insulina (Pannelli A, B, C); anti-peptide C (Pannelli D, E, F); anti-Glut-2 (Pannelli G, H, I); anti-Pdx-1 (Pannelli L, M, N). I nuclei sono evidenziati in blu (colorazione DAPI) Ingrandimento 20X .

Discussione

La perdita di beta cellule pancreatiche, associata al diabete di tipo I e alle fasi avanzate del diabete di tipo II, non è compensata da una massiva “neogenesi” delle isole pancreatiche .

Attualmente l'unico trattamento su larga scala per il diabete è la somministrazione di insulina ed analoghi (Writing team for the Diabetes Control, 2003). Dal 1970 il trapianto d'organo è ormai praticato da molti centri in tutto il mondo e dal 1990 è in attivo anche il trapianto delle isole (Shapiro et al., 2000; Robertson, 2004).

Tuttavia, il tessuto pancreatico a disposizione da trapiantare e, ancor meno, il numero di organi pancreatici da cui purificare le isole per il trapianto è estremamente esiguo e non è sufficiente rispetto alla richiesta clinica.

Per questa ragione la ricerca si è indirizzata verso strategie alternative molto promettenti per generare beta cellule funzionali da utilizzare nel trapianto.

Queste nuove metodiche includono l'espansione di cellule beta pre-esistenti, il differenziamento di cellule embrionali staminali (ES) in cellule beta, la conversione di progenitori staminali adulti pancreatici e non in cellule beta (Trucco, 2000).

Sulla base dei dati riportati in letteratura è stato sviluppato un protocollo sperimentale innovativo per differenziare le cellule duttali in cellule esprimenti insulina con formazione di aggregati simili alle isole pancreatiche.

I risultati di questo lavoro di tesi ha dimostrato che in presenza di hPL-A le cellule duttali umane PANC-1 (derivate da un adeno-carcinoma) si trasformano da cellule di tipo epitelioide in cellule tondeggianti che formano aggregati cellulari attenuando alcune caratteristiche replicative delle cellule di partenza. La linea cellulare PANC-1 (adenocarcinoma umano pancreatico) è l'unico modello disponibile in vitro, in quanto l'alternativa è la purificazione delle cellule duttali da isole umane utilizzate per il trapianto. La carenza di materiale a disposizione e i tempi di attesa molto lunghi per reperire questo materiale, hanno reso necessario l'utilizzo della linea umana tumorale PANC-1.

Gli aggregati cellulari neoformati in seguito al trattamento ormonale sono stati mantenuti in coltura anche per più di due settimane nella stessa piastra di crescita.

Queste cellule, hanno poi espresso i marcatori tipici della beta-cellula: Pdx-1, GLUT-2, Insulina e Peptide-C.

Dati presenti in letteratura hanno indicato che l'espressione del fattore di trascrizione PDX-1 sembra fondamentale per regolare il processo differenziativo che porta alla formazione di cellule beta pancreatiche.

Come tale viene utilizzato come marcatore del differenziamento beta cellulare.

L'espressione di PDX-1, testata su due differenti linee cellulari duttali le cellule ARIP, provenienti dall'epitelio duttale pancreatico murino, e PANC-1, provenienti da quello umano, ha dimostrato che le ARIP, a differenza delle PANC-1, esprimono spontaneamente PDX-1. Se le ARIP vengono stimulate da 10nM/L di GLP-1 (Glucagon like peptide 1), cominciano a formare strutture simili ad isole di Langerhans e risultano positive alla presenza di mRNA per insulina ed altri geni specifici delle cellule beta (per es. GLUT2), quindi portano a compimento il differenziamento in cellule beta. Le PANC-1 diventano responsive a GLP1 e portano avanti questo processo differenziativo solo se trasfettate stabilmente con PDX-1.

Questo dimostra che queste cellule duttali, attraverso lo stimolo di GLP-1, possono differenziarsi in cellule beta, ma solo se esprimono PDX-1 (Perfetti et Hui, 2001).

Quindi, sulla base dei risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, hPL-A potrebbe essere un valido candidato per il trattamento sistemico prima e durante il trapianto delle isole pancreatiche, favorendo l'omeostasi ed il funzionamento dell'isola. Il trattamento combinato di hPL-A con altri fattori di crescita (ad esempio FGF e GLP-1) potrebbe ottimizzare un eventuale protocollo di produzione di beta cellule *ex vivo* utilizzabili nel trapianto di soggetti diabetici. Infatti, uno sviluppo futuro di questo studio sarà indirizzato allo studio di protocolli di espansione/differenziamento di cellule beta utilizzando combinazioni di fattori morfogenetici.

CAPITOLO V

ANALISI PROTEOMICA DELLE CELLULE PANC-1 DIFFERENZIATE IN CELLULE ESPRIMENTI INSULINA

Introduzione

Il diabete di tipo 1 è la conseguenza di un attacco di tipo autoimmune contro le beta cellule del pancreas endocrino responsabili della produzione d'insulina (Casella et Taglietti, 1998).

L'attuale terapia del diabete di tipo 1 si basa su iniezioni sottocutanee d'insulina derivata da DNA ricombinante.

Sebbene recentemente sia stato dimostrato che i trapianti d'isole pancreatiche possono essere eseguiti con grandi probabilità di successo rispetto ad alcuni anni fa, le limitazioni sono ancora troppo numerose (come, ad esempio la scarsità di materiale biologico) per permettere una vasta applicazione di questa procedura come cura definitiva del diabete.

Molteplici laboratori nel mondo hanno sviluppato tecniche e approfondito studi per realizzare beta cellule e/o loro surrogati che siano potenzialmente trapiantabili nei pazienti diabetici.

Diversi studi hanno suggerito che le cellule beta nell'adulto possono originare da cellule del dotto pancreatico o da cellule associate al dotto (Bonner-Weir et al., 1989; Bonner-Weir et al., 2000), anche se i meccanismi che regolano questo processo non sono ancora pienamente conosciuti.

Nell'ambito di questi molteplici studi rivolti all'analisi dei meccanismi che governano la proliferazione e la crescita della beta cellula in condizioni fisiologiche e patologiche, l'interesse di questo studio è stato quello di analizzare gli effetti metabolici e differenziativi indotti dall'ormone lattogeno placentare umano (hPL) su cellule del dotto pancreatico (PANC-1).

E' noto che il differenziamento delle cellule del dotto pancreatico in beta-cellule coinvolge fattori di crescita (HGF, KGF, PTHrP, GH, PRL, PL, IGF-1 e -2, GLP-1, FGF), fattori di trascrizione specifici per la beta cellula pancreatico (Isl-1, Pdx-1, PAX-4 e -6, neurogenina-3) e molecole che regolano il segnale ed il ciclo cellulare (IRS-1, e -2, AKT, cdk4, Bcl-2, Bclx (L) (Vasavada et al; 2005).

L'obiettivo della seguente parte della tesi è stato quello di valutare, attraverso l'analisi proteomica, le proteine differenzialmente espresse durante il differenziamento delle cellule PANC-1 in cellule esponenti insulina.

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando sia una metodica di elettroforesi bidimensionale "classica" con successiva colorazione argentea (2D-Gel), sia tramite la tecnica Ettan™ DIGE (Differential Gel Electrophoresis).

Gli "spot" proteici di nostro interesse sono stati escissi dal gel e sottoposti a digestione triplice (Shevchenko et al., 1996), per la successiva identificazione tramite Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF) (Karas et al., 1988; Killenkamp et al., 1991) e/o Capillary Liquid Chromatography accoppiata ad Electrospray Ion Trap Tandem Mass Spectrometry (cLC-ESI-IT MS/MS) (Fenn et al., 1989).

Materiali e Metodi

Preparazione del campione e Focalizzazione isoelettrica (Prima Dimensione)

Le cellule PANC-1 di controllo, siero deprivate, e trattate con hPL-A, secondo il protocollo descritto per l'analisi di immunofluorescenza, sono state lisate alle 96 ore in 500 μ L di un tampone di lisi costituito da TRIS 30 mM pH 8,5 /UREA 7M/ THIOUREA 2 M/CHAPS 4%, a cui sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi 1X (Protease Inhibitor Mix).

Prima di essere lisate, le cellule sono state lavate per 3 volte con 20 ml di PBS 1x, mentre erano tenute in ghiaccio. L'estratto proteico di ogni campione è stato quindi sonicato in ghiaccio, con un sonicatore ad intermittenza (30 impulsi di lieve intensità per tre volte), per disgregare contaminanti come il DNA ed aggregati lipidici.

Quindi la sospensione è stata chiarificata mediante centrifugazione a 14000 rpm, a 4°C° per 15 minuti in una centrifuga Eppendorf.

Il sovrinatante di ogni campione è stato precipitato mediante 2D- Clean-Up kit, per eliminare sali ed altri contaminanti che potevano interferire con la prima dimensione, ed il pellet risultante è stato risospeso in un volume di 100 μ L di TRIS 30 mM pH 8,5 UREA 7M, THIOUREA 2 M, CHAPS 4%.

La determinazione della concentrazione proteica dei lisati è stata effettuata secondo la procedura del 2D Quant-Kit e la lettura dell'assorbanza è stata eseguita ad una lunghezza d'onda di 480nm.

Per ogni campione sono stati prelevati 200 μ g, ai quali è stato aggiunto lo stesso volume corrispondente di una soluzione contenente UREA 7M, THIOUREA 2 M, CHAPS 4%, con il 2% di anfoline a pH 3-11NL (Pharmalyte) (uguale range di pH delle strips che abbiamo utilizzato per la prima dimensione) ed il 2% di DTT.

I campioni così preparati per la focalizzazione isoelettrica, sono stati lasciati 10 minuti in ghiaccio, prima di essere caricati sulle strips.

Le strips di acrilammide, da 18 cm pH 3-11NL (Amersham), sono state reidratate passivamente per almeno 12 ore con 350 μ L di soluzione di reidratazione (DeStreak Rehydration Solution) a cui sono stati aggiunti lo 0,5% di anfoline a pH 3-11NL (Pharmalyte). Per i campioni abbiamo eseguito la isoelettrofocalizzazione su Strips di 18 cm pH 3-11 NL, in triplicati biologici e sperimentali, utilizzando il sistema di caricamento "Cup-Loading" e l'apparato Ettan IPGPhor 2 Isoelectric Focusing Unit.

Il protocollo di isoelettrofocalizzazione (IEF), che avviene a 20C° con un limite di corrente di 50 µA per strip, prevede le seguenti fasi:

Step 1: 300V 3 h

Step 2: 1000V 6h gradiente

Step 3: 8000V 3h gradiente

Step 4: 8000 V 4h

Step 5: 8000V fino al raggiungimento delle 50000Vhrs totali.

Al termine della isoelettrofocalizzazione le strips sono state equilibrate per 15 minuti in una soluzione di equilibratura TRIS 100 mM, UREA 6M, Glicerolo 30% (v/v), SDS 2% (p/v) contenente lo 0,5% DTT e per i successivi 15 minuti nella stessa soluzione di equilibratura contenente il 4,5% di iodoacetammide.

Elettroforesi bidimensionale classica: 2D-Gel

Le proteine sono state analizzate in seconda dimensione su gel di poliacrilammide/SDS 18x20 cm al 12,5% utilizzando l'apparato ETTAN-DALT-TWELVE, applicando 2W ad ogni gel, per 16 ore a 25C°. Le proteine sono state rivelate attraverso colorazione con sali d'argento (Silver Stain) (Tabella 2), compatibile per la successiva identificazione delle proteine tramite spettrometria di massa. Il confronto è stato effettuato tra le le proteine espresse dalle cellule PANC-1 di controllo, siero deprivate e trattate con h-PL (96 h).

Fixing	Metanolo (45%) acido acetico (5%) ddH ₂ O (50%) per 30 minuti
Lavaggi	2 lavaggi 30 minuti ognuno in AgNO ₃ in leggera agitazione. Il gel è quindi lasciato per 12 ore in ddH ₂ O in leggera agitazione.
Sensibilizzazione	Incubazione per 1 minuto del gel con 0.02% (p/v) sodio tiosolfato in ddH ₂ O
Lavaggi	2 lavaggi in ddH ₂ O da 1 minuto in leggera agitazione
Soluzione AgNO₃	Incubazione del gel con 1% AgNO ₃ (0.5 gr AgNO ₃ in 0.5 lt ddH ₂ O) per 30 minuti a 4C°
Lavaggi	2 lavaggi in ddH ₂ O da 1 minuto in leggera agitazione
Soluzione sviluppo	Incubazione del gel con 0.04% (v/v) formaldeide, 2% (p/v) sodio carbonato in ddH ₂ O, finchè gli spot risultano visibili. (circa 3-5 minuti)
Soluzione stop	1% acido acetico in ddH ₂ O
Soluzione per conservare i gels	1% acido acetico in ddH ₂ O a 4C°

ddH₂O= acqua bidistillata.

Tabella 2 - Protocollo colorazione con sali d'argento.

Digestione triptica delle proteine

Gli “spot” proteici di nostro interesse sono stati escissi dal gel, posti in Eppendorf da 500 µl ed incubati sequenzialmente con 100 µl di Acetonitrile al 50% in acqua per 5 minuti; 100 µl di Acetonitrile puro per 5 minuti; 100µl di 0,1M NH_4HCO_3 per 5 minuti ; 100 µl di Acetonitrile puro per 5 minuti e quindi incubati per 45 minuti a 4°C in presenza di tripsina 12.5ng/µl in 50mM NH_4HCO_3 .

Quindi la soluzione triptica è stata sostituita con circa 50µl di 50mM NH_4HCO_3 (senza tripsina) ed i frammenti di gel sono stati incubati per tutta la notte a 37°C.

Dopo la digestione triptica notturna il supernatante è stato recuperato ed i rimanenti peptidi sono stato estratti dai frammenti di gel incubando in 50 µl di acido formico al 5% diluito in acqua, per 15 minuti a 37°C.

I supernatanti contenenti i peptidi provenienti dalle varie incubazioni sono stati riuniti ed essiccati in un concentratore a vuoto (Speedvac).

I peptidi sono stati risospesi in 0,5% acido acetico e sottoposti a desalificazione tramite cromatografia a scambio ionico a fase inversa (μC_{18} ZipTip) prima dell'identificatificazione tramite spettrometria di massa Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF) e/o Capillary Liquid Chromatography accoppiata ad Electrospray Ion Trap Tandem Mass Spectrometry (cLC-ESI-IT MS/MS).

La spettrometria di massa

La spettrometria di massa, è una tecnica analitica che permette di analizzare qualsiasi campione purchè risponda a due requisiti: sia facilmente ionizzabile e sia possibile portarlo in fase gassosa. Tale tecnica separa gli ioni in base al loro rapporto massa su carica (m/z) per cui, dal momento che ogni molecola possiede una massa, questa tecnica è universale e viene attualmente applicata in diversi campi molto diversi fra di loro, che vanno dal controllo delle adulterazioni alimentari, all'analisi delle benzine, allo studio farmacocinetico, all'analisi biochimica. Il risultato finale di un'analisi in spettrometria di massa, è uno spettro di massa che è un diagramma in cui lungo l'asse delle ascisse sono riportati i valori di m/z (massa/carica) e sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di corrente ionica o assoluti o relativi. La tecnica di spettrometria di massa viene utilizzata sia per ottenere un'analisi qualitativa, ossia per l'identificazione di un composto incognito, sia per analisi quantitative, ossia per i dosaggi di composti noti.

Uno spettrometro di massa è costituito da cinque parti fondamentali: sistema d'introduzione del campione (sorgente), analizzatore, rivelatore, computer e sistema di pompe da vuoto.

Nella Fig. 22 è mostrato lo schema a blocchi che rappresenta, in linea di principio, lo schema generale adattabile a qualsiasi tipo di spettrometro di massa.

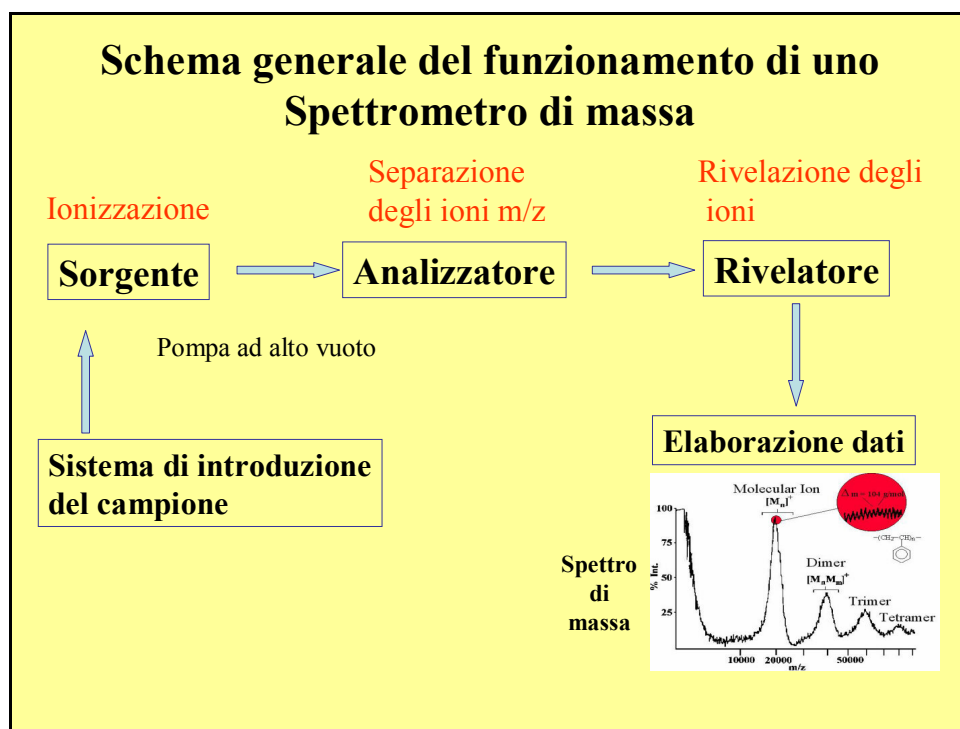


Fig. 22 - Sistema per analisi di spettrometria di massa.
 Schema rappresentativo delle componenti per uno spettrometro di massa

Tutti gli spettrometri di massa, lavorano in condizioni di alto vuoto che varia, a seconda degli strumenti, da $1 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-7}$ Torr.

Il vuoto all'interno della sorgente è necessario per permettere alle molecole in fase gassosa, una volta ionizzate, di giungere al rivelatore senza andare incontro ad urti con altre molecole gassose che potrebbero fornirgli energia vibrazionale sufficiente a far avvenire delle reazioni di frammentazione indesiderate. Il sistema ad alto vuoto è ottenuto mediante pompe rotative e, per sistemi in cui è richiesto un vuoto molto spinto, da pompe rotative e turbomolecolari. Nello schema riportato si può notare come l'alto vuoto comprenda tutta la zona che va dalla sorgente al rivelatore.

I campioni possono essere introdotti negli stati solido, liquido e gassoso. Nel caso siano solidi o liquidi devono essere resi volatili prima o durante la ionizzazione.

Le tecniche di ionizzazione che si sono rivelate più adatte allo studio di molecole termolabili come proteine e peptidi sono state quelle a bombardamento con atomi veloci (FAB), per desorbimento con laser assistito da matrice (MALDI), o mediante electrospray (ESI).

Una volta che si sono formati gli ioni essi possono essere accelerati, focalizzati o fatti risuonare tramite campi elettrici e magnetici.

L'analizzatore ha il compito di separare gli ioni (cationi e radical cationi) sulla base del loro rapporto massa su carica. I più comuni sono l'analizzatore a quadrupolo, a trappola ionica, a risonanza ionica elettronica in trasformata di Fourier (FT-ICR) e a tempo di volo (Time of Flight, TOF).

Identificazione MALDI-TOF delle proteine

La tecnica MALDI-TOF permette la ionizzazione di molecole termolabili anche molto grandi e il loro passaggio in fase gassosa fenomeno noto come desorbimento. I campioni (analiti) sono immersi in una matrice cristallina, che nel nostro caso era acido alfa-ciano-4-idrossi-cinnamico per miscele peptidiche oppure acido sinapinico per proteine intatte. Mediante un impulso laser si colpisce la miscela matrice-analita, le molecole di matrice trasferiscono energia ed un protone alle molecole di analita, permettendone il desorbimento e la ionizzazione.

L'analizzatore a tempo di volo (TOF) separa gli ioni in virtù del tempo da essi impiegato per percorrere una distanza nota e può essere utilizzato in modalità lineare a bassa accuratezza per l'analisi di proteine intatte (con peso molecolare superiore a 10.000Da) o in modalità reflectron per peptidi a basso peso molecolare (compreso fra i 700 e i 5000 Da).

In questo caso l'elevata accuratezza delle misure sperimentali, nell'ordine delle centinaia di ppm, consente l'identificazione delle proteine mediante la strategia del Peptide Mass Fingerprint (PMF).

Tale strategia si basa sull'interpretazione degli spettri peptidici della proteina incognita che vengono confrontati con quelli di proteine note presenti nei banche dati.

Lo spettro di massa è caratterizzato da una serie di picchi a cui corrispondono determinati valori di m/z . La rivelazione dei picchi è eseguita dopo calibrazione dello spettro di massa con standard interni.

Le masse dei peptidi di autoproteolisi della tripsina sono utilizzati per la calibrazione interna ma omessi nella ricerca nella banca dati.

La lista delle masse peptidiche determinate sperimentalmente è comparata con la lista delle masse peptidiche prodotte virtualmente per ogni proteina presente nella banca dati mediante software di ricerca specializzati (Mascot, DeepView, Protein Prospector, etc.) che infine associano un punteggio (score) ad ogni identificazione.

La conferma dell'avvenuta identificazione avviene quando tale punteggio, che misura la corrispondenza statistica fra i valori sperimentali ed i valori teorici, supera il valore soglia convenzionalmente riconosciuto.

Lo strumento utilizzato è stato lo spettrometro di massa Voyager DE sSTR (Applied Biosystems, USA) e l'identificazione delle proteine è stata effettuata tramite l'analisi delle sequenze aminoacidiche non ridondanti riportate nella banca dati nrNCBI attraverso l'uso del motore di ricerca Mascot (UK)*.

*(http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view).

Identificazione LC MS/MS di proteine

La tecnica LC MS/MS permette la separazione la miscela dei peptidi mediante cromatografia liquida e la ionizzazione dell'analita avviene tramite elettro-nebulizzazione (ESI, Electrospray Ionization).

Gli ioni si formano da soluzioni finemente nebulizzate attraverso un ago ad alto potenziale elettrico. Gli ioni dell'analita vengono volatilizzati in seguito alla rimozione del solvente per evaporazione.

Nell'analisi massa/massa (ms/ms) uno ione avente un determinato rapporto massa/carica (m/z) può essere selezionato tra quelli contenuti in una trappola ionica (analizzatore) nel primo stadio di analisi di massa.

L'accoppiamento di due stadi di massa (ms/ms o massa tandem) è utile per avere informazioni sulla sequenza amminoacidica della proteina.

Questo ione precursore viene quindi frammentato ed analizzato in un secondo stadio di analisi di massa.

La frammentazione di un peptide è un fenomeno competitivo principalmente a carico dei legami peptidici e che porta alla produzione di una miscela di frammenti che possono essere registrati tutti contemporaneamente all'interno di un singolo spettro di massa.

Il risultato è che i segnali dei frammenti differiscono l'uno dall'altro per un singolo amminoacido e questo consente di risalire alla sequenza amminoacidica del peptide selezionato.

L'identificazione della proteina viene quindi eseguita tramite confronto con peptidi di sequenza nota contenuti nelle banche dati.

Lo strumento utilizzato è stato lo spettrometro di massa LCQ Deca XP Plus (ThermoFinnigan, USA) equipaggiato con una sorgente micro-electrospray connessa ad una microcolonna C18 column (100 mm × 0.10 mm) impaccata manualmente.

I dati sono stati elaborati tramite il software TurboSequest fornito dalla casa produttrice.

Le proteine candidate con un valore di Xcorr >2.5 sono state considerate identificate con un'alta confidenza.

Tecnica Differences Gel Electrophoresis (Ettan™ DIGE) per l'analisi di proteine

Introduzione alla Tecnica Ettan™ DIGE

Oltre all'analisi bidimensionale classica (2D Gel), descritta precedentemente, abbiamo utilizzato la tecnica Ettan™ DIGE.

La tecnica Ettan™ DIGE, si avvale dell'uso di marcatori fluorescenti, che legano covalentemente le proteine prima dell'isoelettrofocalizzazione.

I marcatori utilizzati sono molecole della famiglia delle Cianine (Cydye2, Cydye3, Cydye5) che si legano al gruppo amminico della lisina, nel carbonio epsilon, attraverso una procedura definita "minimal labelling".

L'analisi di tre campioni diversi viene eseguita marcando ciascun campione con una diversa cianina. La quantità di fluorescente usata è tale da marcare circa il 3% di ciascuna specie proteica, che avrà un'unica marcatura su un'unica lisina. Ciò è possibile, ed ampiamente verificato, in quanto la quantità di fluorescente è minima rispetto alle molecole proteiche presenti nel campione.

I tre campioni, ciascuno contenente la stessa quantità di proteina (50 µg per campione), vengono trattati con un agente riducente che taglia i ponti disolfuro delle cistine, dando luogo alla forma ridotta (cisteine), quindi uniti tra di loro e depositati ed analizzati in isoelettrofocalizzazione.

Le proteine marcate non cambiano il loro punto isoelettrico rispetto al 97% delle proteine libere, e mostrano un leggero rallentamento in SDS/PAGE dovuto all'apporto di circa 450 Daltons del fluorocromo addizionato.

Successivamente, le proteine marcate con i tre fluorocromi vengono rilevate attraverso l'eccitazione con tre diverse sorgenti laser: 488 nm, 532 nm e 633 nm, eccitando rispettivamente Cy2, Cy3 ed Cy5.

I segnali di emissione di questi tre fluorocromi sono molto distinti fra di loro, per cui possono essere catturati dai sistemi ottici dello strumento e trasformati in un segnale di intensità.

Il programma utilizzato successivamente è in grado di acquisire i dati del segnale fluorescente provenienti dai tre campioni.

Attraverso la rilevazione simultanea dei tre segnali (Co-detection) il programma di analisi elabora i dati raccolti permettendo di individuare ed appaiare tutte le proteine presenti nei campioni mettendone in evidenza anche minime differenze di espressione (inferiori al 10%).

Per ogni gel due diversi campioni vengono generalmente confrontati tra di loro e con uno "standard interno". Lo standard interno può essere un controllo, oppure un campione prodotto dalla miscela dei campioni nell'ambito dello stesso esperimento.

Supponendo di dover analizzare 10 campioni, lo standard interno si può ottenere prendendo una identica quantità di proteina da ciascun campione e mescolando le aliquote tra di loro.

In questo "campione" saranno rappresentate tutte le proteine di tutti e 10 campioni. I vantaggi che può offrire lo standard interno sono evidenti: 1) possibilità di identificare con grandissima sicurezza le variazioni di espressione delle proteine da eventuali errori sperimentali e 2) possibilità di "normalizzare" gli standard interni con conseguente riduzione del numero di ripetizioni delle analisi elettroforetiche.

Oltre all'analisi del singolo gel, il programma usato permette anche un'analisi di tipo statistico nell'ambito di uno stesso esperimento.

Attraverso la normalizzazione degli standard interni è possibile avere un'analisi completa sulla variazione dell'espressione di tutte le proteine in tutti i campioni.

Saggi di controllo: labelling efficiency e same same same

Prima di condurre un esperimento DIGE si effettuano due saggi di controllo: il "labelling efficiency" ed il "same same same".

Labelling efficiency

Per valutare l'efficienza di marcatura del campione con uno dei tre fluorofori sono state eseguite per 30 minuti, a 4C°, le seguenti reazioni di marcatura:

- 50 µg di estratto proteico totale di cellule PANC-1 di controllo (CTRL) è stato incubato con 400pmol Cydye Cy5.
- 50 µg di estratto proteico di E.Coli utilizzato come controllo, è stato incubato con 400 pmol di Cydye5.

Le reazioni di marcatura sono state bloccate con L-lisina 10 mM per 10 minuti a 4C° al buio.

Le miscele proteiche sono state frazionate su un gel di poliacrilammide/SDS 10% in quantità decrescenti: 25µg, 12.5µg, 6.25µg. Il gel è stato acquisito mediante il programma DeCyder e processato mediante il programma Image Quant.

Per determinare l'efficienza della marcatura, il volume di fluorescenza relativo al canale del campione in esame è stato rapportato al volume del canale del campione controllo, caricato nella stessa quantità.

Sono considerate nella norma variazioni dal 50 al 200%, e poiché abbiamo avuto un risultato pari al 110%, abbiamo considerato l'efficienza di labelling nella norma, e abbiamo proceduto con il same same same.

Same-same-same

Questo saggio viene effettuato per escludere la marcatura preferenziale dell'estratto proteico con uno dei tre fluorofori (Cydye2, Cydye3, Cydye5) utilizzati nell'esperimento DIGE.

A tale scopo tre aliquote da 50 µg ognuna di PANC-1 di controllo sono state marcate con 400 pmol di ogni fluoroforo, con la modalità descritta per il "labelling efficiency".

I tre campioni sono stati riuniti e sono stati sottoposti a focalizzazione isoelettrica su una strip da 18 cm 3-11 NL e successiva elettroforesi bidimensionale, con gli stessi metodi descritti a pag. 78-79 e l'immagine del gel è stata acquisita e processata mediante il programma De Cyder.

E' stata quindi calcolata la variazione tra l'abbondanza relativa nelle tre immagini ottenute. Poiché l'esperimento è stato allestito con lo stesso campione, i rapporti tra l'abbondanza relativa ($R=Volume1/Volume2$) dovrebbero essere pari ad 1.

Il valore trovato, 1.15, è stato utilizzato come limite inferiore nell'esperimento comparativo, al di sotto del quale la variazione non è stata considerata significativa.

Marcatura covalente dei lisati totali PANC-1: esperimento Ettan™ DIGE

E' stato eseguito un esperimento di stimolazione con le cellule PANC-1 di controllo (CTRL), siero deprivate (SDt), e stimulate con hPL-A (SDt/hPL-A) per quattro giorni, come descritto nel capitolo 3. Sono state utilizzate quattro piastre da 150 mm per ciascun punto sperimentale e per ogni piastra contenente le cellule, una parte delle cellule è stata utilizzata per l'estrazione delle proteine, ed una parte per l'analisi di immunofluorescenza, che convalidasse l'espressione dei marcatori della beta cellula (GLUT-2, PDX-1, Insulina e Peptide C).

Le proteine così estratte sono state sottoposte a precipitazione (2D Clean Up kit) e quantificate (2D Quant Kit). Per permettere la successiva reazione tra le molecole proteiche ed i marcatori fluorescenti (Cydye2, Cydye3, Cydye5) il pH della miscela proteica è stato corretto a pH basico (pH 8-9), con NaOH 50mM. 10 nmol di fluorofori sono state ricostituite in un volume di dimetilformammide (DMF), tale da ottenere una concentrazione finale pari a 1nmol/μl.

La soluzione ottenuta è stata ulteriormente diluita a 400 pmol/μl con DMF, ed utilizzata secondo il seguente rapporto: 400 pmol per 50 μg di proteina.

La marcatura delle proteine con i fluorofori procedeva al buio per 30 min a 4°C :

- 50 μg di ogni campione sono stati incubati con 400 pmol di Cydye3
- 50 μg di ogni campione sono stati incubati con 400 pmol di Cydye5
- una miscela proteica ottenuta da tutti i campioni in esame (4 estratti proteici da cellule PANC-1 controllo, 4 da siero deprivate, 4 da stimulate con hPL-A) presenti nella stessa quantità (50μg) è stata incubata con 4.8 nmol di Cydye2.

Quest'ultima rappresenta lo standard interno.

La reazione di marcatura è stata terminata con l'aggiunta di L-Lisina 10 mM, per 10 minuti, a 4°C, al buio.

Le proteine derivanti dalle PANC-1 di controllo (CTRL), siero deprivate (SDt) e stimulate con hPL-A (SDt/hPL-A) sono stati riuniti secondo lo schema riportato in Tabella 3.

Quindi sono stati allestiti 6 esperimenti di focalizzazione isoelettrica e successiva elettroforesi bidimensionale, secondo i protocolli e le metodiche precedentemente descritte in questo capitolo.

Sono stati eseguiti in parallelo tre gel semipreparativi, utilizzando 500 μg di lisati cellulari non marcati, derivanti dalle PANC-1 di controllo (CTRL), siero deprivate (SDt) e stimulate con hPL-A (SDt/hPL-A). I tre campioni sono stati ottenuti dalla miscela dei corrispondenti

replicati biologici utilizzati per l'esperimento DIGE.

Il protocollo di isoelettrofocalizzazione (IEF), che avviene a 20C° con un limite di corrente di 50 µA per strip, prevede le seguenti fasi:

Step 1: 300V 6 h

Step 2: 1000V 6h gradiente

Step 3: 8000V 3h gradiente

Step 4: 8000 V 4h

Step 5: 8000V fino al raggiungimento delle 50000Vhrs totali.

La visualizzazione delle mappe elettroforetiche sono stata realizzata incubando i gel prima in 500 ml di una soluzione di fissaggio (CH₃OH 50%, CH₃COOH 7%) per 3 ore in agitazione, quindi in 500 ml di una soluzione di Sypro Ruby per 16 ore sotto agitazione.

Tabella 3 - Disegno sperimentale per l'Analisi DIGE

Gel	Cy3 (400pmol)	Cy5 (400pmol)	Cy2 (400pmol)
1	CTRL Piastra 1 (50µg)	SDt Piastra 4 (50µg)	Pool Standard
2	SDt Piastra 3 (50µg)	CTRL Piastra 3 (50µg)	Pool Standard
3	SDt/hPL-A Piastra 1 (50µg)	SDt Piastra 2 (50µg)	Pool Standard
4	SDt Piastra 1 (50µg)	SDt/hPL-A Piastra 2 (50µg)	Pool Standard
5	CTRL Piastra 2 (50µg)	SDt/hPL-A Piastra 3 (50µg)	Pool Standard
6	SDt/hPL-A Piastra 4 (50µg)	CTRL Piastra 4 (50µg)	Pool Standard

Analisi d'immagine ed escissione degli spot proteici

L'acquisizione delle immagini delle separazioni elettroforetiche delle proteine ottenute con l'Analisi DIGE è stata ottenuta utilizzando lo strumento scanner Typhoon 9400 Variable Mode Imager, mediante tre scansioni consecutive di ogni gel, alle seguenti lunghezze d'onda d'eccitazione e di emissione: 532nm/580nm per CyDye Cy3, 633nm/670nm per CyDye Cy5, 488nm/520nm per CyDye Cy2.

I gels preparativi sono stati acquisiti nell'intervallo 457nm/610nm. L'analisi d'immagine è stata eseguita mediante DeCyder DIA e DeCyder BVA, impostando i seguenti filtri di esclusione: $R > 1,30$ e $R < 1,30$; $P < 0.001$. Gli spots di interesse sono stati escissi dai gels preparativi mediante il sistema automatico Ettan Spot Picker, sottoposti ad idrolisi in situ ed analizzati per spettrometria di massa.

Risultati dell'Analisi 2D-Gel

L'analisi 2D-Gel ha evidenziato che le cellule PANC-1 trattate per quattro giorni con l'ormone hPL-A mostravano di 14 proteine differentemente espresse. Tali proteine sono risultate maggiormente espresse nelle cellule di controllo rispetto alle cellule siero deprivate e/o stimulate con hPL-A (rispettivamente Figura 23 e 24).

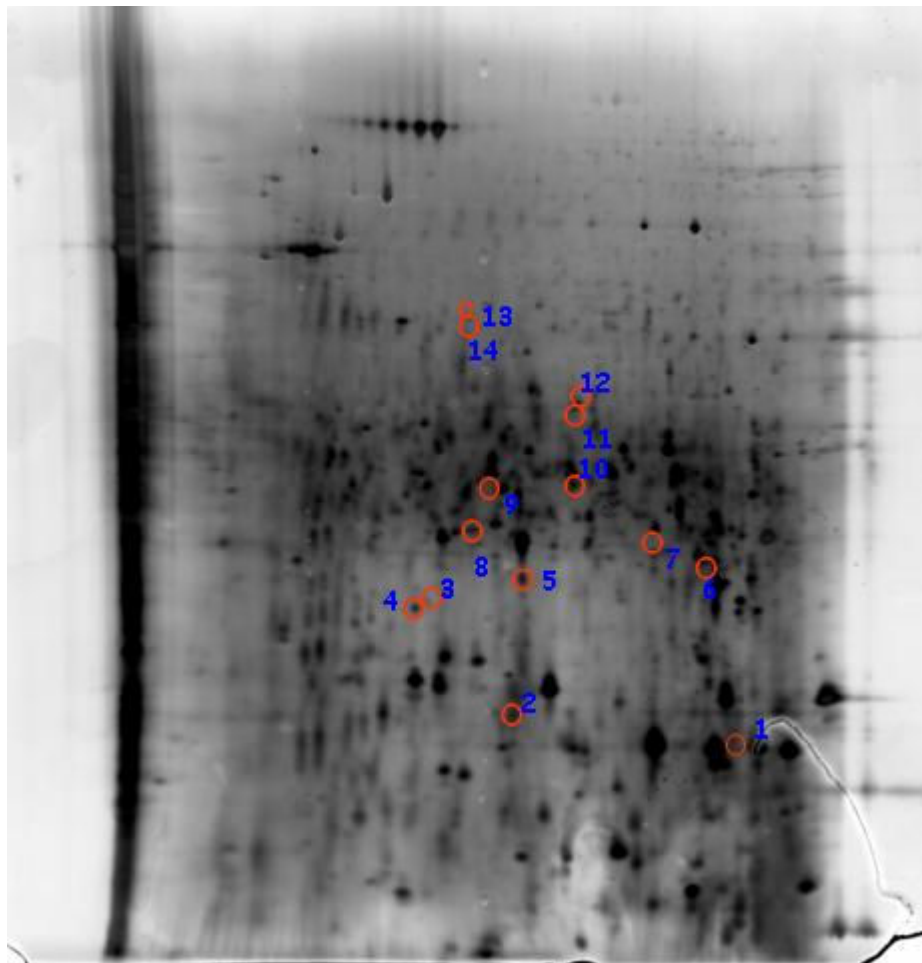


Figura 23 – Analisi 2D-Gel PANC-1/SDt/hPL-A.

Le proteine estratte (200 µg) dalla linea cellulare PANC-1, stimolata con l'ormone lattogeno placentare, sono state analizzate in prima dimensione su strip da 18 cm, pH 3-11 NL e in seconda dimensione in SDS-PAGE al 12,5%. Le proteine sono state visualizzate con colorazione argintica.

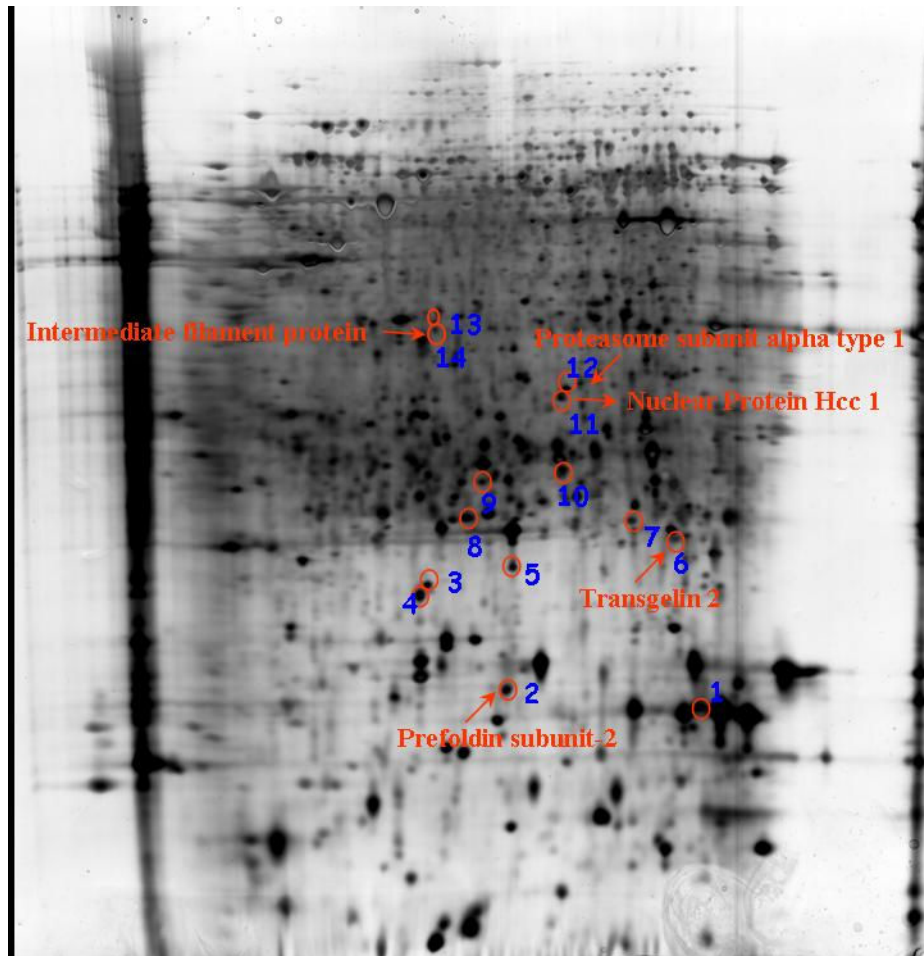


Figura 24 – Analisi 2D-Gel PANC-1 controllo.

Le proteine estratte (200 µg) dalla linea cellulare PANC-1 di controllo, sono state analizzate in prima dimensione su strip da 18 cm, pH 3-11 NL e in seconda dimensione in SDS-PAGE al 12,5%. Le proteine sono state visualizzate con colorazione argentica.

Gli spot relativi alle proteine di interesse sono stati escissi dal gel e digeriti con tripsina. L'identificazione mediante Capillary Liquid Chromatography accoppiata ad Electrospray Ion Trap Tandem Mass Spectrometry (cLC-ESI-IT MS/MS) ha identificato 5 proteine (delle 14 evidenziate), la cui espressione è risultata drasticamente diminuita nelle cellule trattate con l'ormone. In Figura 25 (Pannelli a-b-c-d-e) sono mostrate le identificazioni di ognuna delle 5 proteine (Prefoldin subunit-2; Transgelin-2; Nuclear Protein Hcc-1; Proteasome subunit alpha type 1; Intermediate filament protein); i dati sono stati elaborati tramite il software TurboSequest.

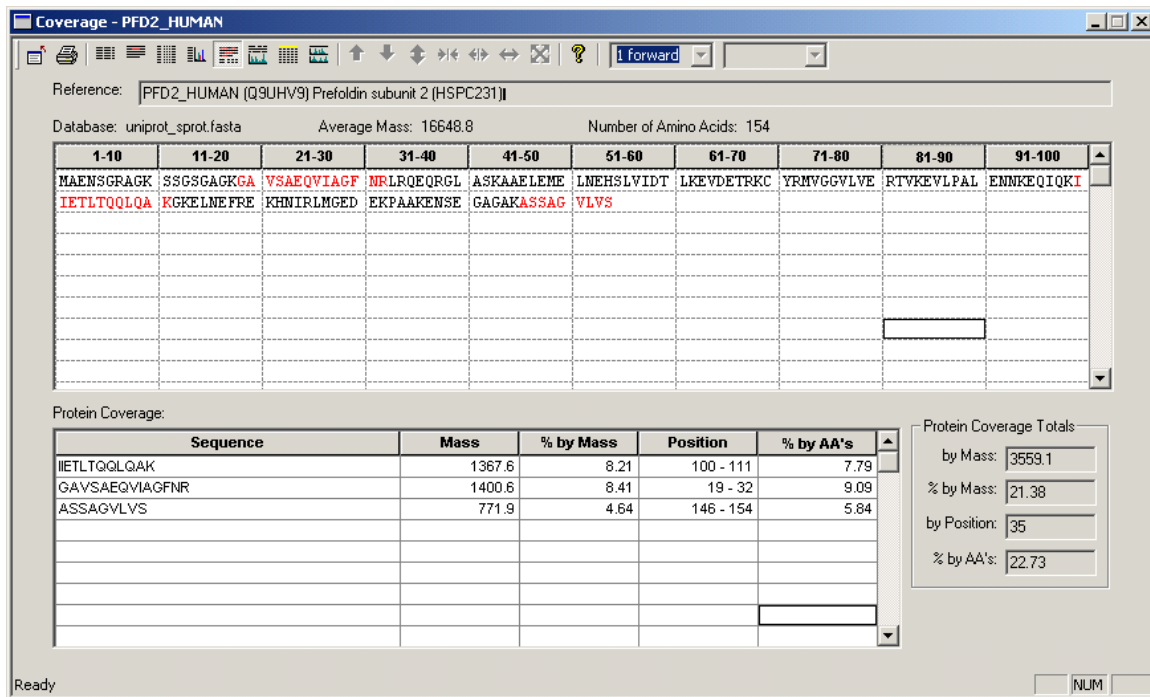
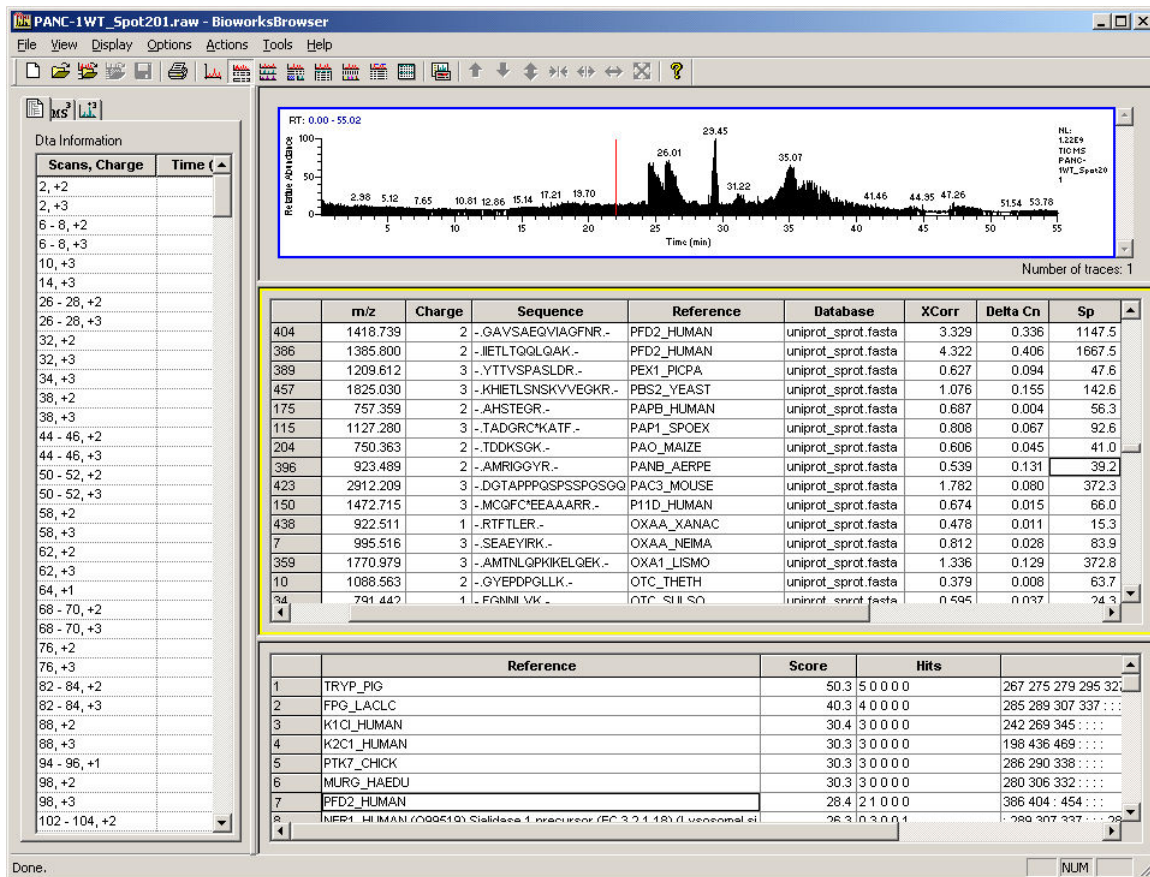


Figura 25/a- Identificazione della proteina *Prefoldin subunit-2* tramite cLC-ESI-IT MS/MS e analisi mediante software TurboSequest.

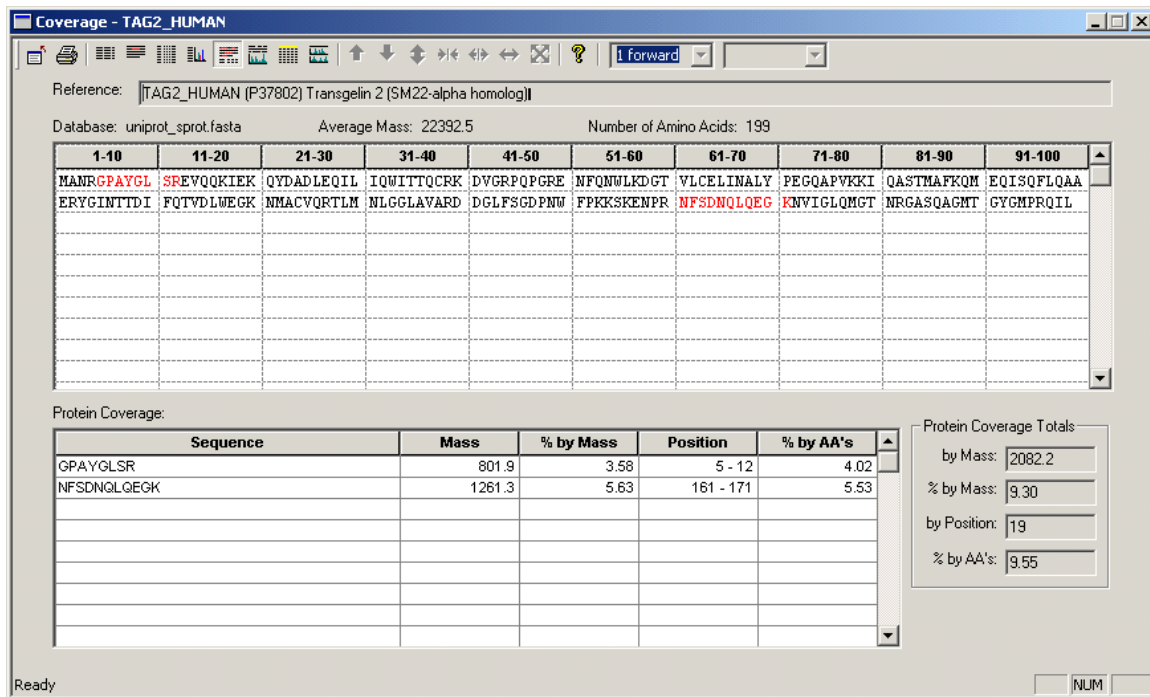
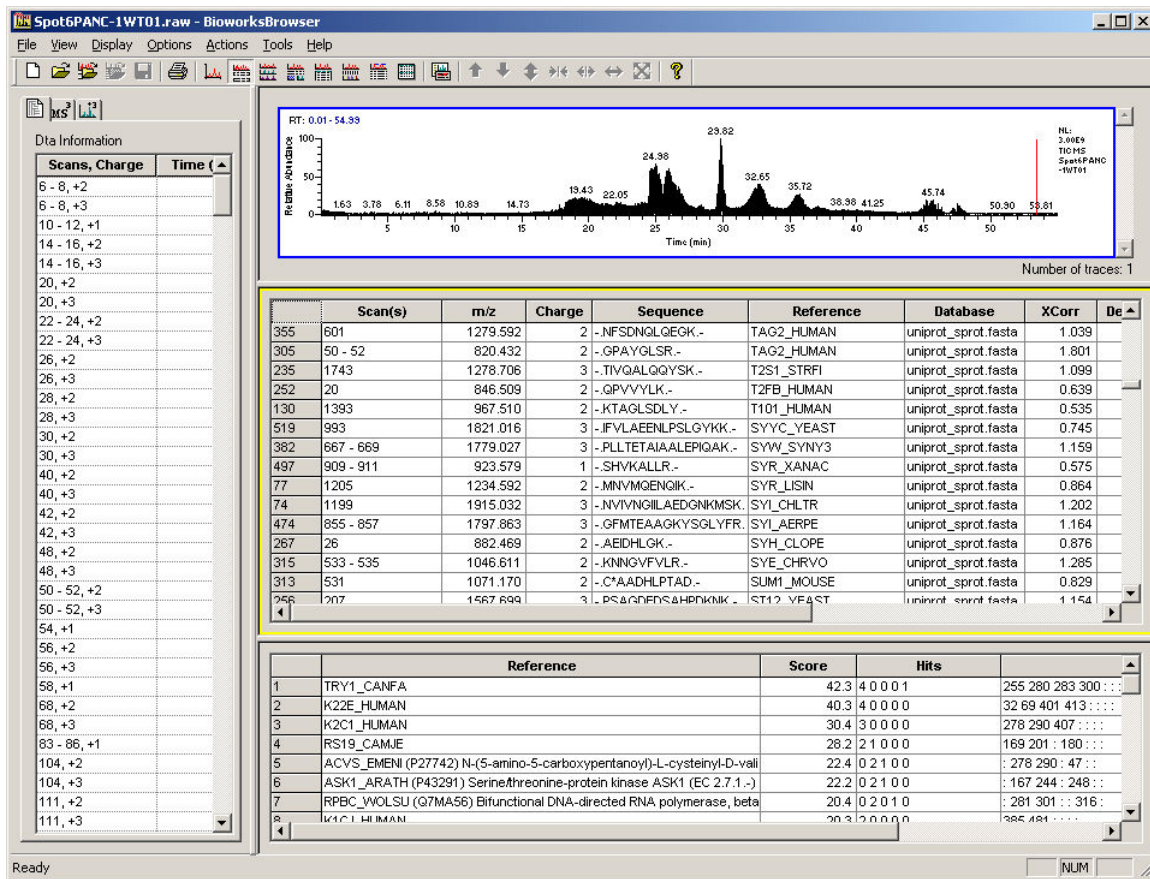


Figura 25/b- Identificazione della proteina *Transgelin-2* tramite cLC-ESI-IT MS/MS e analisi mediante software TurboSequest.

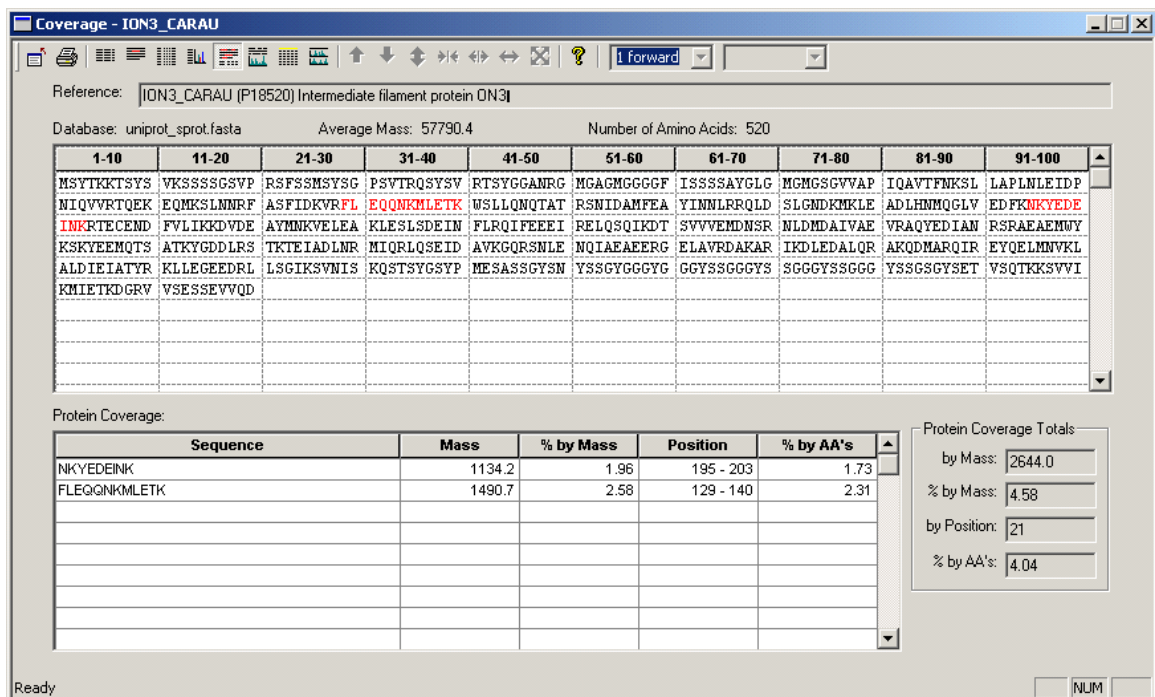
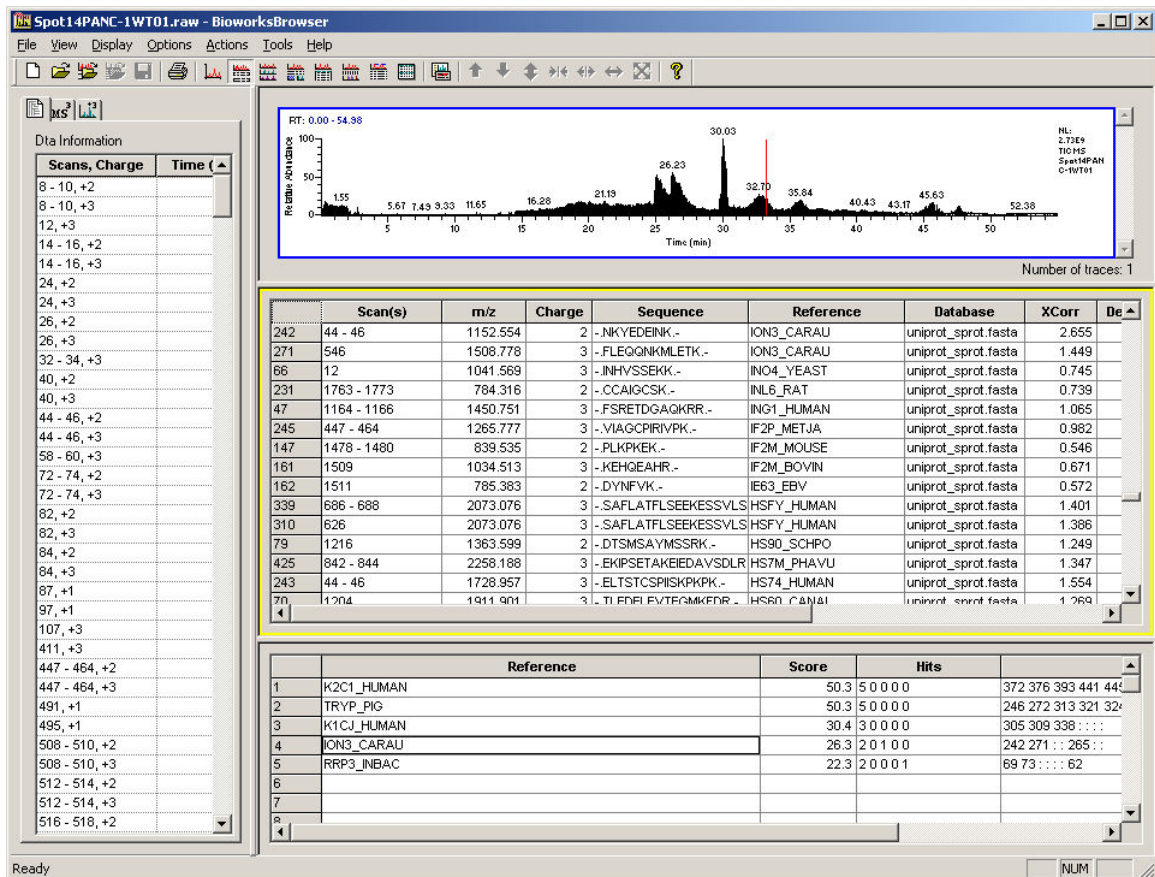


Figura 25/c- Identificazione della proteina *Intermediate Filament Protein* tramite cLC-ESI-IT MS/MS e analisi mediante software TurboSequest.

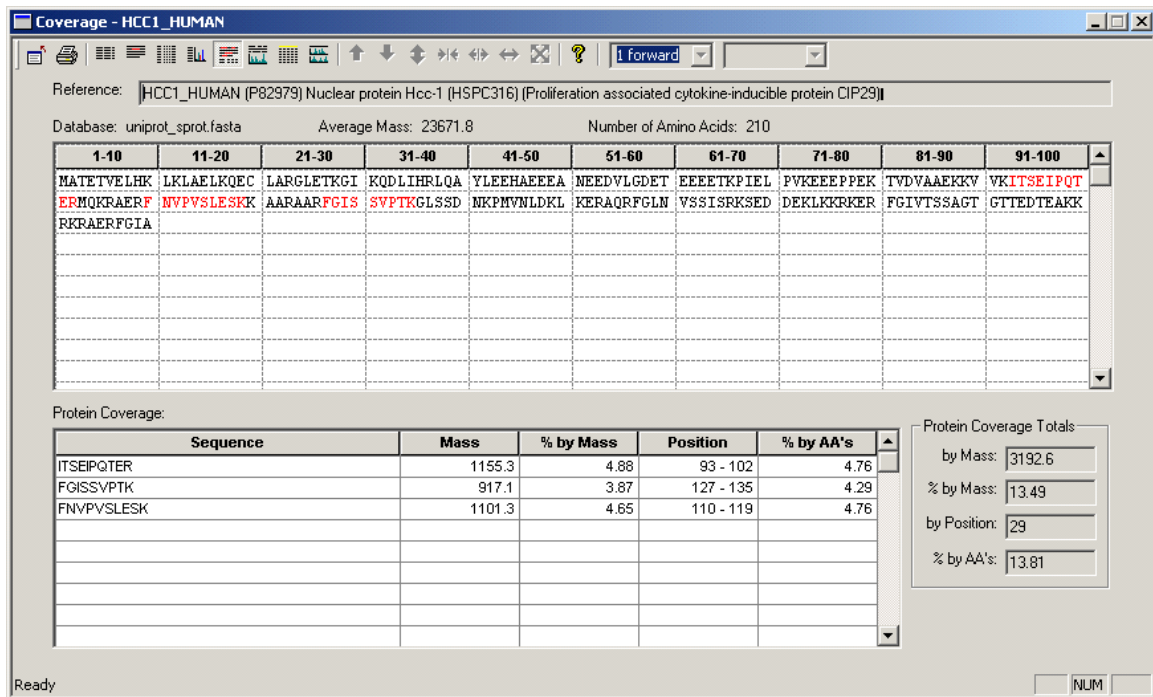
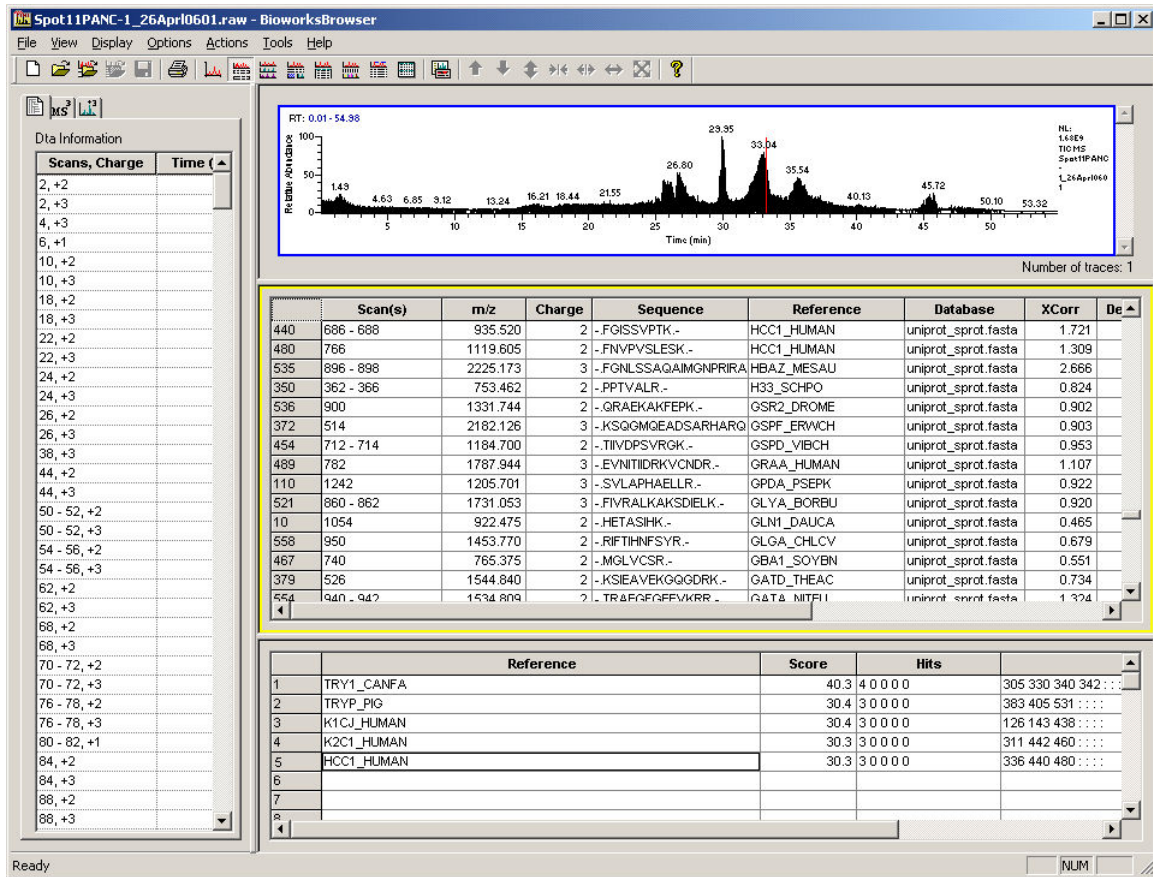


Figura 25/d- Identificazione della proteina *Nuclear Protein Hcc-1* tramite cLC-ESI-IT MS/MS e analisi mediante software TurboSequest.

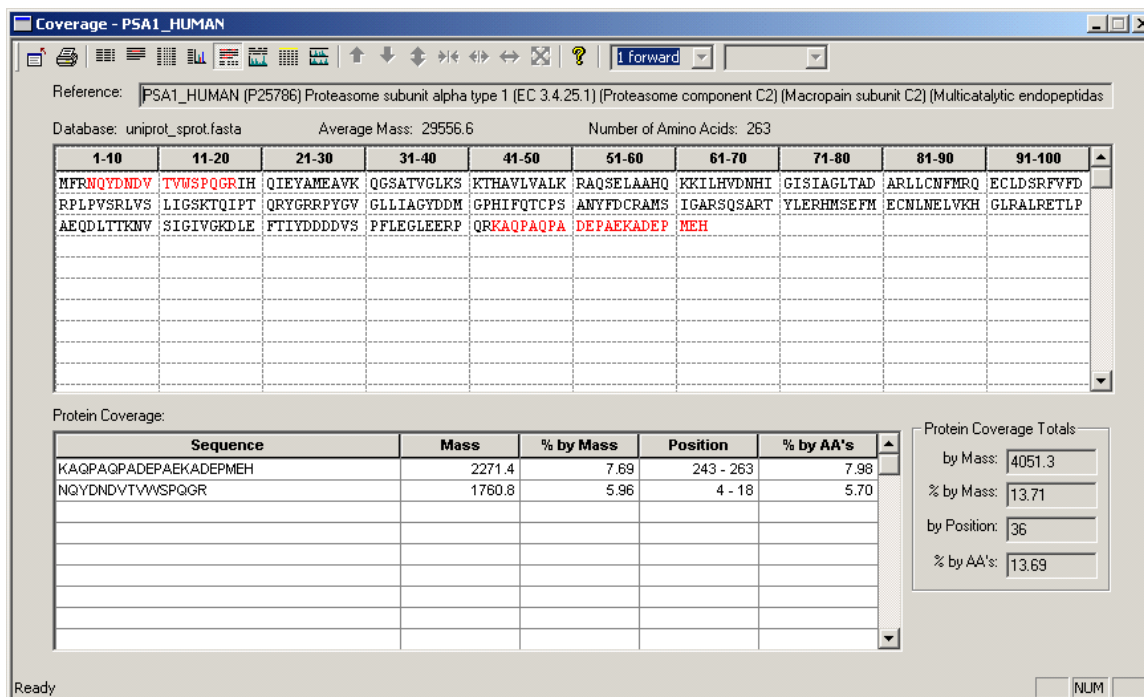
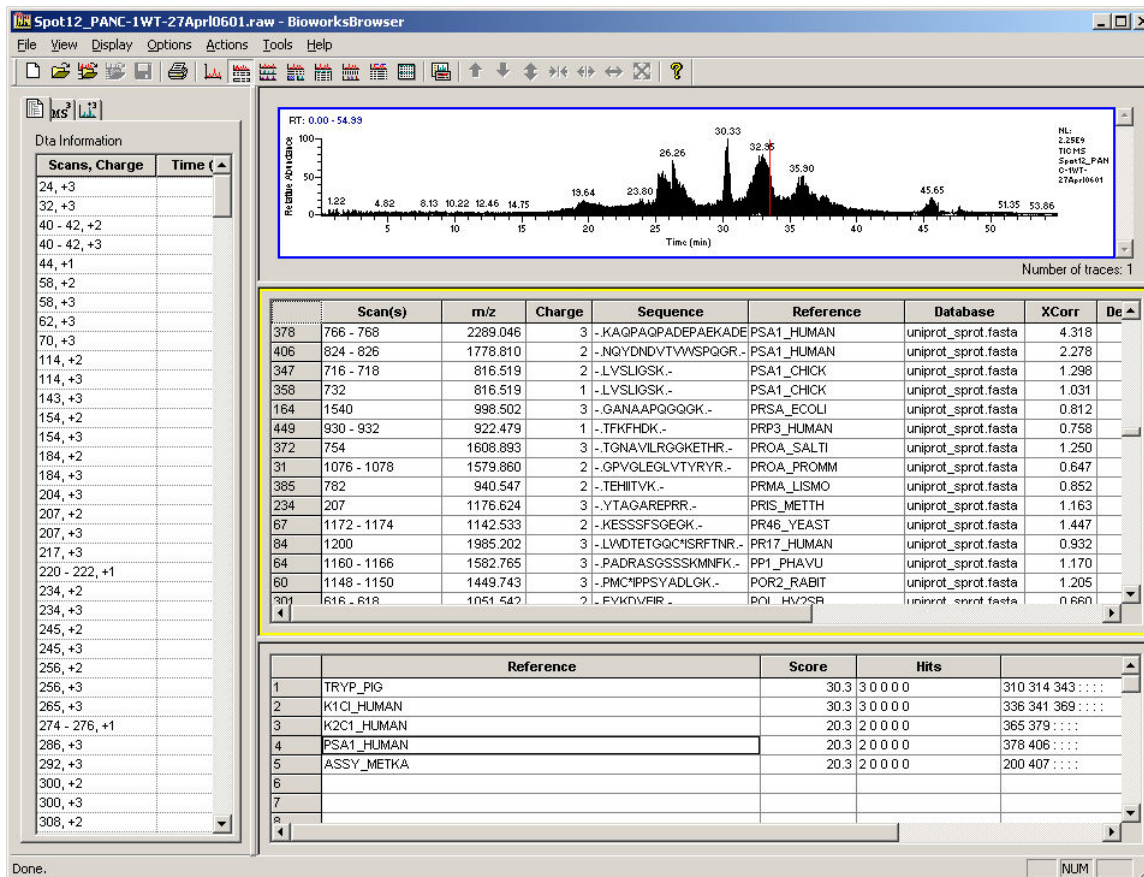


Figura 25/e- Identificazione della proteina *Proteasome Subunit Alpha Type* tramite cLC-ESI-IT MS/MS e analisi mediante software TurboSequest.

In Tabella 4 sono rappresentate le 5 proteine identificate ed i rispettivi i numeri identificativi (Ac Number) assegnati dalla Banca Dati uniprot_sprot.fasta alle proteine.

AC number	Nome della proteina
Q9UHV9	Prefoldin subunit-2
P37802	Transgelin-2
P82979	Nuclear Protein Hcc-1
P25786	Proteasome subunit alpha type 1
P18520	Intermediate filament protein

Tabella 4 - Proteine piu' espresse nelle cellule di controllo rispetto alle cellule siero deprivate e/o stimulate con hPL-A

La descrizione delle proteine identificate, suddivise in classi funzionali, si trova nell'appendice del capitolo V.

Risultati Analisi DIGE

L'analisi DIGE è stata effettuata sui lisati proteici totali delle cellule PANC-1 di controllo (CTRL), siero deprivate (SDt) e stimulate con hPL-A (SDt/hPL-A) alle 96 ore dal trattamento ormonale. Sono state utilizzate quattro piastre per ciascun punto sperimentale e per ogni piastra una parte delle cellule è stata utilizzata per l'estrazione delle proteine ed una parte per l'analisi di immunofluorescenza, affinché fosse convalidata l'espressione dei marcatori della beta cellula : Insulina, GLUT-2, PDX-1, e Peptide C (rispettivamente Figura 27, 28, 29, 30).

L'analisi DIGE (Figura 31) ha evidenziato 78 spot differentemente espressi. Di questi 78 spot è risultato che 20 spot sono diminuiti nell'insieme costituito dalle cellule siero deprivate e stimulate con hPL-A rispetto all'insieme costituito dalle cellule di controllo e 58 spot sono risultati aumentati nell'insieme cellule siero deprivate e stimulate rispetto all'insieme delle cellule di controllo.

L'analisi d'immagine è stata eseguita mediante il software DeCyder e sono state considerate variazioni nell'abbondanza relativa degli spot (Average Ratio) tra valori compresi di 1.25 e 9 (Figura 32). Sono stati considerati statisticamente significativi valori di T-Test < 0.004.

Gli spot relativi alle proteine di interesse sono stati escissi da gel semipreparativi eseguiti in parallelo all'esperimento DIGE e quindi digeriti con tripsina. L'identificazione è stata eseguita mediante Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF) e/o Capillary Liquid Chromatography accoppiata ad Electrospray Ion Trap Tandem Mass Spectrometry (cLC-ESI-IT MS/MS).

Sono state identificate in totale 31 proteine delle 78 differentemente espresse (Tabella 5). Di queste 31 proteine identificate, nell'insieme costituito dalle cellule siero deprivate e stimulate con hPL-A rispetto all'insieme costituito dalle cellule di controllo, 20 proteine sono risultate diminuite e 11 proteine sono risultate aumentate (rispettivamente, Tabella 6 e 7).

La descrizione in dettaglio delle proteine identificate, suddivise in classi funzionali, si trova nell'appendice del capitolo V.

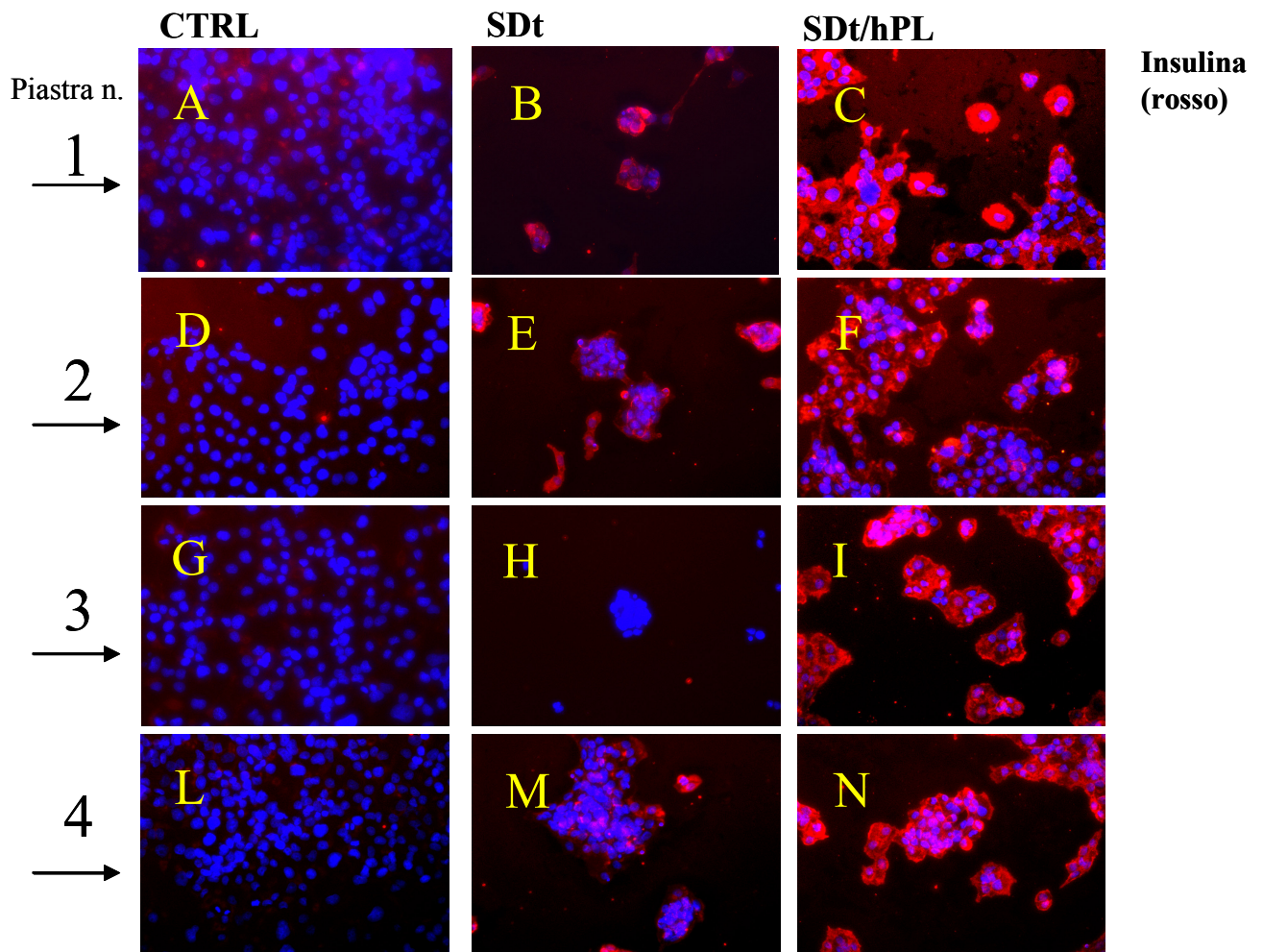


Figura 27 - Analisi di Immunofluorescenza di cellule PANC-1 stimulate con hPL-A.

Le cellule PANC-1 sono state seminate in piastre da 150 mm (4 piastre per ogni condizione) rispettivamente alle concentrazioni: controllo (CTRL) $1,5 \times 10^6$; siero deprivate (SDt) 4×10^6 ; siero deprivate trattate con hPL-A (SDt/hPL-A) 4×10^6 , lasciate aderire per una notte, sottoposte ad un breve trattamento con tripsina (30-60 sec.). Quindi è stato addizionato terreno siero deprivato con 0,1% BSA, Transferrina e 500ng/ml hPL-A per 96 ore. Le cellule sono state fissate in 4% Paraformaldeide, permeabilizzate con Metanolo 50% e, quindi, incubate con l'anticorpo primario anti-Insulina, (fluorescenza in rosso). I nuclei sono evidenziati in blu (colorazione DAPI). Ingrandimento 20X .

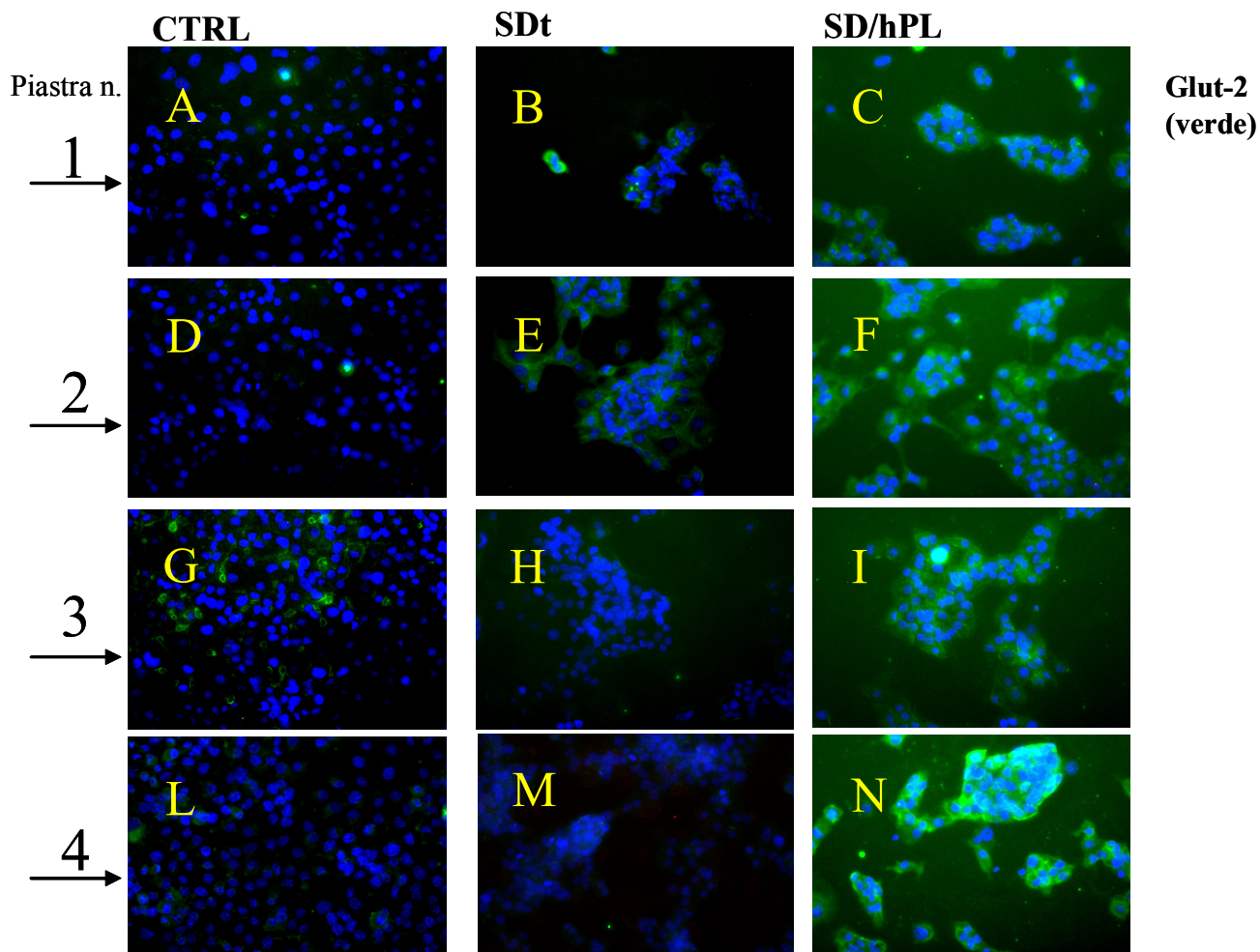


Figura 28 - Analisi di Immunofluorescenza di cellule PANC-1 stimulate con hPL-A.

Le cellule PANC-1 sono state seminate in piastre da 150 mm (4 piastre per ogni condizione) rispettivamente alle concentrazioni: controllo (CTRL) $1,5 \times 10^6$; siero deprivato (SDt) 4×10^6 ; siero deprivato trattato con hPL-A (SDt/hPL-A) 4×10^6 , lasciate aderire per una notte, sottoposte ad un breve trattamento con tripsina (30-60 sec.). Quindi è stato addizionato terreno siero deprivato con 0,1% BSA, Transferrina e 500ng/ml hPL-A per 96 ore. Le cellule sono state fissate in 4% Paraformaldeide, permeabilizzate con Metanolo 50% e, quindi, incubate con l' anticorpo primario anti-Glut-2. I nuclei sono evidenziati in blu (colorazione DAPI). Ingrandimento 20X .

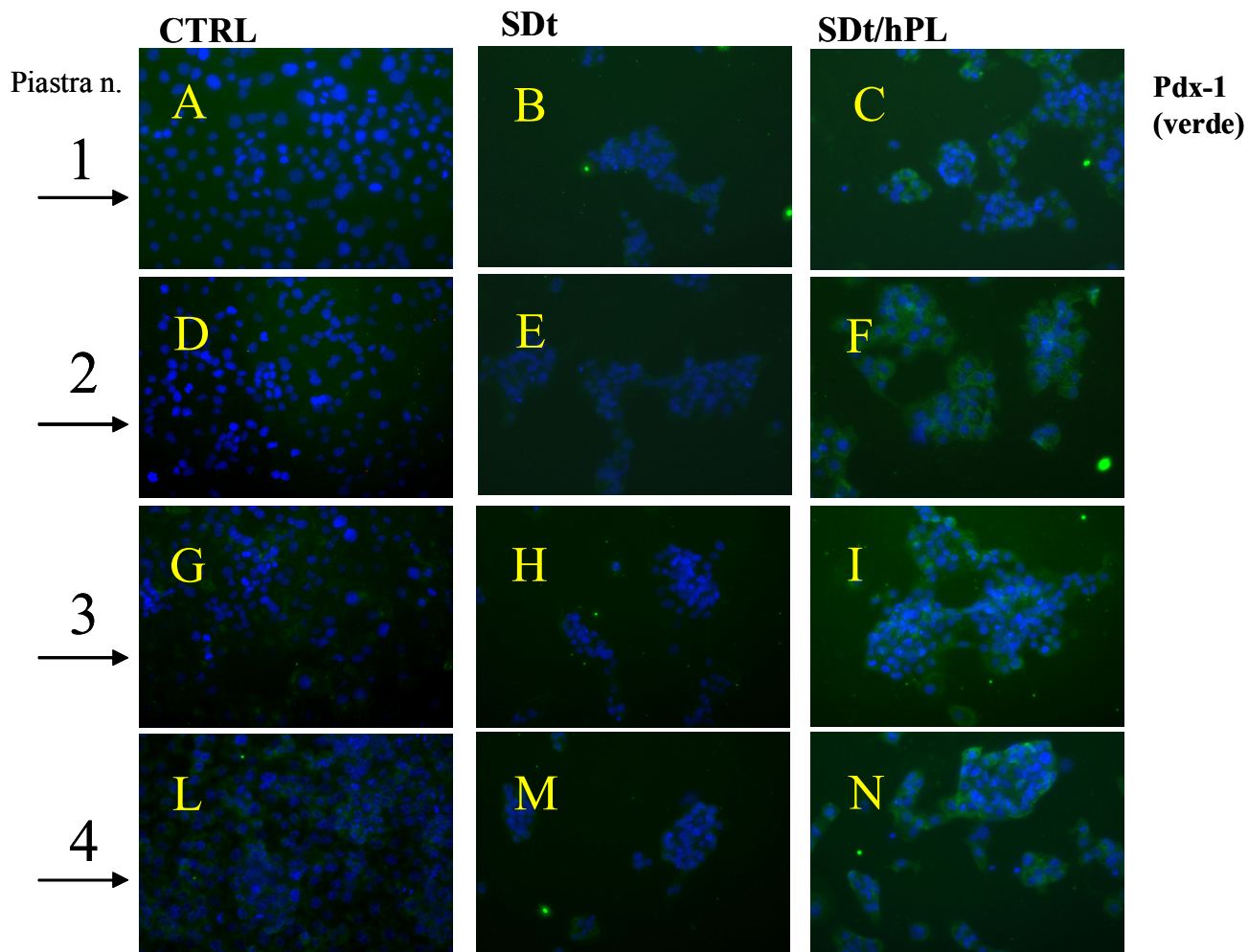


Figura 29 - Analisi di Immunofluorescenza di cellule PANC-1 stimulate con hPL-A.

Le cellule PANC-1 sono state seminate in piastre da 150 mm (4 piastre per ogni condizione) rispettivamente alle concentrazioni: controllo (CTRL) $1,5 \times 10^6$; siero deprivato (SDt) 4×10^6 ; siero deprivato trattato con hPL-A (SDt/hPL-A) 4×10^6 , lasciate aderire per una notte, sottoposte ad un breve trattamento con tripsina (30-60 sec.). Quindi è stato addizionato terreno siero deprivato con 0,1% BSA, Transferrina e 500ng/ml hPL-A per 96 ore. Le cellule sono state fissate in 4% Paraformaldeide, permeabilizzate con Metanolo 50% e, quindi, incubate con l'anticorpo primario anti-Pdx-1. I nuclei sono evidenziati in blu (colorazione DAPI). Ingrandimento 20X .

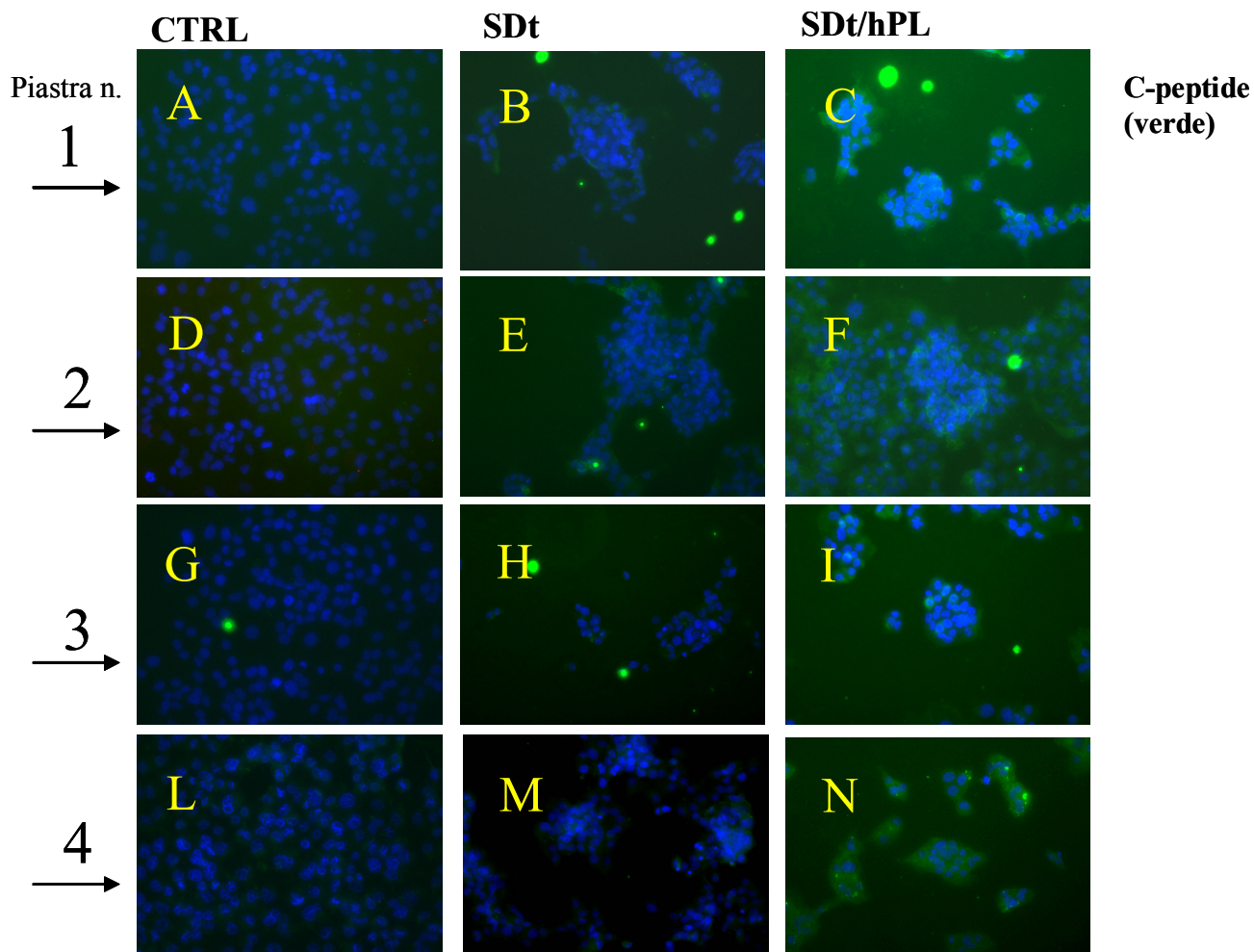


Figura 30 - Analisi di Immunofluorescenza di cellule PANC-1 stimulate con hPL-A.

Le cellule PANC-1 sono state seminate in piastre da 150 mm (4 piastre per ogni condizione) rispettivamente alle concentrazioni: controllo (CTRL) $1,5 \times 10^6$; siero deprivate (SDt) 4×10^6 ; siero deprivate trattate con hPL-A (SDt/hPL-A) 4×10^6 , lasciate aderire per una notte, sottoposte ad un breve trattamento con tripsina (30-60 sec.). Quindi è stato addizionato terreno siero deprivato con 0,1% BSA, Transferrina e 500ng/ml hPL-A per 96 ore. Le cellule sono state fissate in 4% Paraformaldeide, permeabilizzate con Metanolo 50% e, quindi, incubate con l' anticorpo primario anti-peptide C. I nuclei sono evidenziati in blu (colorazione DAPI). Ingrandimento 20X .

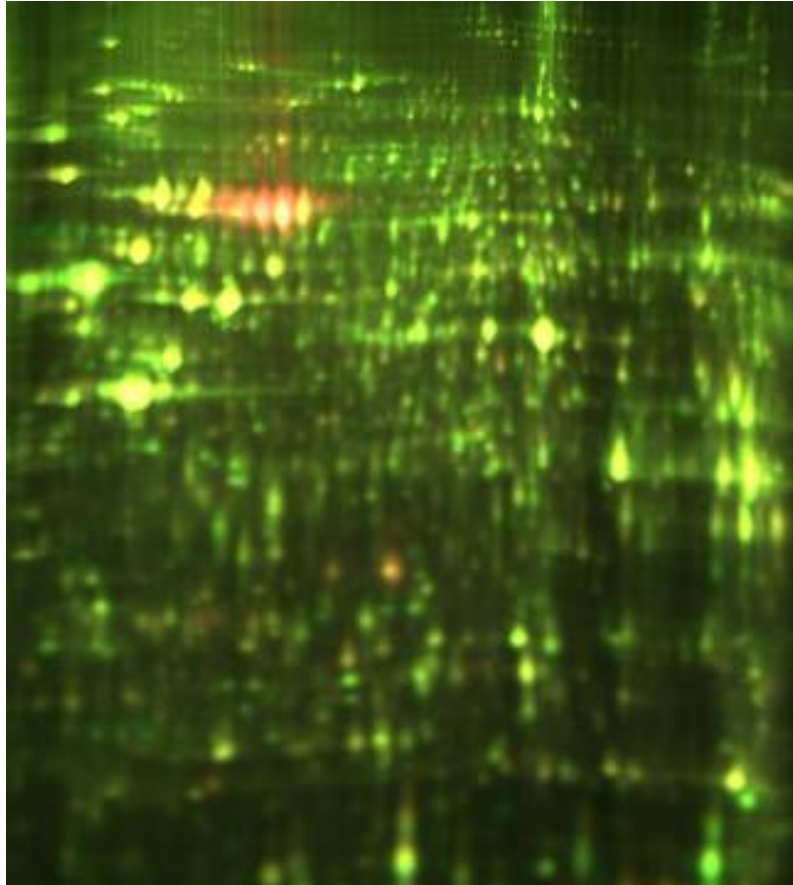


Figura 31– Immagine DIGE. La figura mostra l’analisi di tre campioni diversi (CTRL1; SDt4; Pool Standard) che è stata eseguita marcando ciascun campione con un diverso fluoroforo (Cy2, Cy3 e Cy5). Successivamente, le proteine marcate con i tre fluorofori vengono rilevate attraverso l’eccitazione con tre diverse sorgenti laser che eccitando rispettivamente Cy2, Cy3 e Cy5. Il programma utilizzato (DeCyder) è in grado di acquisire i dati del segnale fluorescente provenienti dai tre campioni.

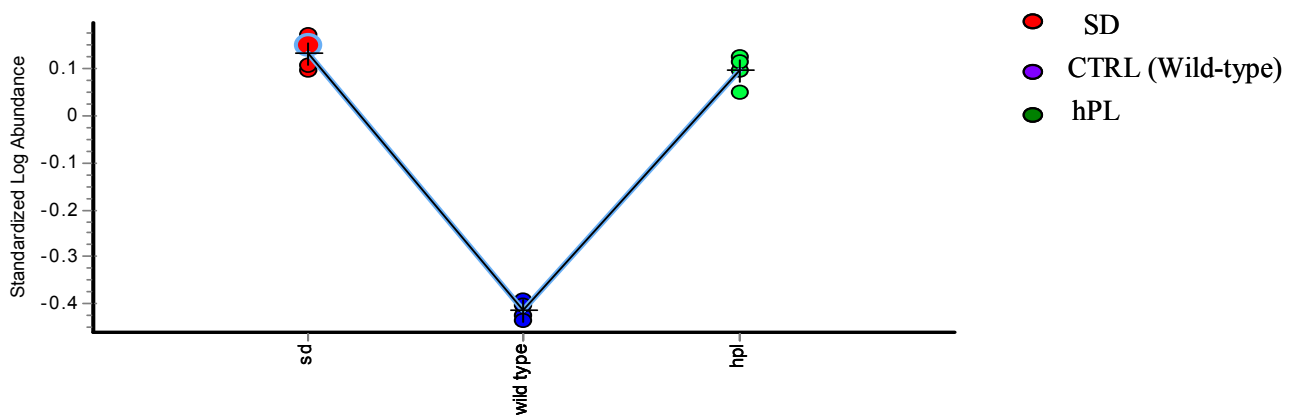


Figura 32– Grafico ottenuto dall’elaborazione dei dati mediante il programma DeCyder. Il grafico mette in evidenza che non sussistono variazioni nell’abbondanza relativa degli spot tra le cellule sierio deprivate (SDt) e le cellule stimulate (SDt/hPL-A). Differenze si evidenziano nell’insieme tra le cellule SDt, SDt/hPL-A e le cellule di controllo (CTRL).

RISULTATI DIGE CELLULE PANC-1

Master number	AC number	Nome della proteina	SDt vs CTRL		SDt/hPL vs CTRL	
			t-Test	Av. ratio	t-Test	Av. ratio
3392	P30044	Peroxiredoxin 5	1.5e-005	2.33	4.2e-005	2.31
2685	Q9UBD9	Cardiotrophin-like cytokine factor 1	4.0e-005	1.93	0.00022	1.96
2486	P07339	Cathepsin D	3.8e-005	1.85	2.2e-005	1.86
2870	P32119	Peroxiredoxin-2	1.6e-006	3.28	1.6e-006	3.18
2528	Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4	7.9e-005	1.49	0.00010	1.53
1695	Q9UQ80 P23526	Proliferation-associated protein 2G4 Adenosylhomocysteinase	7.8e-005	-1.92	0.00026	-1.89
1723	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	8.4e-006	-1.26	0.00012	-1.27
3323	Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	1.1e-005	2.36	3.8e-005	2.40
2605	P60174	Triosephosphate isomerase	7.8e-005	1.25	3.5e-005	1.23
1595	Q9Y265	RuvB-like 1	8.0e-005	-1.44	0.00042	-1.56
2240	Q07955	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	8.9e-005	-1.26	0.00070	-1.25
1947	Q96J01	THO complex subunit 3	8.0e-005	2.05	0.00027	1.97
2654	P21266	Glutathione S-transferase Mu 3	0.00014	1.94	1.2e-005	2.00
2833	P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	0.00015	1.44	1.5e-005	1.43
962	Q13200 Q9UIS9-3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 Methyl-CpG-binding domain protein 1	0.00022	-1.36	0.00013	-1.44
1551	P08670	Vimentin	0.00027	-2.27	0.0011	-2.18
1942	P40121	Macrophage-capping protein	0.00028	1.50	0.0019	1.39
1280	P02769	Albumin	9.2e-005	8.06	0.00021	7.08
1757	P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	0.0023	1.35	0.0060	1.29
2162	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	0.0019	-1.39	0.0089	-1.30
2537	P68402	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	0.0019	1.33	0.00085	1.36
2021	O76003	Thioredoxin-like protein 2	0.0014	-1.51	0.00047	-1.48
1436	Q9HCCO -2	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	0.0013	1.53	0.00050	1.46
2655	Q99714-2	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	0.00047	1.42	0.00082	1.41
2427	O43633	Charged multivesicular body protein 2a	0.00041	1.37	0.00018	1.39
1723	A4D0Q1	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2	8.4e-006	-1.26	0.00012	-1.27
2786	P09211	Glutathione S-Transferase pi Isoform CRA_c	2.4e-005	1.47	3.9e-006	1.50
2315	P09525	ANXA4- Annexin 4	5.9e-005	1.30	0.00037	1.32
3053	P23528	Cofilin 1	0.00011	1.36	0.00011	1.36
2621	P04792	Heat shock protein 27 KDa	0.0012	-1.32	0.00017	-1.29
1486	P30101	Disulfide isomerase associated 3	0.0012	1.36	0.0096	1.33

Tabella 5. Identificazione delle proteine diversamente espresse risultanti dall'analisi DIGE- *Master number*: numero attribuito allo spot identificato; ***Average Ratio*:** è il parametro che esprime la variazione dell'abbondanza delle proteine tra i due gruppi confrontati. E' calcolato in base alla variazione del volume standardizzata dello spot in esame. Valori positivi di Av. Ratio esprimono che la proteina in esame è maggiormente espressa nelle cellule SDt e/o SDt/hPL-A rispetto a CTRL, mentre valori negativi esprimono che la proteina in esame è espressa in maniera minore nelle cellule SDt e/o SDt/hPL-A rispetto a CTRL. Dagli spot corrispondenti ai Master Number 1695 e 962 sono state identificate per ognuno 2 proteine diverse.

**PROTEINE PIU' ESPRESSE NELLE CELLULE DI CONTROLLO RISPETTO
ALLE CELLULE SIERO DEPRIVATE E/O STIMOLATE CON hPL-A**

Nome della proteina	Classe funzionale di appartenenza
<i>Proliferation-associated protein 2G4</i> <i>RuvB-like 1</i> <i>Adenosylhomocysteinase</i>	Proteine del metabolismo e sintesi del DNA
<i>Splicing factor, arginine/serine-rich 1</i> <i>Methyl-CpG-binding domain protein 1</i>	Proteine del processamento dell'RNA
<i>Heat shock protein 27 Kda</i> <i>Thioredoxin-like protein 2</i>	Proteine coinvolte nello stress e nella difesa cellulare
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2</i> <i>Proteasome 26S subunit, ATPase, 2</i>	Proteine di degradazione
<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i> <i>Vimentin</i>	Proteine del citoscheletro
<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2</i>	Proteine di trasporto

Tab 6. Identificazione funzionale di proteine identificate con l'analisi DIGE in PANC-1/CTRL

**PROTEINE PIU' ESPRESSE NELLE CELLULE SIERO DEPRIVATE E/O
STIMOLATE CON hPL-A RISPETTO ALLE CELLULE DI CONTROLLO**

Nome della proteina	Classe funzionale di appartenenza
<i>Triosephosphate isomerase</i> <i>Ornithine aminotransferase, mitochondrial</i> <i>Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial</i> <i>Annexin 4</i> <i>Protein disulfide isomerase associated 3</i>	Proteine del metabolismo
<i>THO complex subunit 3</i>	Proteine del processamento dell'RNA
<i>Peroxiredoxin 5 & Peroxiredoxin-2</i> <i>Glutathione S-transferase Mu 3</i> <i>Glutathione S-Transferase pi Isoform CRA_c</i> <i>Cardiotrophin-like cytokine factor 1</i> <i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2</i> <i>Platelet-activating factor acetylhydrolase IB sub beta</i>	Proteine coinvolte nello stress e nella difesa cellulare
<i>Cathepsin D</i>	Proteine di degradazione
<i>Macrophage-capping protein</i> <i>Cofilin</i>	Proteine del citoscheletro
<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	Proteine della traduzione del segnale
<i>Charged multivesicular body protein 2a</i> <i>Chloride intracellular channel protein 4</i> <i>Fatty acid-binding protein, epidermal</i>	Proteine di trasporto

Tab 7. Identificazione funzionale di proteine identificate con l'analisi DIGE in PANC-1/SD e/o hPL

Discussione

Lo studio del proteoma delle cellule PANC-1, derivate dal dotto pancreatico umano, stimulate e non al differenziamento con l'ormone lattogeno placentare umano (hPL-A) è stato condotto con due metodiche di separazione bidimensionale: 1) l'analisi 2D-Gel, con visualizzazione delle proteine tramite colorazione ai sali d'argento, e 2) l'analisi DIGE, tecnica più sensibile della precedente, che visualizza e quantifica le proteine mediante marcatori fluorescenti. Le tecniche di analisi proteomica utilizzate evidenziano importanti differenze di espressione proteica fra le cellule di controllo PANC-1 e le cellule siero deprivate e/o stimulate al differenziamento con l'ormone hPL-A; mentre i risultati non mostrano differenze significative di espressione proteica tra le cellule siero deprivate e quelle stimulate. Studi precedenti hanno evidenziato che la siero deprivazione induce un cambiamento metabolico all'interno della cellula (Larsson et al., 1986), tale da indurre probabilmente una differente intensità di espressione del proteoma. Ad oggi, non risulta in letteratura nessun dato inerente al proteoma di cellule sottoposte a siero deprivazione.

I risultati mostrati in questo capitolo indicano che il cambiamento nell'espressione proteica è da ascrivere principalmente a sei famiglie funzionali proteiche appartenenti a proteine del metabolismo e sintesi del DNA, del processamento dell'RNA, dello stress e della difesa cellulare, della degradazione, del citoscheletro e del trasporto.

I dati dell'analisi di immunofluorescenza hanno evidenziato che le cellule PANC-1 siero deprivate e trattate con hPL-A, e non le cellule di controllo e/o siero deprivate, esprimono marcatori caratteristici della cellula beta pancreatica: PDX-1, Insulina, Peptide-C e Glut-2. Quindi, la discrepanza tra i risultati ottenuti con le tecniche 2D-Gel e/o DIGE rispetto all'analisi di immunofluorescenza potrebbe essere dovuta al tempo di stimolazione con hPL-A (96 ore). Tale periodo risulterebbe sufficiente per mostrare un cambiamento di espressione proteica che si manifesta visibilmente con la tecnica di immunofluorescenza, perché visualizza singole cellule, ma potrebbe non essere sufficiente per ottenere una popolazione cellulare i cui componenti risultino omogeneamente differenziati nel nuovo fenotipo cellulare. Cioché, l'estratto proteico analizzato risulta costituito da una popolazione cellulare non omogeneamente differenziata e come tale anche le differenze di espressione, ben evidenti nelle immagini di immunofluorescenza, sono state livellate. Inoltre, alcune importanti modificazioni, che potrebbero essere indotte dalla stimolazione con l'ormone hPL-A, come ad esempio modificazioni post-traduzionali (quali le fosforilazioni, le glicosilazioni, ecc.) non sono state da noi ancora analizzate.

Le proteine identificate mediante la metodica 2D-Gel, e che risultano più espresse nelle cellule di controllo rispetto alle cellule siero deprivate e/o stimulate, appartengono a quattro distinte classi funzionali: 1) la proteina Prefoldin-subunit-2 è uno chaperon molecolare, 2) la proteina nucleare Hcc-1 è un fattore di trascrizione che regola l'RNA polimerasi, 3) la subunità alpha-type1 del Proteasoma è coinvolta nella degradazione proteica, 4) la proteina Transegelin-2 e le proteine dei filamenti intermedi sono proteine del citoscheletro.

In letteratura è riportato che queste proteine sono molecole tipicamente espresse dalle cellule tumorali e, soprattutto, sono caratteristiche degli adenocarcinomi del pancreas, da cui deriva la linea cellulare PANC-1 (Sohn et al., 2006; Jatoi et al., 2005; Alldinger et al., 2005; Hoffrogge et al., 2006; Fukuda et Pelus, 2005).

Analogamente, la metodica DIGE ha evidenziato che le cellule di controllo, di derivazione tumorale, rispetto alle stesse cellule siero deprivate e/o alle stesse stimulate con l'ormone, esprimono famiglie funzionali proteiche che vengono alterate dalla carcinogenesi. Infatti risultano sovraespresse proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nel metabolismo del DNA, come la proteina Proliferation-associated protein 2G4, che oltre ad essere coinvolta nella mitogenesi può essere associata ad altre importanti funzioni cellulari, come l'inibizione del differenziamento cellulare (Radomski et Jost, 1995). A questa famiglia appartiene anche la proteina RuvB-like-1, la cui regione genica subisce delle mutazioni nelle leucemie ed in altri tumori solidi (Qiu X.B. et al., 1998) e gioca un ruolo fondamentale nella trasformazione oncogenica mediata da c-Myc (Matias et al., 2006). Inoltre, essendo un componente della proteina Istone Acetilasi, ha attività di elicasi sul DNA ed è coinvolta nel pathway mediato da Wnt nel rimodellamento della cromatina, trascrizione e regolazione dello sviluppo, indicando un coinvolgimento di Ruvb-like-1 nella mitosi (Feng et al., 2003). Tra le proteine coinvolte nei processi di difesa e di stress cellulare è importante notare una sovraespressione della 27kDa Heat Shock Protein, che funzionalmente è uno chaperon molecolare, ma risulta implicata nella tumorigenesi e nella resistenza alla chemioterapia, probabilmente inibendo l'apoptosi, tramite meccanismi non ancora pienamente compresi (Jung-Hee Lee et al., 2006). I processi intracellulari sono regolati, in parte, anche dal mantenimento di un adeguato livello di proteine, e questo equilibrio è garantito, tra le altre, da proteine di degradazione come i Proteasomi, di cui noi ritroviamo una maggiore espressione nelle cellule PANC-1 di controllo (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2; Proteasome 26S subunit, ATPase 2). Queste molecole, degradando proteine legate alla ubiquitina, controllano il ciclo e la morte cellulare. Questo processo critico appare deregolato ed up-regolato nella genesi di molti tipi di tumore (cancro del colon, del rene, della cervice) e i proteasomi vengono utilizzati anche come

target in chemioterapia (Mani et Gelmann, 2005; Cui et al., 2006). Le proteine del citoscheletro appartengono ad un'altra categoria estremamente importante di molecole che vengono alterate dai processi tumorali, ed è noto che una modificazione della struttura della cellula tumorale è strettamente correlata con la perdita di adesione ed un incremento della motilità, promuovendo così il fenomeno della metastatizzazione (Nakajima et al., 2004). Troviamo molto espresse, in questa categoria, sia la proteina Transgelin-2 (derivante dall'esperimento 2D-Gel) che la proteina Vimentina (identificata con l'esperimento DIGE), entrambe chiaramente correlate alla progressione del carcinoma del dotto pancreatico (Sitek et al., 2005).

Le proteine che sono state discusse fino ad ora, risultano espresse maggiormente nelle cellule di controllo e sono inoltre caratteristiche di vari tipi di tumori, tra cui quelli del dotto del pancreas. Queste proteine risultano meno abbondanti nelle cellule siero deprivate e/o nelle cellule trattate con l'ormone lattogeno placentare suggerendo che la condizione di siero deprivazione e/o di stimolazione ormonale ha apportato un cambiamento nella morfologia e nell'assetto del proteoma delle cellule PANC-1.

Sia le cellule siero deprivate che le stimolate, mostrano una tendenza ad avere un'espressione maggiore di proteine coinvolte nello stress e nella difesa cellulare, rispetto alle cellule di controllo, probabilmente in conseguenza della mancanza dei fattori di crescita e dell'insulina presenti nel siero. Tra le proteine iper-espresse, appartenenti a questa classe, troviamo la proteina Glutathione S-transferase Mu-3 e la proteina Glutathione S-Transferase pi (Isoform CRA_c), entrambe appartenenti alla famiglia di enzimi correlati con i processi di detossificazione cellulare, che facilitano il legame del glutathione (GSH) ai composti tossici presenti nella cellula, rendendoli più solubili e/o meno attivi (Collier et al., 1994; Ulrich et al., 2002; Allen et al., 2007).

E' probabile che una over-espressione della proteina Cathepsin D sia ugualmente imputabile alla siero deprivazione, perché questa proteina è funzionalmente una proteasi che idrolizza i residui peptidici dell'aspartato ed è coinvolta nei processi metabolici che coinvolgono la degradazione di proteine all'interno dei lisosomi (Fusek et Vetvicka, 2005).

Anche le proteine Peroxiredoxin-5 e Peroxiredoxin-2 risultano essere sovra-espresse. Queste proteine appartengono alla famiglia delle proteine antiossidanti, a cui attualmente sono acrivibili 6 membri (Peroxiredoxin I-VI) (Bast et al., 2002). In realtà queste proteine, oltre ad avere attività enzimatica in relazione allo stress ossidativo, risultano essere coinvolte anche in fenomeni cellulari più complessi, come la proliferazione cellulare ed il differenziamento (Bast et al., 2002). Inoltre, la proteina Peroxiredoxin-2 risulta up-regolata quando le isole

pancreatiche murine vengono esposte ad alte concentrazioni di glucosio (Ahmed et Bergsten 2005). A riguardo ricordiamo che le cellule PANC-1 sono state stimulate con l'ormone proprio in terreno contenente alto glucosio.

Tra le proteine coinvolte nei processi metabolici, è di un certo interesse la proteina Disulfide Isomerase (PDI), che funzionalmente è un enzima che appartiene alla famiglia delle isomerasi, ossia catalizza i cambiamenti strutturali di una molecola, ed in particolare è coinvolta nei processi che riguardano la modificazione delle proteine ed è responsabile di modifiche post-traduzionali, come glicosilazioni, metilazioni, fosforilazioni e soprattutto della formazione di ponti disolfuro. L'importanza risiede nel fatto che questa proteina è caratteristica delle cellule beta del pancreas, ed è associata al diabete perché il gene che la codifica appare regolato dall'insulina (Dowling et al., 2006).

La sovra-espressione di proteine caratteristiche del citoscheletro, come Cofilin e Macrophage-capping protein, responsabili della polimerizzazione e della depolimerizzazione dei filamenti di actina, e quindi coinvolte nella motilità cellulare (Dabiri et al., 1992; Young et al., 1994; Lappalainen et Drubin, 1997; Ghosh et al., 2004) è imputabile al fatto che sia le cellule siero deprivate che le stimulate hanno mostrato un cambiamento morfologico rispetto alle cellule di controllo.

In conclusione, i dati ottenuti con l'analisi proteomica hanno mostrato un quadro coerente con un processo di differenziamento delle cellule tumorali di origine duttale a cellule con caratteristiche morfologiche e funzionali diverse.

CLASSIFICAZIONE DELLE PROTEINE IN FAMIGLIE FUNZIONALI

Le proteine trovate sono state analizzate tramite la banca dati “*Panther classification system*” (link: <http://www.pantherdb.org>), e sono state classificate in base alla loro funzione biologica.

Proteine identificate mediante 2D-Gel

PROTEINE DEL METABOLISMO E MODIFICAZIONE

Prefoldin subunit-2 è uno chaperon molecolare, ossia una proteina che lega le proteine nascenti aiutandole a ripiegarsi correttamente nella loro struttura tridimensionale.

PROTEINE DEL PROCESSAMENTO DELL’RNA

Nuclear Protein Hcc-1 è un fattore di trascrizione richiesto per la regolazione della RNA polimerasi utilizzando una sequenza templatato di DNA.

PROTEINE DI DEGRADAZIONE

Proteasome subunit alpha type 1 è una proteasi, ossia un enzima che idrolizza i legami tra i peptici. È coinvolta nella sintesi, nelle modificazioni o nella degradazione delle proteine.

PROTEINE DEL CITOSCHELETRO

Transgelin-2 è una proteina del citoscheletro, che lega l’actina. Ha un ruolo nel mantenimento della struttura e nella motilità della cellula.

Intermediate filament protein è una proteina generica appartenete alla famiglia dei filamenti intermedi, che rappresentano fondamentalmente le proteine del citoscheletro. Possono essere coinvolte nel sostegno o nella motilità della cellula.

Proteine identificate mediante DIGE

PROTEINE DEL METABOLISMO

Triosephosphate isomerase è un isomerasi, ossia un enzima che catalizza i cambiamenti strutturali di una molecola, questa proteina è coinvolta nel metabolismo dei carboidrati, sia nei processi che portano alla biosintesi di carboidrati che nelle glicolisi, convertendo il glucosio a piruvato.

Ornithine aminotransferase mitochondrial è un enzima della famiglia delle transaminasi, ossia catalizza il trasferimento di un gruppo amminico da una molecola donatore ad una molecola accettore, utilizzando come cofattore la pyridoxal phosphate. E’ coinvolta nel metabolismo degli amminoacidi, inclusi la degradazione e la biosintesi.

Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial è un enzima che catalizza la formazione di legami tra amminoacidi, accoppiando l’idrolisi di molecole di ATP. E’ coinvolta nei processi metabolici degli amminoacidi, comprendendo i processi che portano alla biosintesi o alla degradazione degli amminoacidi, che portano alla formazione di ammoniaca e biossido di carbonio.

Annexin 4 è una proteina di trasporto, che lega il calcio ed interagisce con i fosfolipidi nella membrana plasmatica. E’ coinvolta nel metabolismo, inclusa la biosintesi ed la degradazione dei lipidi, degli acidi grassi e degli steroidi.

Protein disulfide isomerase associated 3 è un enzima che appartiene alla famiglia delle isomerasi, ossia catalizza i cambiamenti strutturali di una molecola. E' coinvolta nei processi che riguardano la sintesi, la degradazione e la modificazione delle proteine. È responsabile di modifiche post-traduzionali delle proteine, come glicosilazioni, metilazioni, fosforilazioni e della formazione di ponti disolfuro.

PROTEINE DELLA CRESCITA CELLULARE E SINTESI DEL DNA

Adenosylhomocysteinase è un idrolasi, ossia un enzima che catalizza l'idrolisi di vari tipi di legami: tra esteri, zuccheri e peptidi. E' coinvolta nel metabolismo di nucleosidi, acidi nucleici, inclusi la biosintesi e la degradazione di purine e dei relativi nucleosidi e nucleotidi.

Proliferation-associated protein 2G4 questa proteina è un fattore di trascrizione che lega gli acidi nucleici. Questa proteina è richiesta per la regolazione della RNA-polimerasi per la trascrizione genica ed è implicata in vari processi quali il metabolismo cellulare, la biosintesi di proteine, la crescita cellulare ed il differenziamento.

RuvB-like 1 ha la funzione di fattore di trascrizione e di elicasi del DNA. Questa proteina è richiesta nella regolazione della RNA polimerasi, non lega direttamente il DNA ma regola la trascrizione legandosi ad altri fattori di trascrizione. E' coinvolta nei processi metabolici degli acidi nucleici, inclusi la degradazione o la biosintesi di nucleosidi, nucleotidi e acidi nucleici. Regolando gli acidi nucleici, ha una funzione anche nello sviluppo embrionale, nei processi che generano il mesoderma e quindi gli organi che ne derivano.

PROTEINE DELLA TRASCRIZIONE E DEL PROCESSAMENTO DELL'RNA

Splicing factor, arginine/serine-rich 1 è una molecola che lega gli acidi nucleici ed ha attività enzimatica. E' coinvolta nei processi metabolici degli acidi nucleici, inclusi la degradazione o la biosintesi di nucleosidi, nucleotidi e acidi nucleici, nei processi di capping, splicing, di poliadenilazione di molecole di pre-mRNA.

THO complex subunit 3 è una proteina che lega acidi nucleici e può funzionare come enzima. E' coinvolta nei processi metabolici degli acidi nucleici, inclusi la degradazione o la biosintesi di nucleosidi, nucleotidi e acidi nucleici, nei processi di capping, splicing, di poliadenilazione di molecole di pre-mRNA. Il complesso THO/TREX lavora assieme alla RNA polimerasi durante l'allungamento del trascritto e può legare proteine che hanno una funzione nella trascrizione e nell'esportazione dell' mRNA.

Methyl-CpG-binding domain protein 1 è una proteina che lega gli acidi nucleici ed è coinvolta nei processi metabolici di nucleosidi, nucleotidi ed acidi nucleici, sia nella degradazione che nelle biosintesi. È una proteina che partecipa alla trascrizione dell'RNAm utilizzando una sequenza templatato di DNA.

PROTEINE DELLA DEGRADAZIONE E PROTEOLISI

26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 è una proteina che regola l'attività di una serie di enzimi quali le chinasi, le fosfatasi, le proteasi, le GTPase, e le proteine-G.

E' coinvolta nel metabolismo proteico, nelle modificazioni alle proteine, nella proteolisi, nel ciclo cellulare e nel controllo del ciclo cellulare, controllandone l'inizio e la progressione. Inoltre è coinvolta nel pathway dell'ubiquitina: i proteasomi agiscono su proteine che sono state marcate in modo specifico per essere degradate, grazie all'attacco covalente della proteina ubiquitina.

Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2 è un complesso multicatalitico con funzione di proteinasi, costituito da 2 parti: il core 20S e il regolatore 19S.

I proteasomi agiscono su proteine che sono state marcate in modo specifico per essere degradate, grazie all'attacco covalente della proteina ubiquitina.

Cathepsin D è una proteasi che idrolizza i residui peptidici dell'aspartato; è coinvolta nei processi metabolici che coinvolgono la sintesi, la modificazione o la degradazione di proteine.

PROTEINE CON FUNZIONE DI TRASPORTO

Chloride intracellular channel protein 4 È un canale trans-membrana che permette il passaggio attraverso il doppio strato lipidico della membrana cellulare di ioni (anioni) specifici. Essendo coinvolta nel “traffico” intracellulare di ioni, ha la funzione di mantenere l’omeostasi cellulare.

Fatty acid-binding protein, epidermal ha la funzione di trasportare nel sangue o nelle cellule altre molecole.

Ha diverse funzioni: oltre ad essere attiva nel trasporto di lipidi e acidi grassi, è coinvolta nel metabolismo di lipidi, acidi grassi e steroidi ed è un “carrier” di vitamine e cofattori. È inoltre implicata nei processi di sviluppo embrionale e nel differenziamento dell’ectoderma, il più esterno dei tre foglietti embrionali, che darà origine all’epidermide e al tessuto nervoso.

Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 è un canale trans-membrana che permette il passaggio attraverso il doppio strato lipidico della membrana cellulare di ioni (anioni) specifici. È coinvolta nel “traffico” intracellulare di ioni.

Charged multivesicular body protein 2a è un componente del complesso endosomiale ESCRT-III. Il complesso ESCRT-III è richiesto per la formazione dei corpi multi-vescicolari (MVBs) e per lo “smistamento” delle proteine endosomiali all’interno dei MVBs. Il complesso ESCRT-III è probabilmente coinvolto nella concentrazione proteica all’interno dei MVBs. In caso di infezione da virus HIV-1, il virus trae vantaggio dal complesso ESCRT-III riuscendo a far esocitare proteine virali.

PROTEINE DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 è una proteina di trasporto, che ha anche la funzione di regolare le protein chinasi, le fosfatasi, le proteasi e le G-protein, modulandole e/o inibendole. È implicata negli eventi della traduzione del segnale, quando una cellula risponde a stimoli esterni, ma non sono inclusi eventi trascrizionali. Tra i pathway in cui è implicata questa proteina si trovano i processi di traduzione del segnale attivati dall’interazione di EGF col proprio recettore, ed il signaling provocato da FGF.

PROTEINE DEL CITOSCHELETRO

Keratin, type I cytoskeletal 10 è una proteina strutturale, appartenente alla famiglia dei filamenti intermedi. Oltre ad essere implicata nella struttura della cellula, ha un ruolo anche nei processi della motilità cellulare.

Vimentin è una proteina appartenente alla famiglia dei filamenti intermedi, con diverse funzioni. È coinvolta nei processi dello sviluppo embrionale, in maniera specifica nei processi che portano alla generazione e al differenziamento dell’ectoderma, il più esterno dei tre foglietti embrionali, che darà origine all’epidermide e al tessuto neurale. Oltre che nella struttura cellulare è implicata anche nel movimento cellulare.

Macrophage-capping protein è una proteina calcio-sensibile che lega le molecole di actina del citoscheletro. Ha un ruolo nel mantenimento della struttura e nella motilità della cellula ma può avere anche un ruolo anche nella funzione dei macrofagi e può regolare le strutture citoplasmatica e/o nucleare, attraverso interazioni con l’actina, ed infine può legare il DNA.

Cofilin 1 è una proteina del citoscheletro, che lega l’actina. Ha un ruolo nel mantenimento della struttura e nella motilità della cellula.

PROTEINE DELLO STRESS E DELLA DIFESA CELLULARE

Peroxiredoxin 5 (PRDX5) è un enzima che catalizza reazioni di ossidoriduzione, ed è anche una perossidasi. E' coinvolta nei processi di immunità e difesa dell'organismo contro patogeni e/o condizioni di stress, attraverso meccanismi sia specifici che non specifici. Come perossidasi rimuove dalla cellula radicali liberi che causano stress ossidativo.

Peroxiredoxin-2 è un enzima che catalizza reazioni di ossidoriduzione, ed è in maniera specifica una perossidasi, ed utilizza H₂O₂ per ossidare una varietà di radicali liberi. Questo enzima è implicato nei processi di immunità e difesa da vari tipi di processi che causano stress alla cellula.

Cardiotrophin-like cytokine factor 1 è una interleuchina, ossia una molecola della famiglia delle citochine, ed è prodotta da cellule del sistema immunitario, ma anche da altri tipi cellulari in risposta a stimoli sia antigenici che non antigenici. Fino ad ora le interleuchine identificate sono 12. La funzione è varia, e comprende la modulazione dell'infiammazione e dell'immunità, la regolazione, la mobilità ed il differenziamento sia di cellule del sistema immunitario e di altre popolazioni cellulari. Come citochina ha la capacità di stimolare le cellule B e di legarsi e di attivare il recettore ILST/gp130.

Glutathione S-transferase Mu 3 famiglia di enzimi correlati con i processi di detossificazione cellulare: facilitano il legame di una molecola (il glutathione, GSH) ai composti tossici presenti nella cellula rendendoli più solubili o meno attivi. Coniuga il glutathione ridotto ad un'ampia varietà di elettrofili idrofobici ed agisce detossificando la cellula.

Thioredoxin-like protein 2 enzima che catalizza le reazioni di ossidoriduzione, introducendo un elettrone nel suo substrato da una molecola donatrice, e questa reazione è in genere accoppiata con una reazione redox. E' coinvolta nei meccanismi cellulari di rimozione o prevenzione da radicali liberi.

3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 enzima che catalizza le reazioni di ossidoriduzione. Catalizza l'ossidazione di un substrato trasferendo uno ione idrogeno al NAD/NADP o a flavo-enzimi.

Glutathione S-Transferase pi Isoform CRA_c ha funzione di coniugare il glutathione ridotto ad un'ampia varietà di elettrofili esogeni ed endogeni idrofobici. E' coinvolto nei processi anti-apoptotici e nello sviluppo del sistema nervoso centrale.

Heat shock protein 27 KDa è un chaperon molecolare, ossia una proteina che lega le proteine nascenti aiutandole a ripiegarsi correttamente nella loro struttura tridimensionale. Questo processo aumenta quando la cellula è esposta a vari tipi di stress.

Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta è un enzima inattivante la molecola Platelet-activating factor, potente fosfolipide pro-infiammatorio prodotto da leucociti, piastrine, cellule endoteliali e da cellule neuronali.

CAPITOLO VI

CONCLUSIONI

Il lavoro presentato in questa tesi è stato articolato in cinque parti tra loro correlate.

La prima parte è rappresentata dall'ottimizzazione della metodica di espressione e purificazione dell'ormone lattogeno placentare umano (hPL-A), non reperibile commercialmente. I passaggi fondamentali che hanno permesso di ottenere hPL-A puro e funzionale sono stati, nell'ordine: 1) l'espressione genica sotto l'azione del promotore forte T7, che ha permesso di ottenere milligrammi di prodotto utilizzabile nei successivi saggi biologici; 2) il legame di una coda di istidina alla proteina ricombinante, espressa da *E.Coli*, che ha introdotto nella purificazione una cromatografia per affinità; 3) il successivo passaggio in ambiente riducente (*beta-Mercaptoetanolo*) che è stato fondamentale per ostacolare l'interazione della proteina batterica alchil-idrossiperossidasi-reduttasi che copurificava con hPL-A.

Nella seconda parte è stata analizzata la via di traduzione del segnale indotta dall'azione di hPL-A sulle cellule PANC-1. E' descritto in letteratura che GH e PRL attivano la via metabolica di Akt e delle MAP Kinase (Erk1-2 / p44/42). Queste proteine agiscono rispettivamente inibendo l'apoptosi e regolando la crescita cellulare ed il differenziamento. I risultati da noi ottenuti tramite analisi Western Blot indicano che la stimolazione indotta da hPL-A sulla linea cellulare PANC-1 attiva la fosforilazione delle proteine Akt e MAPK (ERK-1e-2/p44/42). Questo significa che hPL-A promuoverebbe la sopravvivenza cellulare, inibendo il processo apoptotico indotto da siero deprivazione. Questi risultati sono confermati dall'osservazione che le cellule differenziate con hPL-A si mantengono vitali per più di tre settimane, mentre le cellule siero deprivate ma non stimolate con l'ormone, vanno incontro ad apoptosi.

La terza parte della tesi riporta i risultati dello studio del ruolo biologico dell'ormone lattogeno placentare, da noi purificato, nel differenziamento nelle cellule del dotto pancreatico (PANC-1) in cellule insulino-produttori. E' stato quindi sviluppato un protocollo di stimolazione cellulare con hPL-A, che ha messo in luce l'azione dell'ormone lattogeno placentare nel differenziamento delle cellule epiteliali del dotto pancreatico in cellule morfologicamente simili alle isole pancreatiche. Infatti, l'analisi di immunofluorescenza ha mostrato che le

cellule trattate con hPL-A per quattro giorni esprimono quattro marcatori specifici del differenziamento beta cellulare, ossia PDX-1, Insulina, Peptide-C e Glut-2.

Nella quarta parte del lavoro, mediante due metodiche di analisi proteomica (2D-Gel e DIGE), è stato evidenziato che il proteoma delle cellule di controllo presenta un'espressione proteica molto diversa dalle cellule siero deprivate e/o stimulate con hPL-A. Mentre non sono state rilevate differenze significative di espressione proteica tra le cellule siero deprivate e le cellule stimulate, le quali, invece, esprimono inequivocabilmente i marcatori del differenziamento beta cellulare (PDX-1, Glut-2, Insulina e Peptide-C). La discrepanza tra i risultati ottenuti con le tecniche di analisi bidimensionale 2D-Gel e/o DIGE rispetto all'analisi di immunofluorescenza potrebbe essere dovuta al tempo di stimolazione con hPL-A e/o al tipo di analisi effettuata. Infatti, l'analisi di immunofluorescenza indica che i quattro giorni di stimolazione ormonale sono sufficienti per osservare un cambiamento morfologico e molecolare, ma potrebbero non essere sufficienti per ottenere una popolazione omogeneamente differenziata. Cosicché, l'estratto proteico analizzato in proteomica risulterebbe costituito da cellule in diversi stadi del differenziamento e come tale, anche le differenze di espressione, ben evidenti nelle immagini di immunofluorescenza, potrebbero risultare non ancora evidenti. Inoltre, alcune importanti modificazioni, che potrebbero essere indotte dalla stimolazione con l'ormone hPL-A, come ad esempio modificazioni post-traduzionali (quali le fosforilazioni, le glicosilazioni, ecc.) non sono state da noi ancora analizzate.

Nella quinta parte del lavoro è stata trattata l'identificazione in spettrometria di massa delle proteine differentemente espresse ottenute dall'analisi proteomica. Le proteine così identificate, e maggiormente espresse nelle cellule tumorali PANC-1 di controllo rispetto alle cellule siero deprivate e/o stimulate con hPL-A, risultano caratteristiche di vari tipi di tumori, tra cui ovviamente anche quelli del dotto del pancreas, da cui deriva la linea cellulare del nostro modello sperimentale. Le proteine differentemente espresse sono ascrivibili a sei famiglie proteiche: 1) proteine del metabolismo e sintesi del DNA, 2) del processamento dell'RNA, 3) dello stress e della difesa cellulare, 4) della degradazione, 5) del citoscheletro, e 6) del trasporto. Queste stesse proteine risultano meno abbondanti nelle cellule siero deprivate e/o nelle cellule trattate con l'ormone lattogeno placentare. Questa osservazione suggerisce che la condizione di siero deprivazione e/o di stimolazione ormonale ha apportato un cambiamento non solo morfologico, ma anche nell'assetto del proteoma delle cellule PANC-1, fornendo un quadro coerente con un processo di differenziamento delle cellule tumorali di origine duttale a cellule con caratteristiche funzionali diverse.

Studi futuri saranno indirizzati all'ottimizzazione della procedura di stimolazione cellulare, che probabilmente deve essere eseguita in tempi più lunghi delle 96 ore, e allo studio del fosfoproteoma, che potrebbe mettere in evidenza delle differenze più finemente regolate, rispetto a quelle trovate analizzando l'espressione proteica totale. Il trattamento combinato di hPL-A con altri fattori di crescita come ad esempio FGF e GLP-1, potrebbe essere utilizzato per ottimizzare un eventuale protocollo di produzione di beta cellule *ex vivo* utilizzabili nel trapianto di soggetti diabetici.

In conclusione la presente tesi di dottorato rappresenta uno studio pilota nell'ambito della biologia dello sviluppo, teso ad ottenere cellule insulino-produttori a partire da cellule duttali. Il futuro di questa tecnica è focalizzato proprio sull'utilizzo di cellule "pre-committed" da indirizzare verso popolazioni di cellule beta pancreatiche differenziate, utilizzabili al fine del trapianto in pazienti affetti da diabete.

Materiali utilizzati in questa tesi

Il plasmide phPL 4828, contenente il cDNA codificante per la proteina ricombinante hPL-A (isoforma A dell'ormone hPL) è stato gentilmente fornito dalla Genentech, San Francisco, CA. Il vettore plasmidico pETM-11 è stato gentilmente concesso dall'Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare (IRBM). Il terreno di coltura per batteri di Luria Bertani (LB) in pasticche, le polveri di ampicillina, di Tris, di sodio-dodecil-solfato (SDS), cloruro di sodio (NaCl), fosfato di potassio (KH₂PO₄), solfato di magnesio (MgSO₄), solfato d'ammonio (NH₄)₂SO₄, cloruro d'ammonio (NH₄Cl), nitrato di argento (AgNO₃), cloruro di potassio (KCl), fosfato di sodio (Na₂HPO₄), albumina sierica bovina (BSA Riagrade), ammonio persolfato (APS), Tiamina, Guanidinio, Imidazolo, EDTA, DTT, Kanamicina, cloruro di calcio (CaCl₂), isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG), Biotina, Glutazione ridotto, Glutazione ossidato, Glicerolo, 2-β-mercaptoetanololo, Trizma Base, il Tween 20, il dimetil sulfossido (DMSO), la soluzione di trypan blue, il tetrametilendiamina (TEMED), la trietanolo ammina, il bromuro d'etidio, 2β-mercaptoetanololo, isopropanolo, iodioacetammide, blue di bromofenolo, idrossido di sodio (NaOH), NP-40, glicerolo, EDTA, PMSF, Na₃VO₄, NaPP, NaF, leupeptina, le pellicole fotografiche Polaroid 667, la Fixing Solution, la Development Solution, la L-lisina, la dimetilformammide (DMF) 99.8% anidra, sono prodotti forniti dalla ditta SIGMA (USA). Il bacto agar, l'estratto di lievito e i casaminoacidi sono prodotti dalla ditta DIFCO (USA). La soluzione di acido acetico glaciale e acido cloridrico, sono prodotti dalla ditta MERCK (Germania). Il Kit per la preparazione di DNA plasmidico, QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25), QIAprep Spin Miniprep Kit (50) e la resina NiNTA sono prodotti della ditta QIAGEN (USA). L'anticorpo secondario "Anti-rabbit-horseradish-peroxidase coniugate", lo strumento FPLC con gli apparecchi di supporto LKB REC 102 e LKB GradiFrac, la colonna cromatografica Hiload Superdex 75 26/60 Prep Grade, Mono Q HR 5/5, Resource Q, Super Loop 10 ml, Super Loop 50 ml, Super Loop 150 ml, le lastre fotografiche Hyperfilm ECL, la soluzione ECL, gli apparati per elettroforesi, per il trasferimento le Immobiline DryStrips 18 cm pH 3-11NL, il Pharmalyte pH 3-11NL, gli inibitori delle proteasi (Protease Inhibitor Mix), l'olio minerale (Plus One DryStrip Cover Fluid), l'apparato Ettan IPGphor Unit 3 (per la isoelettrofocizzazione), Immobiline DryStrip Reswelling Tray (per la reidratazione delle strips), l'apparato Ettan DALT twelve system (per la seconda dimensione), i vetri a bassa fluorescenza, Ettan DALT Gel Caster, Electrophoresis Power Supplì (EPS 3501 XL), Cup Loading Strip Holder complete set, Typhoon 9400 Variable Mode Imager, CyDye DIGE Fluor Cy2 minimal dye, CyDye DIGE Fluor Cy3

minimal dye, CyDye DIGE Fluor Cy5 minimal dye, PlusOne Urea, PlusOne CHAPS, PlusOne DTT, 2-D Quant kit, 2-D Clean-Up Kit, PlusOne Bromophenol Blue, PlusOne Tris, PlusOne SDS powder, PlusOne Glycerol (87%), PlusOne TEMED, PlusOne Ammonium Persulphate, PlusOne Glicine, Destreak Rehydration Solution, DeCyder Differential Analysis Software, Plus One Acrylamide Page, N,N'-Methylene Bis Acrylamide, il programma Image Quant, il sistema automatico di escissione degli spot Ettan Spot Picker sono distribuiti dalla ditta GE HEALTHCARE (ITALIA). Il terreno S.O.C. per batteri e i terreni M199 e DMEM per cellule, la tripsina EDTA 1x, il glucosio 100x per terreni di coltura cellulare, il "marker" di proteine precolorato e il "marker" di DNA (1kb plus), le membrane da dialisi, le membrane Dry-EASE Mini Cellophane, il gel precasting NuPAGE 12% BIS-TRIS-GEL, il NuPAGE MES SDS tampone di corsa, l'enzima di restrizione NcoI, le cellule competenti BL21(DE3) e la soluzione di TBE 10x, le cellule competenti DH5 α sono prodotti della ditta INVITROGEN (ITALIA). Il tampone tris-glicina-SDS, la soluzione di acrilammide/bisacrilammide 29.1, Il Non Fat Dry Milk, la Chromatographi columns, il tampone 5x per caricare i campioni di proteine su SDS-PAGE, i lisati batterici liofilizzati di E.Coli e la soluzione Bradford per la determinazione della concentrazione proteica sono prodotti dalla ditta BIO RAD (USA). Gli anticorpi primari Anti-insulina e Anti-peptide C sono prodotti dalla LINCO mentre Anti-Pdx-1 e Anti-glut-2 dalla CHEMICON, l'anticorpo secondario per l'immunofluorescenza Anti-guinea pig è distribuito dalla JACKSON LAB. invece quello anti-rabbit dalla MOLECULAR PROBES. Gli anticorpi AKT totale e Phospho AKT (Ser 473), Erk1 e 2 (p44/42) MAP Kinase totale e Phospho Erk1 e 2 (p44/42) MAP Kinase (Thr 202-tyr 204), sono prodotti dalla CELL SIGNALING TECHNOLOGY (USA). Il MOVIOL viene fornito dalla ditta CHEMICON. La pap-pen è distribuita dalla ZYMED. Filtri da 0.22 μ m e da 0.45 μ m e i tubi per congelare le cellule sono prodotti della ditta NALGENE PBI (ITALIA). I tubi Falcon da 15 e 50 ml, le piastre petri per i batteri, sono prodotti della ditta FALCON (ITALIA). La fosfatasi alcalina è un prodotto della New England Biolabs. La soluzione di etanolo, acido alfa-ciano-4-idrossi-cinnamico, acido sinapinico, sono un prodotto della ditta FLUKA (ITALIA). Le microsiringhe da 0.5 e 1 ml sono prodotte dalla ditta HAMILTON (SVIZZERA). Il metanolo è un prodotto della ditta ROMIL (INGHILTERRA). La carta 3MM è un prodotto della ditta WHATMAN (INGHILTERRA). Gli enzimi di restrizione KpnI e AvaI con i corrispettivi tamponi di restrizione L e B sono prodotti della ditta BOEHRINGER MANNHEIM (GERMANIA). Le pasticche di EDTA+Free, l'enzima di restrizione XhoI, la T7 DNA Ligasi sono prodotti forniti dalla ROCHE (GERMANIA). Contenitori da 200 ml per la mini e maxi preparazione di DNA plasmidico sono prodotti della ditta BECKMAN (USA).

Concentratori con 3000 Cutoff della ditta VIVASCIENCE. L'enzima TEV, è stato espresso e purificato all'Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare (IRBM) P. Angeletti (Pomezia). La linea cellulare PANC-1 è prodotta dalla ditta PROMOCHEM. SYPRO Ruby Protein Gel è prodotto dalla MOLECULAR PROBES. Gli spettrometri di massa utilizzati sono stati: Voyager DE sSTR (Applied Biosystems, USA), LCQ Deca XP Plus (ThermoFinnigan, USA). Desalificatori a fase inversa (μC_{18} ZipTip) sono prodotti dalla MILLIPORE.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare con stima ed affetto tutte le persone che hanno partecipato a questo lavoro.

Ringrazio il Prof. Davide Lauro, della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Roma TorVergata, per avermi ospitata nel suo laboratorio e consentito di svolgere questa Tesi di Dottorato, per aver contribuito alla mia crescita professionale. Ringrazio la Dott.ssa Giulia Donadel, che ha messo costantemente a mia disposizione la sua esperienza, la sua capacità didattica e per essere stata una guida sempre presente e fondamentale; il Dott. Marco Felice Lombardo, per avermi seguita negli esperimenti di immunofluorescenza, e per la sua infinita disponibilità. Ed ancora grazie ai "ragazzi" del gruppo di TorVergata, perché oltre ad avermi sostenuta nelle fasi quotidiane del lavoro, sono diventati carissimi amici: Luca Bova, la Dott.ssa Barbara Capuani, la Dott.ssa Fabiana De Angelis e il Dott. Davide Russo.

Dell'Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare P. Angeletti di Pomezia, ringrazio il Dott. Fabio Talamo, responsabile del laboratorio di Proteomica, per avermi accolta nel suo laboratorio e per avermi insegnato i fondamenti della Spettrometria di Massa, e la Dott.ssa Laura Orsatti, per aver messo a disposizione la sua esperienza nell'analisi Dige.

Dell'Università della Tuscia ringrazio la Prof.ssa Nicla Romano, per la critica costruttiva durante la stesura del lavoro.

Un grazie per ultimo, ma solo in ordine di tempo, ai miei genitori e a Giampaolo, per essermi stati sempre vicini, per avermi aiutata in ogni modo e per aver sopportato pazientemente le mie "paturnie"...

BIBLIOGRAFIA

Alldinger I., Ditter D., Peiper M., Fusco A., Chiappetta G., Staub E., Lorh M., Jesnowski R., Baretton G., Ockert D., Saeger H.D., Grutzmann R., Pilarsky C. *Gene analysis of pancreatic cell line reveals genes overexpressed in pancreatic cancer*. Pancreatology. 2004; 5, 370-379.

Ahmed M. and Bergsten P. Glucose-induced changes of multiple mouse islet proteins analysed by two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Diabetologia. 2005; 48: 477-485.

Allen T.C., Granville L.A., Cagle P.T., Haque A., Zander D.S., Barrios R. *Expression of glutathione s-transferase π and glutathione synthase correlates with survival in early stage non-small cell carcinomas of the lung*. Human Pathology. 2007; 38, 220-227.

Arden K. C., Boutin J-M, Djiane J., Kelly P. A., Cavenee W. K. *The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the some region of human chromosome 5*. Cytogenet Cell Genet. 1990; 53, 161-165.

Argetsinger L.S., Carter-Su C. *Molecular mechanisms of growth hormone action*. Physiol Rev 1996.

Barbour L.A., Shao J., Qiao L., Leitner W., Anderson M., Friedman J.E. and Draznin B. *Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle*. Endocrinology. 2004; 145 (3): 1144-1150.

Barrera-Saldana HA, Seeburg PH and GF Saunders. *Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone*. J. Biol. Chem. 1983; 258: 3787-3793.

Barsh GS, Seeburg PH and RS Gelinus. *The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus*. Nucleic Acids Res. 1983; 11: 3939-3958.

Bast A, Wolf G., Oberbaumer I., Walther R. *Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells*. Diabetologia 2002; 45: 867-876.

Beattie G.M, Cirulli V., Lopez A.D. and Hayek A. *Ex vivo expansion of human pancreatic endocrine cells*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1997; 82, 1852-1856.

Beattie G.M., Rubin J.S., Mally M.I., Otonkoski T. And Hayek A. *Regulation of proliferation and differentiation of human fetal pancreatic islet cells extracellular matrix, hepatocyte growth factor, and cell-cell cotact*. Diabetes 1996; 45, 1223-1228.

Bernat S. *In vitro differentiation of pancreatic β -cell*. Differentiation 2001; 68: 205-219

Beverly S. Chilton and Aveline Hewetson. *Prolactin and Growth Hormone Signaling*. Current Topics in Development Biology. 2005; 68:1-23

Birgitte N. Friedrichsen, Henriette E. Richter, Johnny A. Hansen, Christopher J. Rhodes, Jens H. Nielsen, Nils Billestrup and Annette Møldrup. *Signal Transducer and Activator of*

Transcription 5 Activation Is Sufficient to Drive Transcriptional Induction of Cyclin D2 Gene and Proliferation of Rat Pancreatic β -Cells. Molecular Endocrinology. 2003; 17; 945-958.

Bole-Feysot C., Goffin V., Edety M., Binart N. and Kelly P. A. *Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice.* Endocrine Reviews. 1998; 19, 225-268.

Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT and FE Smith. *A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development.* Diabetes. 1993; 42: 1715-20.

Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL and GC Weir. *Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion.* Diabetes. 1989; 38: 49-53.

Brelje T.C., Scharp D. W., Lacy P. E., Ogren L., Talamantes F., Robertson M., Friesen H. G., and Sorenson R. L.. *Effect of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islet to pregnancy.* Endocrinology. 1993; 132, 879-887.

Brelje T.C., Sorenson R.L.. *Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormone.* Horm. Metab. Res. 1997; 29, 301-307.

Brelje T.C., Stout L.E., Bhagroo N.V. and Sorenson R.L. *Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of Langerhans.* Endocrinology 2004; 145, 4162-4175.

Brubaker P. L. e Drucker D. J. Minireview: *Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system.* Endocrinology. 2004; 145: 2653-9.

Buteau J., Foisy S., Rhodes C.J., Carpenter L., Biden T.J., Prentki M. *Protein kinase C α activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta cell proliferation.* Diabetes. 2001; 50; 2237-43.

Buvat J.. *Hyperprolactinemia and sexual function in men.* Int J Impot Res. 2003; 15, 373-377.

Calò V., Migliavacca M., Bazan V., Macaluso M., Buscemi M., Gebbia N. and Russo A. *STAT proteins: From Normal Control of Cellular Events to Tumorigenesis.* Journal of Cellular Physiology. 2003; 197; 157-168.

Carter-SU C., King PJ A., Argetsinger L.S., Smit L.S., Vanderkuur J., and Campbell G.S.. *Signaling Pathway of GH.* Endocrine Journal. 1996; 43, S65-S70.

Casella C. and Taglietti V. *Principi di fisiologia. Volume II.* Ed. La goliardica Pavese. 1998. Pp. 787-823.

Casella C. and Taglietti V. *Principi di fisiologia. Volume I.* Ed. La goliardica Pavese. 1998. Pp. 827-829.

Castano P. *Anatomia umana.* Ed. Edi-Ermes (Milano, Italia) 1987; Pp 256-264.

Caufriez A., Frankenne F., Hennen G. and Copinschi G.. *Regulation of maternal insulin like growth factor 1 by placental growth hormone in pregnancy. Possible action of maternal IGF-1 on fetal growth.* Horm. Res. 1994; 42, 62-65.

Chakrabarti S. K. and Mirmira R. G. *Transcription factors direct the development and function of pancreatic beta-cells.* Trends Endocrinology metabolism. 2003; 14: 78-84.

Chawla RK, Parks JS and D Rudman. *Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic, and clinical aspects.* Annu. Rev. Med. 1983; 34: 519-547.

Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE and PH Seeburg. *The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution.* Genomics. 1989; 4: 479-497.

Chiang MH and CS Nicoll. *Human placental lactogen inhibits growth without changing serum levels of IGF-1 in rats: an apparent specific action of the hormone.* Acta Endocrinol. 1992; 127: 146-151.

Chow J.C., Ling P.R., Qu Z., Laviola L., Ciccarone A.M., Bristian B.R. and Smith R.J.. *Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylations of JAK2 and STAT5, but not Insulin Receptor Substrate-1 or SHC proteins in liver and Skeletal muscle of normal rats in vivo.* Endocrinology. 1996; 137, 2280-2286.

Clevenger C.V. and Plank T.L. *Prolactin as an autocrine/paracrine factor in breast tissue.* J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 1997; 2, 59-68.

Collier J.D., Bennett M.K., Hall A., Cattan A. R., Lendrum R., Bassendine M.F. *Expression of glutathione S- Transferases in normal and malignant pancreas: an immunohistochemical study.* Gut. 1994; 35: 266-269

Cui F., Wang Y., Wang J., Wei K., Hu J., Liu F., Wang H., Zhao X., Zhang X., Yang X. *The up-regulation of proteasome subunits and lysosomal proteases in hepatocellular carcinomas of the HBX gene knockin transgenic mice.* Proteomics. 2006; 6, 498-504

Dabbiri G.A., Young C.L., Rosenbloom J., Southwick F.S. *Molecular cloning of human macrophage capping protein cDNA.* The journal of biological chemistry. 1992; 267: 16545-16552.

Danielle Melloul. *Transcription factors in islet development and physiology. Role of PDX-1 in beta-cell function.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004; 1014, 28-37.

Darnell JE, Jr. *STATs and gene regulation.* Science. 1997; 277:1630-1635.

Das R., and Vonderhaar B.K.. *Involvement of SHC, GRB2, SOS and RAS in prolactin signal transduction in mammary epithelial cells.* Oncogene. 1996; 13, 1139-1145.

Dickson L.M. and Rhodes C.J. *Pancreatic β -cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein Kinase B in the Akt?* Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004; 287: E192-E198.

- Dor Y., Brown J., Martinez O. I. and Melton D. A.. *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation*. Nature. 2004, 429, 41-46.
- Dowling P., O'Driscoll L., O'Sullivan F., Dowd A., Henry M., Jeppesen P.B., Meleady P., Clynes M. *Proteomic screening of glucose-responsive and glucose non-responsive MIN-6 beta cells reveal differential expression of proteins involved in protein folding, secretion and oxidative stress*. Proteomics. 2006; 6, 6578-6587.
- Druker D.J. *Glucagon-like peptides: Regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis*. Molecular Endocrinology. 2003; 17, 161-171.
- Druker D.J. Minireview: *The glucagon-like peptides*. Endocrinology. 2001;142, 521-527.
- Druker D.J. *The Parathyroid hormone like peptide gene is expressed in the normal and neoplastic human endocrine pancreas* Molecular Endocrinology. 1989; 3, 1589-1595.
- Efrat S., et al. Diabetes Rev. 1996; 4: 224-234.
- Eriksson H., Frankenne F., Eden S., Hennen G. and B Von Schoultz. *Growth hormone 24-h serum profiles during pregnancy-lack of pulsatility for the secretion of the placental variant*. J. Obstet. Gynaecol. 1989; 96: 949-953.
- Feng Y., Lee N. and R. Fearon E. *TIP49 Regulates β -catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling*. Cancer research. 2003; 63, 8726-8734.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Science 1989. 246, 64
- Fernandes A, King LC, Guz Y, Stein R, Wright CV and G Teitelman. *Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets*. Endocrinology. 1997; 138: 1750-62.
- Finegood DT, Scaglia L and S Bonner-Weir. *Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model*. Diabetes. 1995; 44: 249-56.
- Forsyth IA. *Comparative aspects of placental lactogens: structure and function*. Exp Clin Endocrinol. 1994; 102: 244-51.
- Fowlkes J. and Freemark M.. *Placental Lactogen-Binding Sites in Isolated Fetal Fibroblasts: Characterization, Processing, and Regulation*. Endocrinology. 1993; 132 No. 6, 2477-2483.
- Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. Cell. 1997; 88, 435-7.
- Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J and G Hennen. *The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1988; 66: 1171-1180.
- Frankenne F, Scippo ML, Van Beeumen J, Igout A and G Hennen. *Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 182: 481-483.

- Freemark M, Comer M, Korner G and S Handwerger. *A unique placental lactogen receptor: implications for fetal growth*. *Endocrinology*. 1987; 120: 1865-1872.
- Freemark M. and Comer M.. *Purification of a Distinct Placental Lactogen Receptor, a New Member of the Growth Hormone/Prolactin Receptor Family*. *J. Clin. Invest.* 1989; 83, 883-889.
- Freemark M. and Handwerger S. *The role of placental lactogen in the regulation of fetal metabolism and growth*. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.* 1989; 8, 281-287.
- Freemark M., Keen A., Fowlkes J., Mularoni M., Comer M., Grandis A. and Kodack L.. *The placental lactogen receptor in maternal and fetal sheep liver: regulation by glucose and the role in the pathogenesis of fasting during pregnancy*. *Endocrinology*. 1992. 130, 1063-1070.
- Friedrichsen B.N., Galsgaard E.D., Nielsen J. H. And Moldrup A. *Growth hormone and prolactin-induced proliferation of insulinoma cells INS-1, depends on activation of STAT 5*. *Molecular Endocrinology*. 2001; 15, 136-148.
- Fujinaka Y., Sipula D., Garcia-Ocana A. and Vasavada R.C. *Characterization of mice doubly transgenic for parathyroid hormone-related protein and murine placental lactogen: A novel role for placental lactogen in pancreatic beta-cell survival*. *Diabetes*. 2004; 3120-3130.
- Fukuda S., L.M. Pelus. *Growth inhibitory effect of Hcc-1/ CIP29 is associated with induction of apoptosis, not just with G2/M arrest*. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005, 62, 1526-1527.
- Furge K.A., Zhang Y.W. and Vande Wound G.F. *Met receptor tyrosine Kinase: Enhanced signaling through adapter proteins*. *Oncogene*. 2000; 19, 5582-5589.
- Fusek M. and Vetvicka V. *Dual role of cathepsin D: ligand and protease*. 2005; *Biomed papers*; 149, 43-50
- Gahr S., Merger M., Bolheimer L.C., Hammerschmied C.G., Scholmerich J. and Hugl S.R. *Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of pancreatic beta-cells particularly in the presence of subphysiological glucose concentrations*. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2002; 28. 99-110.
- Galsgaard E. D., Nielsen J. H. and Møldrup A. *Regulation of Prolactin Receptor (PRLR) Gene Expression in Insulin-producing Cells. Prolactin and growth hormone activate one of the rat prlr gene promoters via stat5a and stat5b*. *J Biol Chem*. 1999; 274 (26), 18686-18692.
- Garcia-Ocana A, Gonzales-Pertusa J.A., Fujinaka Y. and Vasavada R.C. *Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is a beta-cell mitogen in vivo and in vitro through PI3K/PKC activation*. *Diabetes*. 2005; 54 (suppl. 1), A1647.
- Garcia-Ocana A, Vasavada R.C., Cebrian A., Reddy V., Takene K.K, Lopez-Talavera J.C. *Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice*. *Diabetes*. 2001; 50, 2752-2762.

Garcia-Ocana A, Vasavada R.C., Takene K.K., De Miguel and Stewart A.F. Parathyroid hormone-related protein. In F.L. Coe and M.J. Favus (Eds). Disorders of bone and mineral metabolism. 2002; 129-156.

Garcia-Ocana A., Takene K.K., Syed M.A., Philbrick W.M., Vasavada R.C. and Stewart A.F. *Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia.* Journal of Biological Chemistry 2000; 275, 1226-1232.

George DL, Phillips J, Fancke U and PH Seeburg. *The genes for growth hormone and chorionic somatomammotropin are on the long arm of human chromosome 17 in region q21 to qter.* Hum. Genet. 1981; 57: 138-141.

Gerich JE. *The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity.* Endocr. Rev. 1998; 19: 491-503.

German M.S., Wang J., Chadwick R.B., Rutter W.J. *Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex.* Genes Dev; 1992, 11, 2165-76

Gilbert S. F. *Biologia dello sviluppo.* Ed Zanichelli (Bologna, Italia) 2003. Pp 401-405.

Gilbert S. F. *Biologia dello sviluppo.* Ed Zanichelli (Bologna, Italia) 2001 Pp 273-319; 357-404.

Gmyr V., Kerr-conte J., Vandewalle B., Proye C., Lefebvre J., Pattou F.. *Human pancreatic ductal cells: large-scale isolation and expansion.* Cell Transplantations. 2001. 10: 109-21.

Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA and JA Martial. *Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals.* Endocr Rev. 1996; 17: 385-410.

Goffin V., Ferrag F., Kelly P. A. *Molecular aspects of prolactin growth hormone receptor.* LeRoith D. (ed) Advances in Mol Cell Endocrinol. 1998. 2, 1-33.

Goffin V., Kelly P. A. *The prolactin growth hormone receptor family structure function relationships.* Mammary Gland Biol Neopl. 1996; 2, 7-17.

Ghosh M., Song X., Mouneimne G., Sidani M., Lawrence D.S., Condeelis J.S. Cofilin promotes actin polymerization. Science. 2004; 304, 743-746.

Greco A. V. e Ghirlanda G. *Diabete mellito principi e pratica.* Verduci editore (ROMA, ITALIA) 1997. pp 13-18.

Grumbach MM, Melvin M and SL Kaplan. *On the placental origin and purification of chorionic "Growth Hormone-Prolactin" and its immunoassay in pregnancy.* Trans NY Acad Sci .1964; 27: 167-188.

Halban P. A. e Wier G. C. (1990). *Islet cells hormones: production and degradation. Principles and practice of endocrinology and metabolism.* J. B. Lippincott ed. (Philadelphia, USA) pp 1068-73.

- Hardikar A.A., Marcus-Samules B., Geras-Raaka E., Raaka Bruce M. and Gershngonrn M.C.. *Human pancreatic precursor cell secrete FGF2 to stimulate clustering into hormone-expressing islet-like cell aggregates*. PNAS. 2003; vol.100, 12: 7117-7122.
- Hill C.S., Treisman R. *Trascriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity*. Cell 1995, 80, 199-211.
- Hill DJ, Freemark M, Strain AJ, Handweger S and RD Miller. *Placental lactogen and growth hormone receptors in human fetal tissues: relationship to fetal plasma human placental lactogen concentrations and fetal growth*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1988; 66: 1283-1290.
- Hillenkamp F., Karas M., Beavis R.C., Chait B.T. Anal. Chem. 1991; 63, 1193
- Hirt H, Kimelman J, Birnbaum MJ, Chen EY, Seeburg PH, Eberhardt NJ and A Barta. *The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations*. DNA (NY) 1987; 6: 59-70.
- Hoffroge R., Mikkat S., scharf C., Beyer S., Christoph H., Panhke J., Mix E., Barth M., Uhrmacher A., Zubrzycki Z.I., Miljan E., Volker., Rolfs A. *2-DE proteome analysis of a proliferating and differentiating human neuronal stem cell line (ReNcell VM)*. Proteomics; 6, 1833-1847.
- Hui H., Wright C., Perfetti R. *Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells*. Diabetes 2001; 50:785-796.
- Hutchings P.R., Cooke A., Dawe K., Waldmann H., Roitt I.M. *Active suppression induced by anti-CD4*. Eur. J Immunol. 1993; 23 (4) 965-8.
- Igout A, Scippo ML, Frankenne F and G Hennen. *Cloning and nucleotide sequence of placental hGH-V cDNA*. Arch. Int. Physiol. Biochem. 1988; 96: 63-67.
- Itkin-Ansari P., Levne F. *Sources of beta-cells for human cell-based therapies for diabetes*. Cell Biochemistry Biophysic. 2004; 40:103-12.
- Jara CS, Salud AT, Bryant-Greenwood GD, Pirens G, Hennen G and F Frankenne. *Immunocytochemical localization of the human growth hormone variant in the human placenta*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1989; 69: 1069-1072.
- Jatoi A., Alberts S.R., Foster N., Morton R., Burch P., Block M., Nguyen P.L., Kugler J. *Is bortezomil, a proteasome inhibitor, effective in treading cancer-associated weight loss? Preliminary results from the North central Cancer treatment Group*. Support care Cancer. 2005. 13: 381-386
- Jensen J., Pedersen E.E., Galante P., Hald J., Heller R.S., Hishibaschi M., Kegeyama R., Guillemot F., Serup P. And Madsen O.D. *Control of endodermal endocrine devlopment by Hes-1*. Nat Genet. 2000; 24:36-44.

- Lee J.H., Sun D., Cho K.J., Kim M.S., Hong M.H., Kim I.K., Lee J.S., Lee J.H. *Overexpression of human 27 kDa heat shock protein in laryngeal cancer cells confers chemoresistance associated with cell growth delay.* J Cancer Res Clin Oncol. 2007; 133:37-46
- Kajimoto Y., Watawada H., Matsuoka Ta., Kaneto H., Fujitani Y., Miyazaki J., Yamasaki Y. *Suppression of transcription factor Pdx-1/IPF1/IDX1 causes no decrease in insulin mRNA in MIN 6 cell.* J Clin Invest. 1997; 100:1840-1846.
- Karas M., Hillenkamp F. Anal. Chem. 1988; 60, 2299
- Kelly P. A., Djiane J., Postel-Vinay M. C., Edery M. *The prolactin growth hormone receptor family.* Endocr Rev. 1991; 12, 235-251.
- Korec M., *Islet growth factors: curing diabetes and preventing chronic pancreatitis?* J. Clin. Invest. 1993; 92: 1113-1114.
- Krakowski ML, et al. Am J Pathol 1999; 154 (3): 683-691.
- Lacy P. E. e Greider M. H. *Anatomy and ultrastructural organization of pancreatic islet.* Grune and Stratton II ed. (New York) 1979. Pp 907-919.
- Lacy P.E. *Pancreatic transplantation as a means of insulin delivery.* Diabetes care. 1982. 5; 93-97.
- Lappalainen P. and Drubin D.G. Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. Letter to Nature. 1997; 388 78-82.
- Larsson O., Dafgard E., Engstrom W., Zetterberg A. *Immediate effects of serum depletion on dissociation between growth in size and cell division in proliferating 3T3 cells.* J Cell. Physiol. 1986; 127 (2): 267-73
- Le Bras S., Miralles F., Basmaciogullari A., Czernichow P. And Scharfmann R. *Fibroblast Growth Factor 2 promotes pancreatic epithelial cell proliferation via functional fibroblast growth factor receptors during embryonic life.* Diabetes. 1998; 47, 1236-1242.
- Lee C. S., Sund N. S., Votamanink M. Z., Matschinsky F. M., Stoffers D. A., Koestne K. H. *Foxa 2 controls Pdx-1 gene expression in pancreatic beta-cells in vivo.* Diabetes. 2002; 51: 2546-51.
- Lewis U.J., Boneward L.F. and Lewis L.T.. *The 20,000 dalton variant of human growth hormone: Location of the amino acid deletions.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980; 92, 511-516.
- Li Y, Cao X, Li L.X., Brubaker P.L., Edlund H. and Druker D.J. *Beta-cell Pdx-1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and citoprotective actions of glucagon-like peptide-1.* Diabetes. 2005; 54, 482-491.

- Lippuner K., Zehnder H.J., Casez J.P., Takkinen R. and Jaeger P.. *PTH-related protein is released into the mother's bloodstream during lactation: Evidence for beneficial effects on maternal calcium-phosphate metabolism.* J. Bone Miner. Res. 1996; 11, 1394-1399.
- Lowman HB, Cunningham BC and JA Wells. *Mutational analysis and protein engineering of receptor-binding determinants in human placental lactogen.* J. Biol. Chem. 1991; 266: 10982-10988.
- Lu Y., Herrera P.L., Guo Y., Sun D., Tang Z., LeRoith D. *Pancreatic-specific inactivation of IGF-1 gene causes enlarged pancreatic islets and significant resistance to diabetes.* Diabetes 2004; 53, 3131-3141.
- Luft R., Efendic T., Hokfelt T., Johansson D., Arimura A. *Immunohistochemical evidence for the localization of somatostatin-like immunoreactivity in a cell population of the pancreatic islets.* Medical Biology. 1974. 52:428-430.
- Lumelsky N., Blondel O., Laeng P., Velasco I., Ravin R., McKay R. *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets.* Science. 2001; 292:1389-1394.
- Mani A., and Gelmann E.P. *The Ubiquitin-Proteasome pathway and its role in cancer.* Journal of clinical oncology. 2005; 23: 4776-4789.
- Marshall C.J. *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.* Cell. 1995; 80, 179-85.
- Martial J.A. and Cooke N.E. *In Central and Peripheral Regulation of Prolactin Function V.* Scampagnini, Ed. (Raven, New York, in press).
- Martial J.A., Hallewell R.A., Baxter J.D., Goodman H.D.. *Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria.* Science. 1979; 205, 602.
- Matias P.M., Gorynia S., Donner P., Carrondo M.A. *Crystal structure of the human AAA Protein RuvBL1.* The journal of biological chemistry. 2006. 281, 38918-38929
- Meda P., Kohen C., Kohen E., Rabinovitch A., Orci L. *Direct communication of homologous and heterologous endocrine islet cells in culture.* Journal of Cell Biology. 1982. 92:221-6.
- Miyaura C, Chen L, Appel M, Alam T, Inman L, Hughes SD, Milburn JL, Unger RH and CB Newgard. *Expression of reg/PSP, a pancreatic exocrine gene: relationship to changes in islet beta-cell mass.* Mol. Endocrinol. 1991; 5: 226-234.
- Moller C., Hansson A., Enberg B., Lobie P.E. and Norsterdt G.,. *Growth hormone (GH) induction of tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in cells transfected with rat GH receptor cDNA.* J. Biol. Chem. 1992; 267, 23403-23408.
- Moore D.D., Conkling M.A. and Goodman H.M.. *Human growth hormone: a multigene family.* Cell. 1982; 29, 285-286.

Movassat J., Beattie G. M., Lopez A. D., Portha B., Hayek A. *Keratinocyte growth factor and beta-cell differentiation in human fetal pancreatic endocrine precursor cells*. Diabetologia. 2003 46: 822-9.

Movassat J., Beattie G.M., Lopez A. D. and Hayek A. *Exendin 4 up-regulates expression of Pdx-1 and hastens differentiation and maturation of human fetal pancreatic cells*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2002; 87, 4775-4781.

Nakajima S., Doi R., Toyoda E., Tsuji S., Wada M., Coizumi M., Tulachan S.S., Ito D., Kami K., Mori T., Kawguchi Y., Fujimoto K., Hosatani R., Imamura M. *N-Cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma*. 2004; Clinical cancer research; 10, 4125-4133

Neville M. C., McFadden T. B., and Forsyth I. *Hormonal Regulation of Mammary Differentiation and Milk Secretion*. J. of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2002; 7, No. 1

Niall H. D., Hogan M.L., Sauer R., Rosenblum I.Y., Greenwood F. C.. *Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormone: evolution from a primordial peptide by gene reduplication*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1971; 68, 866.

Nicoll CS, Mayer GL and SM Russel. *Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties*. Endocr. Rev. 1986; 7: 169-203.

Orci L. *The insulin cell: its cellular environment and how it processes proinsulin*. Diabetic Metabolism Review. 1986. 2:71-106.

Otonkoski T, Cirulli V., Beattie G.M., Mally M.I., Soto G., Rubin J.S. *A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in fetal mesenchyme-induced pancreatic beta-cell growth*. Endocrinology 1996; 137, 3131-3139.

Otonkoski T., Beattie G.M., Rubin J.S., Lopez A.D., Baird A. and Hayek A. *Hepatocyte growth factor/scatter factor has insulinotropic activity in human fetal pancreatic cells*. Diabetes 1994; 43, 947-953.

Otonkoski T., Beattie T. M., Mally M. I., Ricordi C., Hayek A. J. *Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured fetal pancreatic cells*. Journal of Clinical Investigations. 1993. 92:1459-1467

Owerbach D., Rutter W.J., Martial J.A., Baxter J.D., Shows T.B. *Genes for growth hormone, chorionic somatomammotropin, and growth hormones-like gene on chromosome 17 in humans*. Science; 1980; 209 (4453); 289-92.

Parsons J. A., Brelje T. C., and Sorenson R. L.. *Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion*. Endocrinology. 1992; 130, 1459-1466.

Patel N., Alsat E., Igout A., Baron F., Hennen G., Porquet D. and Evain-Brion D.. *Glucose inhibits human placental GH secretion, in vitro*. J. clin. Endocrinol: Metab. 1995; 80, 1743-1746.

Perfetti R. and Hui H. *The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells.* Hormone and Metabolic Research. 2004; 36, 804-810.

Peterson F. C. and Brooks C. L.. *Different elements of mini-helix I are required for human growth hormone or prolactin action via the prolactin receptor.* Protein Engineering, Design & Selection. 2004; 17 No. 5, 417-424.

Peterson F. C. and Brooks C. L. *Identification of a Motif Associated with the Lactogenic Action of Human Growth Hormone.* J. Biol. Chem. 1997; 272, 21444-21448.

Piccoletti R., Maroni P., Bendinelli P., Bernelli-Zazzera A.. *Rapid stimulation of mitogen-activated protein kinase of rat liver by prolactin.* Biochem. 1994; 303, 429-433.

Qiu X.B., Lin Y.L., Thome K.C., Pian P., Schlegel B.P., Weremowicz S., Parvin J.D. *Dutta A. An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth.* The journal of biological chemistry. 1998; 273, 27786-27793.

Radomsky N., Joest E. *Molecular Cloning of a Murine cDNA Encoding a Novel Protein, p38-2G4, which varies with the cell cycle.* Experimental cell research. 1995. 220, 434-445.

Raskin P., Fujita Y., Unger R. H. *Effect of insulin-glucose infusions of plasma glucagon levels in fasting diabetics and non-diabetics.* Journal of Clinical Investigations 1975; 56:1132-38.

Ridderstrale M. and Tornquist H. *Effects of tyrosine kinase inhibitors on tyrosine phosphorylations and the insulin-like effects in response to human growth hormone in isolated rat adipocytes.* Endocrinology. 1996; 137, 4650-4656.

Robertson R.P. *Islet transplantation as treatment for diabetes-a work in progress.* N. Engl. J. Med. 2004; 350, 692-705.

Rudin CM and CB Thompson. *Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death.* Annu. Rev. Med. 1997; 48: 267-81.

Rudnick A., Ling T.Y., Odagiri H., Rutter W.J., German M.S. *Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes.* Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994; 91 (25), 12203-7.

Rupangi C. Vasavada, Jose A. Gonzalez-Pertusa, Yuichi Fujinaka, Nathalie Fiaschi-Taesch, Irene Cozar-Castellano, Adolfo Garcia-Ocana. *Growth factor and beta cell replication.* The international Journal of Biochemistry & Cell Biology 2005; in press).

Ryan E.A., et al. *Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol.* Diabetes. 2001. 50: 710-719.

Scaglia L, Smith FE and S Bonner-Weir. *Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas.* Endocrinology 1995; 136: 5461-8.

Scippo ML, Frankenne F, Hooghe-Peters EL, Igout A, Velkeniers B and G Hennen. *Syncytiotrophoblastic localization of the human growth hormone variant mRNA in the placenta.* Mol. Cell. Endocrinol. 1993; 92: R7-R13.

- Serby M.J., Barta A., Baxter J.D., Bell G.I. and Eberhardt N.L.. *Analysis of a Major Human Chorionic Somatomammotropin Gene* J. Mol. Biol. Chem. 1984; 259 No. 21, 13131-13138.
- Shapiro A.M et al. *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N. Engl. J. Med. 2000; 343, 230-238.
- Shine J., Seeburg P.H., Martial J.A., Baxter J.D., Goodman H.M. *Construction and analysis of recombinant DNA for human chorionic somatomammotropin*. Nature 1977. 270, 494.
- Shome B. and Parlow A.F.. *Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1977; 45, 1112.
- Singh R.N.P., Seavey B.K. and Lewis W.J. Heterogeneity of human growth hormone. *Endocrinology Res. Commun.* 1974; 1, 449-484.
- Sitek B., Luttes J., Marcus K., Kloppel G., Schmieghel W., Meyer H., Hahn S.A., Stuhler K. *Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Proteomics. 2005. 5, 2665-2679.
- Smallwood P., Munoz-Sanjuan I., Iong P., Macke J, Henry S., Gilebert D. *Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:9850-9857.
- Shon D., Totzke G., Schulze- Osthoff K., Janicke U.R. *Friend or foe? The proteasome in combined cancer therapy*. Cell Cycle. 2006; 5:8, 841-845.
- Somers W., Ultsch M., De Vos A. M. and Kossiakoff A. A.. *The X-ray Structure of a Growth Hormone-Prolactin Receptor Complex*. Nature 1994; 372; 478-481.
- Sorenson R. L. and Brelje T. C.. *Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: Beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones*. Horm. Metabolic Res. 1997; 29, 301-307.
- Sorenson RL and Stout LE. *Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis*. Endocrinology 1995; 136, 4092-4098.
- Stoffers DA, Stanojevic V, Habener JF. *Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of dominant negative isoprotein*. J Clin Invest. 1998; 102: 232-241.
- Stuart K.A., Rioardan S.M., Lidder S., Crostella L., Williams R. and Skouteris G.G. *Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signaling*. International Journal of Experimental Pathology 2000; 81, 17-30.
- Sussel L., Kalamaras J., Hartigan-O'Connor D.J., Meneses J.J., Pedersen R.A., Rubenstein J.L., German M.S. *Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells*. Development. 1998, 125 (12) 2213-21.
- Svenne I. *Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus*. Diabetologia. 1992; 35: 193-201.

Taglietti V., Casella C. *Elementi di fisiologia e biofisica della cellula*. ed. La Goliardica pavese (Pavia, Italia) 1991.

Takeda T, Kurachi H, Yamamoto T, Homma H, Morishige K, Miyake A, and Y Murata. *Participation of JAK, STAT and unknown proteins in human placental lactogen-induced signaling: a unique signaling pathway different from prolactin and growth hormone*. J. Endocrinol. 1997; 153: R1-R3.

Trucco M., *Regeneration of pancreatic β cell*. The Journal of Clinical Investigation. 2005;115, 5-12.

Trumper A., Trumper K and Horsch D. *Mechanism of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta (INS-1)-cell*. Journal of Endocrinology 2002; 174, 233-246.

Ulrich A.B., Schmied B.M., Standop J., Schneider M.B., Lawson T.A., Fries H., Sandberg A.A., Buchler M.W., Pour P.M. *Differences in the expression of glutathione S-transferases in normal pancreas, chronic pancreatitis, secondary chronic pancreatitis and pancreatic cancer*. 2002; Pancreas; 24, 291-297.

Vasavada R.C., Pertusa-Gonzalez J.A., Taesch-Fiaschi Y.F.N., Castellano Cozar I., Garcia-Ocana A. *Growth factors and beta cell replication* IJBCB 2005; in press.

Vasavada RC, Garcia-Ocana A, Zawulich WS, Sorenson RL, Dann P, Syed M, Ogren L, Talamantes F and AF Stewart. *Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia*. J. Biol. Chem 2000; 275: 15399-15406.

Villanueva-Penacarrillo M.L., Cancelas J., de Miguel F., Redondo A., Valin A., Valverde I., Esbrit P. *Parathyroid hormone-related peptide stimulates DNA synthesis and insulin secretion in pancreatic islets*. J Endocrinol. 1999. 163 (3) 403-8.

Wang Q., Li Xu E., Wong V., Rhodes C. and Brubaker P.L. *Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein Kinase B in pancreatic INS-1 beta cell*. Diabetologia 2004; 47, 478-487.

Weir S.B. and Weir G.C. *New sources of pancreatic β -cells*. Nature biotechnology. 2005; 23, 857-861.

Williams D and I Boime. *Cytological localization of placental lactogen messenger ribonucleic acid in syncytiotrophoblast layers of human placenta*. Endocrinology 1980; 107: 761-765.

Williams G. and Bloom S. R. *Somatostatin and pancreatic polypeptide*. International textbook of diabetes mellitus (John Wiley and sons Chicester, England). 1992. pp 341-355.

Wood Z.A., Schroder E., Harris J.R. and Poole L.B. *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxin*. Trends In Biochemical Sciences. 2003. 28 (1), 32-40.

Woodside B., Abizaid A. and Walker C.. *Changes in leptin levels during lactation: Implications for lactational hyperphagia and anovulation*. Horm. Behav. 2000; 37, 353-365.

Writing team for the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications research group. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes interventions and complications (EDIC) study. Jama 2003; 290, 2159-2167.

Young C.L., Feierstein A., Southwick F.S. *Calcium regulation of actin filament capping and monomer binding by macrophage capping protein*. The journal of biological chemistry. 1994. 269, 13997-14002.