



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

---

Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole  
XVIII Ciclo del Dottorato di Ricerca in Scienze Biomolecolari  
Settore scientifico-disciplinare BIO/10 (Biochimica)

***Approcci di Proteomica e Glicomica  
nell'epatocita normale e patologico***

Dottorando

***Sabrina Semeraro*** 174

CS

Coordinatore

***Prof. Franco Vittur***

Università degli Studi di Trieste

Tutore

***Dott. Amedeo Vetere***

Università degli Studi di Trieste

# INDICE

<b><u>1: INTRODUZIONE.</u></b>	<b>1</b>
1.1 L'epatocarcinoma cellulare: epidemiologia ed eziologia.....	5
1.2 La glicomica, una dolce promessa.....	11
1.2: <i>I- Strategie di studio: l'innovazione della glicomica         con gli strumenti della proteomica.....</i>	16
1.3 Le glicoproteine.....	26
1.3: <i>I- Classificazione.....</i>	27
1.3: <i>II- Biosintesi.....</i>	28
1.3: <i>III- Principali funzioni dei glicani.....</i>	34
1.3: <i>IV - Alterazioni della glicosilazione nella         trasformazione neoplastica.....</i>	36
<b><u>2: SCOPO DELLA TESI.</u></b>	<b>46</b>

**3: MATERIALI E METODI.****48**

3.1 Materiali.....	49
3.1: <i>I- Colture cellulari</i> .....	51
3.2 Estrazione delle proteine di membrana.....	51
3.2: <i>I- Metodo 1</i> .....	51
➤ <i>Quantificazione delle proteine</i> .....	52
3.2: <i>II- Metodo 2</i> .....	53
➤ <i>Cinetica di biotinilazione</i> .....	54
➤ <i>Preparazione della colonna "ImmunoPure Immobilized Monomeric AvidinGel"</i> .....	54
➤ <i>Purificazione delle proteine estratte</i> .....	55
SDS-PAGE.....	55
➤ <i>Western blot delle porteine biotinilate</i> .....	56
3.3 Elettroforesi bidimensionale.....	57
3.3: <i>I- Prima dimensione: focalizzazione isoelettrica (IEF)</i> ....	57
3.3: <i>II - Seconda dimensione: SDS - PAGE</i> .....	59
3.4 Metodi di colorazione dei gel.....	59
3.5 Digestione in gel di proteine separate mediante SDS - PAGE.....	61
3.5: <i>I- "Destaining" degli spot proteici</i> .....	61
3.5: <i>II- Riduzione e alchilazione</i> .....	62
3.5: <i>III - Digestione con tripsina</i> .....	63

3.6 Analisi dei peptidi.....	64
3.7 Immunocitochimica.....	65
3.8 Protocolli di <i>N</i> -deglicosilazione.....	67
3.9 Analisi dei glicani.....	69
<b><u>4: RISULTATI.</u></b>	<b>71</b>
4.1 Estrazione delle proteine.....	72
4.2 Purificazione delle proteine estratte.....	76
4.3 Elettroforesi bidimensionale.....	80
4.4 Spettrometria di massa.....	88
4.4: <i>I</i> - Analisi dei peptidi.....	88
4.4: <i>II</i> - Proteine identificate:HEAT SHOCK PROTEINS.....	97
4.4: <i>III</i> - Analisi dei glicani.....	108
<b><u>5: DISCUSSIONE.</u></b>	<b>115</b>
<b><u>6: CONCLUSIONI.</u></b>	<b>127</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA.</u></b>	<b>130</b>

# 1. INTRODUZIONE

In tutto il mondo, ogni anno, vengono diagnosticati più di 10 milioni di nuovi casi di tumore maligno. Secondo l'ultimo "World Cancer Report" dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), l'incidenza complessiva di queste neoplasie è in crescita e si stima che entro il 2020 saranno 15 milioni le persone che svilupperanno un cancro.

Lo stesso report rivela, inoltre, che circa il 12% di tutti i decessi è attribuibile ai tumori e che ogni anno muoiono per neoplasie più di 6 milioni di persone tra tutta la popolazione mondiale.

In Italia le forme tumorali sono al secondo posto fra le grandi cause di morte, subito dopo le malattie cardiovascolari: le ragioni principali del peso sempre maggiore del cancro nelle società industrializzate risiedono innanzitutto nell'esposizione prolungata ad agenti nocivi, nell'alimentazione e nello stile di vita. Inoltre, sfortunatamente, in moltissimi casi un tumore viene diagnosticato e trattato quando ormai è troppo tardi e le cellule trasformate hanno invaso altri tessuti. Ad esempio più del 60% di pazienti con tumore al seno, polmone, colon, ovaio e fegato presentano, al momento della diagnosi, colonie metastatiche che pregiudicano il successo di qualsiasi trattamento terapeutico.

Il grado di malignità di un tumore dipende generalmente da numerosi fattori, quali la motilità e la capacità invasiva delle cellule trasformate, la loro adesione a cellule e a tessuti di tipo diverso, la distruzione della matrice extracellulare, la

vascolarizzazione del tessuto circostante, la sensibilità agli stimoli proliferativi e/o apoptotici, ecc<sup>[1]</sup>.

Ciascuno di questi eventi è sostenuto da una fitta rete di interconnessioni molecolari che coinvolgono sia il citoplasma che la superficie cellulare.

La membrana plasmatica è il compartimento cellulare che, per la sua peculiare posizione di interfaccia e grazie alle funzioni specializzate dei lipidi e proteine immersi nel doppio strato fosfolipidico, gioca un ruolo cruciale nello scambio di informazioni tra cellula e ambiente circostante o tra un organello e il citoplasma.

Una serie di studi sulla morfologia delle cellule eucariotiche hanno rivelato già nel 1960 che la superficie di tutte le cellule è circondata da un abbondante ed eterogeneo strato di zuccheri complessi chiamato glicocalice, formato dalle catene di carboidrati legate ai lipidi e alle proteine di membrana<sup>[2]</sup>.

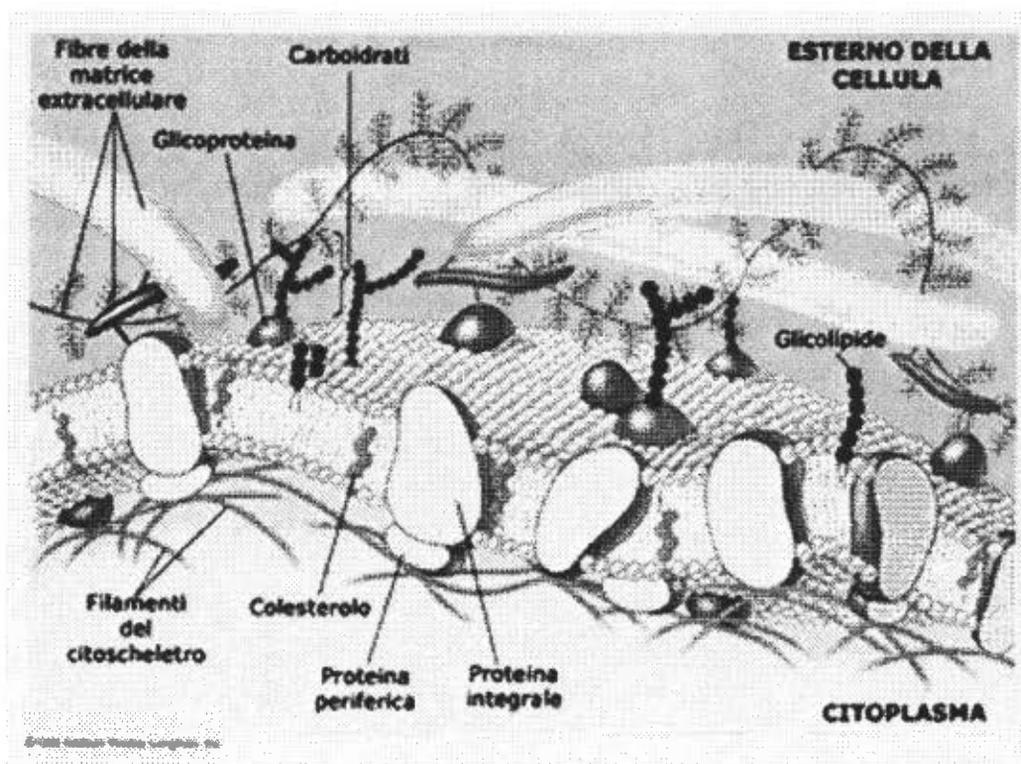


Figura 1. Rappresentazione schematica della membrana plasmatica.

La glicosilazione è la modificazione post-traduzionale più frequente e ubiquitaria ed è quella che conferisce il più alto grado di variabilità alle molecole modificate: inoltre, proprio per l'eterogeneità, l'abbondanza e la complessità strutturale della componente saccaridica è anche la modificazione dotata del maggior grado di informazione.

In generale, molti lipidi e proteine, soprattutto nelle cellule eucariotiche, subiscono variazioni della loro struttura per aggiunta di gruppi chimici: le proteine vengono sottoposte a più di 200 differenti tipi di modificazioni biochimiche, tra cui la fosforilazione, la glicosilazione, l'acetilazione, la farnesilazione, la miristilazione, la palmitoilazione. Tali modificazioni rappresentano un importante meccanismo di regolazione della fisiologia e della funzionalità della cellula, in quanto sono in grado di guidare l'indirizzamento dei lipidi e proteine modificate, modularne l'attività e mediare i processi di comunicazione e riconoscimento cellulare.

La componente oligosaccaridica delle glicoproteine di membrana viene coinvolta e continuamente rimaneggiata in diversi processi biologici, che vanno dalla regolazione del sistema immunitario alla comunicazione cellulare, dallo sviluppo embrionale alla capacità patogenetica degli agenti infettivi, dal ripiegamento della catena lineare dei polipeptidi fino allo sviluppo dei tumori e di altre importanti patologie<sup>[3]</sup>.

Di particolare interesse è il fatto che già dal 1970 è stato osservato che l'alterazione dello stato di glicosilazione delle proteine sulla superficie cellulare è una delle principali modificazioni biochimiche in grado di modulare la promozione o l'inibizione della progressione tumorale<sup>[4]</sup>. E' stata dimostrata

un'aberrante glicosilazione praticamente in tutti i tipi di tumore e sebbene l'interesse per i carboidrati complessi sia andato via via aumentando, la glicobiologia, e in particolare la glicomica -"scienza che studia i carboidrati espressi a livello cellulare"-, ha vissuto finora un ruolo di Cenerentola nei confronti della genomica e proteomica, sorelle ben più fortunate<sup>[5]</sup>.

Gli enormi progressi fatti nel campo della comprensione, a livello genico, dei complessi eventi molecolari che sono alla base della trasformazione neoplastica, non trovano un corrispondente incremento degli studi delle alterazioni dei profili di glicosilazione.

Questo si è verificato non per negligenza della comunità scientifica, bensì, in parte, perché la glicomica propone un approccio innovativo per la ricerca sul cancro, forse più difficile da cogliere, in quanto dà risalto al ruolo dei carboidrati piuttosto che a quello di oncogeni e oncosoppressori: molte volte, infatti, in uno stato patologico, l'alterato profilo proteico di una cellula o tessuto non è semplicemente il risultato di un'alterata espressione genica, ma anche di un'alterata modificazione post-traduzionale delle proteine coinvolte. Inoltre, fino a qualche anno fa, mancavano gli strumenti tecnologici in grado di decifrare e di sintetizzare in maniera rapida e riproducibile le molecole glicidiche, addirittura più complesse degli acidi nucleici e delle proteine. Il miglioramento delle procedure di analisi e sequenziamento molecolare e della bioinformatica, ha semplificato notevolmente lo studio delle molecole saccaridiche<sup>[4]</sup>.

Seppur lentamente, le sorti della glicomica sono destinate a cambiare, soprattutto riguardo alla comprensione e alla caratterizzazione dei profili glicoproteici delle cellule neoplastiche; l'interesse per le glicoproteine è rivolto, in

particolare, alla scoperta di nuovi marker tumorali, al fine di sviluppare strumenti diagnostici e prognostici efficaci, agenti terapeutici mirati e di studiare, a livello biologico, il comportamento delle cellule trasformate.

## **1.1 L'EPATOCARCINOMA CELLULARE: EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA.**

L'epatocarcinoma cellulare (HCC) è il più frequente tumore primitivo del fegato. E' al quinto posto tra le neoplasie più comuni nel mondo con circa 600.000 nuovi casi l'anno e quasi un milione di morti all'anno (OMS, 2001).

Il tasso d'incidenza è in costante aumento, sia nei paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo, e varia profondamente tra un'area geografica ed un'altra: è molto elevato in Asia (Cina, Singapore e Taiwan) e Africa (Mozambico, Zimbabwe ed Etiopia) con oltre 100 casi l'anno/100.000 abitanti, seguiti dai paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo (5-20 casi l'anno/100.000 abitanti). Una bassa incidenza, inferiore ai 5 casi l'anno/100.000 abitanti, si riscontra invece negli stati del Nord Europa, in Gran Bretagna e negli Stati Uniti.

L'HCC è quattro volte più frequente nel sesso maschile che in quello femminile, e tale differenza è ancora più marcata nelle aree a maggiore incidenza. Inoltre l'età di presentazione della malattia va dalla 3<sup>a</sup> alla 5<sup>a</sup> decade di vita nelle regioni ad alta incidenza mentre in quelle ad incidenza minore, l'epatocarcinoma è diagnosticato più spesso tra la 5<sup>a</sup> e l'8<sup>a</sup> decade.

La distribuzione geografica trova ragione in fattori genetici della popolazione e, soprattutto, nel diverso grado di esposizione ai maggiori fattori di rischio. Le principali cause favorevoli allo sviluppo di un HCC sono rappresentate da infezioni virali croniche (HBV e HCV), cirrosi epatica, intossicazione da aflatoossina B1, abuso alcolico, emocromatosi e altre malattie genetiche. I fattori di rischio minori comprendono il fumo, gli steroidi anabolizzanti, i contraccettivi orali e alcune malattie metaboliche (tirozinemia, sindrome di Wilson, ecc.).

Su scala mondiale, le infezioni virali rappresentano la più comune causa di HCC. In particolare, due sono i virus associati alla malattia, il virus dell'epatite B (HBV) e quello dell'epatite C (HCV).

Oltre il 70% dei casi di epatocarcinoma cellulare sono riconducibili ad infezione da HBV. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, sono approssimativamente 2 miliardi i soggetti infettati dal virus e circa 350 milioni i portatori cronici. I paesi più colpiti sono quelli in via di sviluppo, soprattutto il sud-est asiatico e l'Africa sub-Sahariana, dove la maggior parte della popolazione contrae il virus entro i primi dieci anni di vita, per via materno-fetale o per contagio intrafamiliare. Per un portatore di epatite B il rischio di sviluppare un tumore epatico è ben 100 volte maggiore rispetto ad un soggetto non infetto. Il virus dell'epatite B è causa di danno epatico cronico in quanto è in grado di scatenare, nell'organismo ospite, una risposta infiammatoria persistente associata a rigenerazione tissutale e fibrosi; da ultimo si sviluppa cirrosi, condizione che predispone all'HCC.

Non tutti i casi di epatocarcinoma HBV-positivi evolvono da una pregressa cirrosi; molteplici evidenze epidemiologiche, studi di biologia

molecolare e su modelli animali suggeriscono che il virus può avere un ruolo addizionale come promotore dell'epatocarcinogenesi, stimolando la proliferazione cellulare indipendentemente dalla presenza di cirrosi<sup>[6]</sup>.

L'HBV può indurre mutagenesi e quindi trasformazione neoplastica degli epatociti infetti attraverso diversi meccanismi: direttamente, mediante l'azione di proteine virali, o indirettamente, a seguito dell'integrazione di porzioni del genoma virale (DNA parzialmente bicatenario) in quello della cellula ospite, che può causare delezioni, mutazioni, traslocazioni, riarrangiamenti o alterazioni di svariati geni cellulari.

Alcune proteine virali (proteina X -HBx- e proteine Pre-S/S) sono in grado di transattivare geni cellulari cruciali per la proliferazione e trasformazione neoplastica (*c-fos*, *c-jun*, *c-myc*) e di modificare il processo apoptotico, sia inducendolo che inibendolo, attraverso l'interazione con p53 ed Rb.

Nei paesi industrializzati, invece, la causa più frequente di epatocarcinoma è l'infezione del virus dell'epatite C (HCV). Ogni anno 3-4 milioni di persone entrano in contatto col virus e il numero dei portatori cronici è stimato intorno a 170 milioni di persone: tra l'1% ed il 5% di essi probabilmente svilupperà l'HCC (OMS, 2001).

Il virus si trasmette per lo più per via parenterale, ma la grande maggioranza dei soggetti portatori non sa di essere infetta né ricorda di essersi esposta ad uno dei conosciuti fattori di rischio noti. Dopo l'infezione solo il 20% dei casi guarisce, mentre il restante 80% evolve verso l'epatite cronica; il 20-35% di essi progredisce verso la cirrosi epatica nel giro di 10 anni. Ogni anno, dall'1 al 4% degli individui con cirrosi sviluppa un carcinoma epatico.

Il virus dell'epatite C è in grado di indurre un'infezione cronica e di persistere all'interno dell'organismo ospite grazie alla sua capacità di mutare continuamente, sfuggendo così al controllo immunitario. Un'altra possibile spiegazione dell'alto tasso di cronicizzazione risiede nella tendenza del virus ad infettare le cellule immuno-competenti, alterando così la normale risposta alle infezioni, compresa quella allo stesso HCV.

Ancora piuttosto oscuri sono i meccanismi con cui HCV può indurre l'epatocarcinoma in maniera indipendente dalla cirrosi. Si tratta di un virus a RNA a singolo filamento della famiglia Flaviviridae e, contrariamente all'HBV, è privo della capacità di integrare il proprio genoma, o parti di esso, nel DNA dell'epatocita. Potrebbe perciò giocare un ruolo indiretto nell'eziopatogenesi dell'HCC, ad esempio in pazienti con infezione occulta da HBV o in pazienti alcolisti cirrotici, determinando un effetto aggiuntivo sui processi necrotici e proliferativi.

Recenti studi hanno infine dimostrato l'effetto trans-regolatore di alcune proteine del *core* di HCV sulle funzioni cellulari: l'espressione di tali proteine sarebbe in grado di promuovere la crescita cellulare, attraverso la *down-regulation* di p53<sup>[7]</sup>, inibire *in vitro* l'apoptosi<sup>[8]</sup> e di trasformare fibroblasti embrionali di ratto<sup>[9]</sup>.

In particolari aree geografiche, quali India, Cina, Sud Africa, Gambia, Mozambico e Senegal, l'elevata incidenza dell'epatocarcinoma è legata in buona parte anche all'esposizione ad una micotossina che contamina alcuni alimenti, come riso, noccioline, mais, conservati in modo inadeguato. L'aflatossina B1 (AFB1) è un metabolita del fungo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* ed è uno dei cancerogeni epatici più potenti oggi

conosciuti. Questa tossina richiede una conversione metabolica a epossido per indurre un'ampia varietà di addotti su DNA; una di queste modificazioni, l'addotto AFB1-formamidopirimidina, è il principale candidato per la mutagenesi epatica, che si manifesta prevalentemente sottoforma di trasversioni GC→TA. In più del 50% dei campioni di HCC provenienti da aree del mondo dove l'esposizione ad AFB1 è alta, è stata trovata una mutazione specifica G→C nel codone 249 del gene p53: il motivo per cui solo questa mutazione sia presente in epatocarcinomi legati all'esposizione ad AFB1, non è ancora chiaro.

Studi epidemiologici indicano che l'aflatossina B1 gioca un ruolo sinergico con l'infezione da parte del virus dell'epatite B nell'induzione di carcinomi epatocellulari: sebbene la contaminazione da AFB1 aumenta di per sé il rischio di HCC di tre volte, la presenza di entrambi i fattori di rischio aumenta di sessanta volte la probabilità di sviluppare la patologia.

Probabilmente il fattore di rischio più importante per l'HCC nell'uomo è costituito dalla cirrosi epatica: in Italia e nei paesi occidentali il 90% degli epatocarcinomi insorge in fegati cirrotici.

La cirrosi è una fibrosi diffusa del fegato associata alla trasformazione della normale architettura e alla vascolarizzazione dei noduli epatici; può svolgere un duplice ruolo nel processo oncogenetico, sia come fattore inducente che come fattore di promozione. Infatti, l'aumentato *turnover* cellulare secondario al danno necroinfiammatorio cronico e alla conseguente rigenerazione epatocitaria può contribuire direttamente ad aumentare la frequenza di mutazioni genetiche spontanee e successivamente possono selezionarsi cloni cellulari con caratteristiche di tipo neoplastico. In secondo luogo, la stimolazione della

proliferazione di cellule trasformate può promuoverne l'evoluzione verso la neoplasia conclamata.

E' noto che il rischio di HCC è variabile in funzione dell'eziologia della cirrosi, risultando elevato in soggetti con infezione da virus epatici (HBV e HCV) e basso in soggetti con cirrosi biliare primitiva e malattia di Wilson. L'eziologia della cirrosi influenza anche l'età di insorgenza del carcinoma epatico: i pazienti con infezione da HBV sviluppano infatti la neoplasia ad un'età più precoce rispetto ai pazienti con epatopatia di altra natura.

Il consumo eccessivo di bevande alcoliche è, dopo le infezioni virali, l'altra importante causa di epatocarcinoma nei paesi industrializzati. Una recente ricerca californiana ha dimostrato che un'eccessiva assunzione (oltre 80 g al giorno) di bevande alcoliche in maniera cronica per un periodo di dieci anni aumenta il rischio di insorgenza di carcinoma epatocellulare di ben 5 volte; tuttavia, i meccanismi mediante i quali l'alcool causa HCC non sono ancora del tutto chiari.

Infine, da lungo tempo è nota l'alta incidenza di epatocarcinoma in soggetti con cirrosi associata ad alcune malattie metaboliche quali l'emocromatosi, deficit di  $\alpha_1$ -antitripsina, tirosinemia ereditaria, morbo di Wilson, glicogenosi.

In generale, è possibile affermare che ogni insulto cronico al parenchima epatico, in grado di provocare un danno che si prolunga nel tempo, avvia la rigenerazione degli epatociti e contemporaneamente induce profonde modificazioni nella composizione della matrice; ambedue questi eventi

concorrono in maniera determinante allo sviluppo di foci neoplastici all'interno del fegato.

## 1.2 LA GLICOMICA, UNA DOLCE PROMESSA.

La glicomica è una disciplina emergente che si muove in un campo ancora poco sviluppato e viene descritta come una Cenerentola scientifica: *“Un’area che richiede un duro lavoro e, per diventare famosa e affascinante come le sue sorellastre, deve, ahimé, rimanere a casa mentre genomica e proteomica si fanno belle per andare alla festa da ballo. Ciò che ha salvato questa moderna Cenerentola dall’ombra non è la fata buona quanto piuttosto la messa a punto di nuovi metodi sintetici e analitici, tra cui la spettrometria di massa e la risonanza nucleare magnetica: ad ogni modo non è ancora possibile prevedere cosa accadrà alla glicomica scoccata la mezzanotte”*<sup>[5]</sup>.

Il termine glicomica è stato proposto verso la fine degli anni Novanta e si riferisce alla branca di studi dedicata alla caratterizzazione dell'intero complesso di glicani prodotti da un singolo organismo. Il termine è stato coniato in analogia a quello di genomica e proteomica, con il preciso intento di affiancare l'universo dei carboidrati a quello dei geni e delle proteine e di sottolinearne l'importanza<sup>[10]</sup>.

Con il sequenziamento del genoma umano è apparso evidente che le conoscenze ristrette esclusivamente alla sequenza di basi nucleotidiche non

erano sufficienti per comprendere e prevedere l'espressione, la funzione cellulare e l'attività di un gene nei normali processi fisiologici o in quelli patologici. Sono circa 30.000 i geni individuati col Progetto Genoma Umano ma si stima che il proteoma contenga più di 1 milione di proteine: questa discrepanza è dovuta in parte anche alle modificazioni post-traduzionali, tra cui appunto la glicosilazione<sup>[11]</sup>. Infatti, l'elevata complessità strutturale ed informativa che si può ottenere con la glicosilazione rende conto di questa enorme differenza. Le modificazioni post-traduzionali, quali appunto la glicosilazione, contribuiscono in maniera significativa alla creazione e al mantenimento della specificità fenotipica di un certo tipo cellulare. Da qui nasce l'esigenza di capire quanto e come le modificazioni post-traduzionali, in generale, e la glicosilazione in particolare, possano essere informative e specifiche. Tutto ciò accresce sicuramente la nostra comprensione della fisiologia ma anche e soprattutto la patologia di un tipo cellulare, tissutale e/o di un intero organo.

La mancanza di informazioni complete sul glicoma di una cellula o di un organismo non è da ricondurre alla mancanza di interesse per tali macromolecole, quanto piuttosto alla scarsità di strumenti adatti a decifrare il complesso di carboidrati espressi anche in una singola cellula: non esiste, infatti, un modo per amplificare i carboidrati, come per il DNA, e per gli oligosaccaridi non ci sono sequenziatori o sintetizzatori automatici<sup>[12]</sup>.

La glicomica è estremamente più complicata della genomica e della proteomica: i carboidrati sono macromolecole estremamente complesse ed

eterogenee. A differenza degli acidi nucleici e delle proteine, la maggior parte delle catene glicidiche presenta ramificazioni laterali e i monomeri da cui sono costituite possono unirsi tra loro attraverso più tipi di legame, grazie alla "quasi" equivalenza dei gruppi ossidrilici (non anomerici) di un monosaccaride che possono reagire in modo molto simile per formare un legame glicosidico. Ad esempio due monosaccaridi identici possono formare ben 11 diversi disaccaridi, mentre due  $\alpha$ -aminoacidi possono originare solo un unico  $\alpha$ -dipeptide. Anche in una sequenza glicidica brevissima è perciò racchiuso un immenso potenziale informativo codificato e i messaggi veicolati differiscono per il tipo di unità presente, per le differenze nei legami che li uniscono, per la presenza e il grado di ramificazioni e, infine, per la presenza o assenza di sostituenti non saccaridici (gruppi solfato, fosfato, piruvici, ecc.)<sup>[3]</sup>. Queste caratteristiche rendono, a tutti gli effetti, i carboidrati la terza classe di molecole bio-informative, accanto agli acidi nucleici e alle proteine<sup>[10]</sup>.

Considerate queste premesse, si può comprendere perché sia così difficile determinare l'organizzazione strutturale degli zuccheri complessi. Naturalmente l'interesse dei glicobiologi non si limita alla caratterizzazione strutturale delle macromolecole glicidiche: i carboidrati complessi sono mediatori di importanti processi biologici intra- ed extra- cellulari e tale scoperta ha accresciuto l'interesse verso lo studio della loro attività specifica.

In generale, catene oligosaccaridiche possono essere aggiunte a diverse molecole, quali proteine o lipidi, e influenzarne considerevolmente le proprietà chimico-fisiche e le funzioni; in particolare, l'espressione di strutture glicidiche

sulle componenti della membrana plasmatica sembra essere un evento chiave nei fenomeni di comunicazione e riconoscimento cellulare.

Nel tentativo di decifrare e classificare il proteoma non si può, perciò, prescindere dal decifrare e classificare il glicoma; d'altra parte, per caratterizzare il glicoma è indispensabile usufruire delle conoscenze acquisite dalla proteomica. Lo scambio di informazioni e di competenze tecnologiche tra queste due aree di studio è reciproco e fondamentale per il loro rapido sviluppo: qualcuno parla di glicoproteomica, trascinato dalla corrente che tende a rendere "omiche" tutte le scienze. Una tendenza, questa, estremamente attuale, nata con la genomica e seguita dalla proteomica, per la quale addirittura si comincia a parlare di trascrittomica, interattomica, di flussomica e di metabolomica. Non si tratta di semplice semantica, ma in realtà questi termini indicano un nuovo modo di affrontare la complessità biologica.

Anche la proteomica è in realtà una scienza relativamente nuova: il termine è stato introdotto per la prima volta nel 1994 a Siena, in riferimento allo studio del proteoma, cioè di tutte le proteine espresse in un compartimento cellulare, in intere cellule, in tessuti, in un organismo.

Nell'era post-genomica, studiare il proteoma, per non parlare del "glicoproteoma", rappresenta una sfida affascinante, dato che il pattern d'espressione di una cellula è estremamente dinamico e flessibile, sia nello spazio che nel tempo<sup>[13]</sup>.

In generale si possono definire tre principali settori in cui opera la proteomica: il proteoma d'espressione, il proteoma strutturale e il proteoma funzionale. Gli studi d'espressione sono finalizzati ad identificare e

caratterizzare qualitativamente e quantitativamente tutte le proteine e le loro variazioni d'espressione in risposta a segnali intra ed extra cellulari (condizioni di crescita diverse, stress cellulare, presenza di patologie, ecc.). La proteomica strutturale si occupa di caratterizzare la struttura, la localizzazione e le modificazioni post-traduzionali subite da uno specifico proteoma, mentre gli studi funzionali si propongono di definire la funzione biologica di proteine il cui ruolo è ancora sconosciuto e di identificare le interazioni proteina-proteina *in vivo*.

L'interesse della proteomica perciò non è solo quello di caratterizzare o di creare una completa mappa della localizzazione e delle attività di tutte le proteine in una cellula, tessuto o organismo ma anche quello di confrontare i pattern proteici derivanti rispettivamente da due sistemi differenti o dallo stesso sistema posto in differenti condizioni. In tal modo è possibile verificare la presenza di eventuali proteine espresse differenzialmente e che rappresentano sicuramente un punto cruciale per la comprensione dei meccanismi regolatori che stanno alla base del funzionamento e dell'adattamento cellulare a particolari stimoli biologici. Questo tipo di analisi si definisce "proteomica differenziale".

Simili progetti richiedono il contributo di diverse discipline tra le quali la biochimica, la biologia molecolare, la glicobiologia, la biofisica e la bioinformatica<sup>[14]</sup>.

Le opportunità della proteomica sono enormi e molto promettenti: comprendono per esempio la descrizione, a livello molecolare, dei meccanismi cellulari fisiologici e patologici, l'individuazione di nuovi marcatori per la diagnosi, anche precoce, delle malattie, la scoperta di nuovi target terapeutici per lo

sviluppo di farmaci efficaci e non tossici e per il monitoraggio dei trattamenti curativi <sup>[15]</sup>.

## **1.2: I - STRATEGIE DI STUDIO: L'INNOVAZIONE DELLA GLICOMICA CON GLI STRUMENTI DELLA PROTEOMICA.**

Per studiare il profilo d'espressione di tutte le proteine e caratterizzare quelle d'interesse è necessario prima un passaggio di separazione: generalmente i campioni biologici utilizzati nelle analisi contengono migliaia di specie proteiche differenti e la fase di separazione diventa indispensabile.

La tecnica d'elezione che consente di separare, quantificare ed identificare centinaia di proteine alla volta è l'elettroforesi su gel di poliacrilammide, condotta in una o due dimensioni<sup>[16]</sup>.

L'elettroforesi monodimensionale (1-DE) permette la separazione delle proteine esclusivamente in base al loro peso molecolare, in un intervallo compreso tra 10 e 300kDa<sup>[17][18]</sup>: è una tecnica molto semplice da utilizzare e con una buona riproducibilità, ma purtroppo è limitata da una capacità risolutiva non eccellente. Proteine che hanno peso molecolare identico o molto simile sono difficili da distinguere in quanto migrano alla stessa distanza in un gel e all'interno di una stessa banda è perciò possibile ritrovare una popolazione eterogenea di proteine.

In seguito a tali considerazioni, l'elettroforesi bidimensionale (2-DE) si è dimostrata una procedura ottimale per l'analisi globale di proteine. La tecnica, messa a punto da O'Farrel<sup>[19]</sup> e Klose nel 1975<sup>[20][21]</sup>, è il metodo più potente attualmente disponibile per separare contemporaneamente moltissime proteine diverse e ottenere informazioni circa il peso molecolare (PM), il punto isoelettrico (pI) e l'abbondanza relativa di ciascuna di esse.

La 2-DE sfrutta la combinazione di due procedure: la focalizzazione isoelettrica (IEF) come prima dimensione orizzontale e una elettroforesi su gel di poliacrilammide come seconda dimensione verticale.

L'IEF separa le proteine in base al loro punto isoelettrico e viene effettuata in un gel di acrilammide orizzontale contenente un gradiente di pH continuo. Inizialmente tale gradiente era creato da una miscela di anfoliti, polimerizzati in sottili capillari di vetro: al passaggio della corrente elettrica i carrier di anfoliti si allineavano in base al loro pI e formavano un gradiente di pH che permetteva l'IEF del campione<sup>[22][23]</sup>. Sebbene questo metodo sia stato impiegato in centinaia di studi di elettroforesi bidimensionale, presenta alcuni limiti che hanno ostacolato lo sviluppo di ulteriori applicazioni: la diversità dei lotti delle miscele di anfoline prodotte, l'instabilità dei gradienti di pH creati e la fragilità dei gel sono i principali fattori responsabili della scarsa riproducibilità delle separazioni ottenute. Negli ultimi anni è stato sviluppato un metodo alternativo, molto più riproducibile, nel quale l'isoelettrofocalizzazione si realizza su gradienti di pH "immobilizzati" nel gel di poliacrilammide (IPG), creati legando covalentemente al gel, subito prima di farlo polimerizzare, un gradiente di molecole cariche dette immobiline<sup>[24]</sup>. Un altro vantaggio è che l'IPG gel viene

fatto polimerizzare su un supporto di plastica (strip), molto più maneggevole e resistente. La forma e pendenza del gradiente e l'intensità del campo elettrico determinano il grado di risoluzione: in generale l'IEF viene condotta a voltaggi elevati (fino a 8000V)<sup>[25][26][27]</sup>.

La seconda dimensione è una classica SDS-PAGE verticale con gel omogenei o a gradiente.

Il risultato è una mappa di "spot", ciascuno corrispondente ad un'unica popolazione proteica, che possono essere ulteriormente separati, identificati e caratterizzati tramite la spettrometria di massa. Si possono creare mappe specifiche per un tipo o un compartimento cellulare<sup>[28]</sup>, per un tessuto<sup>[29][30]</sup> e per un organismo<sup>[31][32]</sup>, e compiere studi d'espressione delle proteine: confrontando mappe di campioni diversi (per esempio cellule normali e alterate) è possibile individuare la comparsa o la scomparsa di spot e valutarne l'intensità, raccogliendo così preziose informazioni per l'analisi qualitativa e quantitativa dei profili d'espressione.

L'elettroforesi bidimensionale è una tecnica piuttosto riproducibile ed ha il vantaggio di avere una capacità risolutiva molto elevata: grazie alla duplice separazione permette, infatti, di analizzare anche migliaia di proteine in un unico gel, di vedere gli effetti delle modificazioni post-traduzionali e delle mutazioni puntiformi<sup>[33]</sup>.

Per questi motivi, la 2-DE è risultata il metodo d'elezione per la separazione delle glicoproteine<sup>[34]</sup>, più semplice e indicato rispetto alle altre convenzionali tecniche separative quali la CE (elettroforesi capillare) e l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography)<sup>[35]</sup>. Il grosso vantaggio risiede nel fatto

che è in grado di risolvere diverse glicoforme di una stessa popolazione proteica: le glicovarianti appaiono come "trenini" di spot che differiscono sia per il punto isoelettrico sia per il peso molecolare<sup>[36]</sup>. E' noto, infatti, che i carboidrati alterano la massa apparente di una glicoproteina, fino al 50% della massa totale, e che la presenza, o l'assenza, di uno o più residui di acido sialico modificano il suo pI<sup>[34]</sup>.

Rimangono tuttavia ancora alcuni problemi che rallentano le analisi bidimensionali; essi dipendono sia dai tempi tecnici che dalla tipologia del campione proteico da analizzare. Ad esempio, proteine idrofobiche o di elevato PM non vengono focalizzate con facilità nella prima dimensione, similmente a quelle con pI estremi (inferiori a 3 e superiori a 10) che si accumulano ai lati delle strip e non vengono separate correttamente. Ancora, proteine poco espresse non permettono una buona risoluzione in un gel bidimensionale poiché il loro segnale viene oscurato da quello di proteine più rappresentate; ci possono essere contaminazioni tra spot molto vicini in uno stesso gel; infine, non si possono tralasciare tutti quei problemi legati alla variabilità, alla disponibilità, alla quantità, alla degradazione e alla contaminazione del campione biologico di partenza.

Nonostante ciò, la 2-DE rimane una tecnica dalle numerose potenzialità tanto che sta trovando un grande e crescente impiego in tutti gli studi proteomici che comprendono la separazione sistematica, l'identificazione e la quantificazione contemporanea di molte proteine in uno stesso campione. Altre applicazioni comprendono l'analisi della differenziazione cellulare, la ricerca di proteine che siano marker di malattie, l'osservazione degli effetti terapeutici, la ricerca di

nuovi farmaci, la ricerca sui tumori, il controllo sulla purezza di alcune sintesi e la purificazione di proteine su piccola scala<sup>[37][38][39]</sup>.

Alcuni di questi inconvenienti possono essere minimizzati con un'adeguata preparazione del campione, specificatamente adattata alle caratteristiche chimiche, alla localizzazione e all'abbondanza delle proteine d'interesse. Questo è particolarmente vero per le glicoproteine di superficie che rappresentano una piccola parte del proteoma di una cellula e, inoltre, la membrana plasmatica è un distretto assai difficile da isolare. Sulla base di queste considerazioni, in fase di preparazione del campione è necessario procedere attraverso un passaggio di purificazione e arricchimento proteico, per minimizzare l'effetto-ombra di proteine, o di altri contaminanti (cheratine, ecc.), più abbondanti. Esistono diverse strategie di estrazione delle proteine di membrana e nella scelta bisogna valutare la "qualità" del prodotto, che deve essere il più possibile privo di contaminazioni proteiche provenienti da altri compartimenti cellulari<sup>[40][41][42]</sup>.

Un'altra problematica è legata alla solubilizzazione delle proteine della superficie cellulare, la cui porzione transmembrana è altamente idrofobica. Per minimizzare la perdita del campione, migliorare la separazione e quindi la risoluzione di queste proteine, è opportuno condurre gli esperimenti in condizioni denaturanti, in presenza di agenti caotropici (urea, tiourea), riducenti (ditiotreitolo, tributil fosfina, ecc.) e tensioattivi (CHAPS, SDS, ecc.)<sup>[23][24]</sup>.

Una volta ottenuta la separazione delle proteine, gli spot sono riconoscibili sul gel solo in seguito ad una colorazione selettiva che li rende distinguibili dal fondo. Le proteine possono essere visualizzate con diversi

protocolli di colorazione: tutti i coloranti interagiscono in maniera specifica con esse per cui occorre scegliere la sostanza più opportuna in base allo scopo delle analisi (blotting, quantificazione, ecc.), alla compatibilità con altre tecniche (MS, ecc.) e alla sensibilità richiesta.

Tra i metodi più comuni, una colorazione abbastanza semplice, ma poco sensibile, è quella con il Blu Coomassie, che si lega alle proteine in rapporto stechiometrico costante: questo lo rende il colorante ideale per le misure densitometriche, volte a determinare la quantità reale delle proteine presenti<sup>[43][44][45]</sup>.

Esistono alcune soluzioni colloidali modificate di Blu Coomassie che raggiungono livelli di sensibilità più alti e riescono a rivelare anche 10 ng di proteina<sup>[46]</sup>.

Un'altra metodica largamente usata è la colorazione con nitrato d'argento che consente di ottenere informazioni molto più dettagliate e specifiche sulle proteine separate grazie ad una sensibilità dieci volte più elevata rispetto al Coomassie colloidale<sup>[47]</sup>.

Esistono poi alcuni coloranti per gel studiati per individuare specificatamente proteine con speciali modificazioni; un esempio è il Pro-Q Emerald 300, un'idrazide fluorescente che si coniuga in maniera selettiva ai residui oligosaccaridici e perciò permette di evidenziare le proteine glicosilate<sup>[48]</sup>.

Dopo la colorazione, le immagini del gel possono essere acquisite utilizzando scanner, laser densitometri o rilevatori di fluorescenza per consentire la visualizzazione e il confronto della posizione degli spot, anche in più gel. L'analisi delle mappe generate è un processo laborioso soprattutto perché nei

gel con profili contenenti centinaia di spot proteici è difficile notare la comparsa di qualche proteina o la scomparsa di alcune di esse. Per cogliere queste differenze e per poter ottenere il maggior numero possibile di informazione, sono stati sviluppati opportuni software che permettono la rimozione del background e degli artefatti di colorazione, facilitano l'intervento manuale dell'operatore e permettono la creazione automatica di mappe differenziali<sup>[50][51][52]</sup>.

Una proteina isolata e individuata in 2-DE viene quindi caratterizzata e identificata mediante tecniche di spettrometria di massa (MS).

La MS è una tecnica veloce, semplice, molto più sensibile dei tradizionali sequenziatori, tollerante verso un numero di contaminanti a basso peso molecolare e consente l'identificazione di proteine in miscele semplici, sulla base del loro peso molecolare e della sequenza aminoacidica.

In generale, uno spettrometro di massa è uno strumento in grado di ionizzare le molecole in esame e di separarle in fase gassosa in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ); i risultati vengono consegnati sottoforma di uno spettro di massa, cioè una serie di picchi di intensità variabile la cui posizione corrisponde ad un determinato valore  $m/z$ .

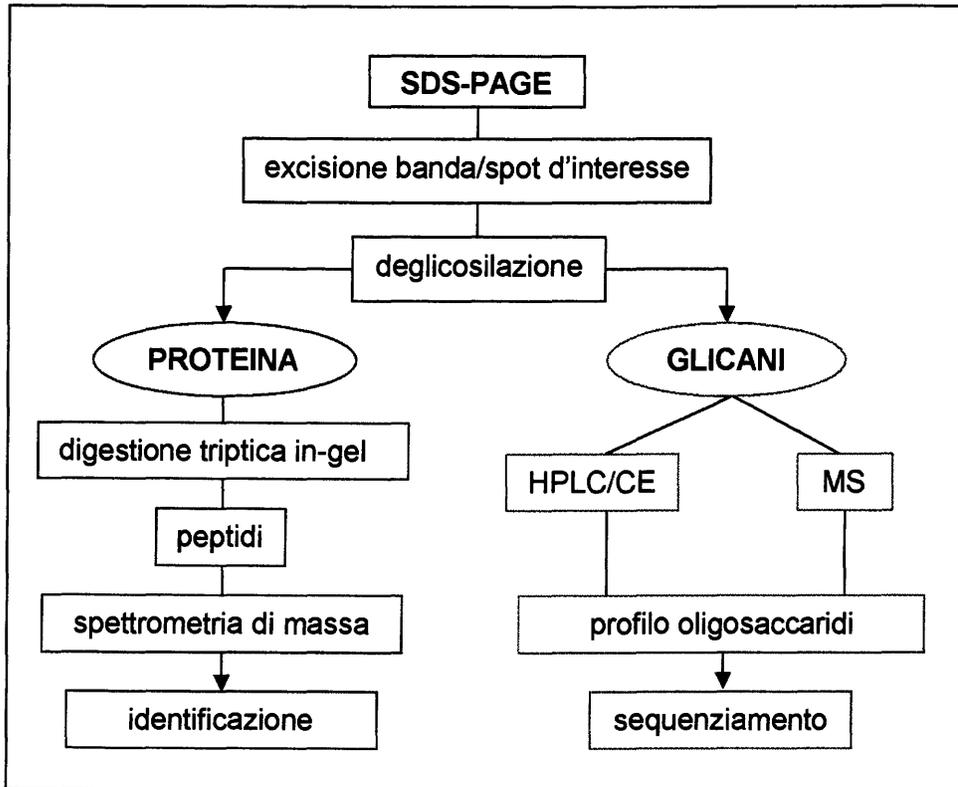
Esistono diversi tipi di spettrometro di massa, che differiscono in base al metodo di ionizzazione (ESI - Electrospray - o MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization -) e al tipo di analizzatore di massa utilizzato (filtro a quadrupolo o TOF - Time Of Flight - o Ion Trap - trappola ionica)<sup>[53][54][55][56]</sup>. Inoltre, per migliorare il grado di informazione ottenibile con la MS, è possibile combinare

uno spettrometro di massa con altre tecniche, per lo più separative quali l'HPLC e la CE.

Dal punto di vista analitico, prima di eseguire un'analisi di MS il campione d'interesse deve essere opportunamente preparato e trattato: i primi passaggi prevedono la purificazione degli spot d'interesse mediante excisione da gel e la digestione della proteina con enzimi proteolitici. Il prodotto di questa frammentazione è una miscela di peptidi rappresentativi della molecola originale che può essere direttamente utilizzata per l'analisi. Per le glicoproteine la digestione può essere preceduta dalla rimozione dei glicani, per via chimica o enzimatica, e dalla loro separazione dalla fase proteica: in tal modo è possibile procedere in parallelo con la caratterizzazione della proteina e degli oligosaccaridi ad essa legati<sup>[57]</sup>.

L'acquisizione e l'interpretazione degli spettri di massa vengono affidate ad opportuni e complessi programmi informatici in grado di gestire velocemente l'enorme quantità di dati raccolti. Per quanto riguarda la miscela di peptidi generata dopo la digestione, recenti progressi nel campo della bioinformatica hanno permesso l'integrazione e l'esplorazione di database sempre più estesi al fine di individuare e caratterizzare la proteina d'interesse (Peptide Mass Finger Printing)<sup>[58][59]</sup>. Purtroppo attualmente non esistono banche dati simili per i glicani: isolare e sequenziare la componente oligosaccaridica è stato per lungo tempo una sfida, in quanto i carboidrati complessi presentano caratteristiche strutturali che ne rendono difficile e laboriosa la separazione e la semplice identificazione<sup>[60]</sup>.

Fino ad alcuni anni fa, gli studi strutturali della porzione glicidica delle glicoproteine venivano effettuati mediante metodi indiretti, come l'analisi dei monosaccaridi, la reattività con differenti tipi di lectine, il confronto delle dimensioni dei glicopeptidi ottenuti dopo digestione completa con proteasi. Lo sviluppo di tecniche analitiche dotate di elevata sensibilità e selettività, quali HPLC, CE, GC (gascromatografia), NMR (Nuclear Magnetic Resonance), MS, ecc., ha consentito di ottenere informazioni sempre più affidabili sulla struttura e sulle alterazioni della porzione saccaridica delle glicoproteine; per quanto riguarda invece la caratterizzazione in termini di sequenza dei glicani, le opportunità sono ancora limitate e rimangono legate alla digestione sequenziale con enzimi esoglicosidasi e alla spettroscopia NMR<sup>[60][61][62][63]</sup>.



**Figura 2. Strategia di studio delle glicoproteine.**

### 1.3 LE GLICOPROTEINE.

Le proteine che possiedono catene laterali di oligosaccaridi legate in modo covalente a specifici residui aminoacidici sono note come glicoproteine; si tratta di molecole ubiquitarie e presenti in tutte le forme di vita. Si stima che circa l'80% delle proteine espresse dal genoma di una cellula eucariotica siano modificate con l'aggiunta di glicidi: la maggior parte di esse viene secreta dalla cellula ed entra a far parte della matrice extracellulare e dei fluidi corporei; parte rimane in forma solubile nel citoplasma e nel nucleo e solamente un terzo di esse viene indirizzato alla membrana plasmatica<sup>[64]</sup>.

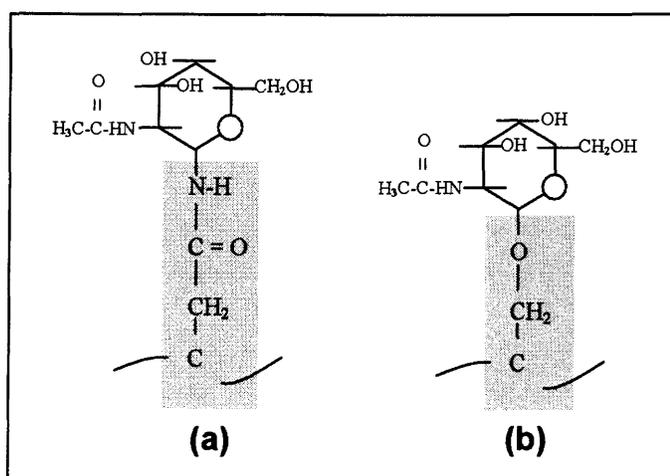
Ogni cellula, tessuto, organo e organismo mostra diversi e specifici profili glicoproteici, che possono variare con il mutare delle condizioni in cui si trova la cellula o in base alle sue funzioni; una stessa glicoproteina, inoltre, può esistere in diverse popolazioni di glicoforme con differenti proprietà molecolari ed attività biologica.

La variabilità strutturale e funzionale presentata da questi glicoconiugati è stupefacente: i siti di glicosilazione sulle proteine sono numerosi e ognuno di questi potrebbe legare un gruppo di carboidrati, a loro volta suscettibili di modificazioni. Si usa il termine *micro-eterogeneità* per indicare le variazioni di struttura dei carboidrati presenti in determinati siti di glicosilazione di una proteina; si parla invece di *macro-eterogeneità* in riferimento all'esistenza di diversi siti di attacco per le catene saccaridiche<sup>[34]</sup>.

Non si conoscono ancora le basi dell'informazione per cui ogni proteina subisce un particolare tipo di maturazione e glicosilazione; la sequenza glicosidica infatti non è specificata da alcun tipo di stampo, a differenza di quanto avviene nella sintesi proteica che è guidata da uno stampo di DNA. Si suppone perciò che la varietà delle glicoforme sia data da fattori diversi quali la regolazione tissutale degli enzimi coinvolti, la disponibilità di aminoacidi accettori e di glicani, la competizione enzimatica durante la modificazione post-traduzionale e la struttura della catena polipeptidica della proteina stessa<sup>[65]</sup>.

### 1.3: I- CLASSIFICAZIONE.

Le glicoproteine sono classificate in base alla natura del legame che unisce la parte glicidica alla catena polipeptidica (aglicone).



**Figura 3. Legami delle glicoproteine.**

(a) N-Glicani: NAcGlc legata a una Asp.

(b) O-Glicani: NAcGal legata a una Ser.

Si parla di *N*-glicoproteine quando si forma un legame tra l'ossidrile anomero del glicano, di solito tramite una *N*-Acetilglucosamina (GlcNAc), e il gruppo amminico della catena laterale di un residuo di asparagina. I glicani con legame *O*-glicosidico invece sono generalmente legati mediante un legame tra una *N*-Acetilgalattosamina e il gruppo ossidrilico di un residuo di treonina o di serina<sup>[65]</sup>.

### 1.3: II - BIOSINTESI.



La glicosilazione delle proteine avviene durante la maturazione della catena polipeptidica attraverso il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi. L'intero processo prevede l'azione sequenziale di più di 200 enzimi diversi: a seconda del sistema enzimatico coinvolto, esistono due vie biosintetiche, una per la formazione delle *N*-glicoproteine ed una per le *O*-glicoproteine.

L'aggiunta di *N*-glicani alle proteine è un evento co-traduzionale, ossia inizia mentre la sintesi proteica è ancora in corso. La *N*-glicosilazione richiede la presenza di una sequenza consenso accessibile intorno al residuo di asparagina, in particolare X-Asn-X-Ser/Thr, dove X rappresenta un generico residuo aminoacidico.

La prima fase prevede la sintesi di un precursore oligosaccaridico comune a tutti i glicani legati in *N* che si conoscono e avviene sulla faccia citoplasmatica del reticolo endoplasmico (RE): l'intermedio glicidico non viene assemblato direttamente sulla catena polipeptidica ma su di un trasportatore lipidico, il dolicolo fosfato. L'aggiunta sequenziale delle unità saccaridiche sul dolicolo è catalizzata da una serie di enzimi chiamati glicosiltransferasi: i primi monosaccaridi vengono trasferiti al lipide da zuccheri legati a nucleosidi difosfato. Le glicosiltransferasi che agiscono per ultime invece utilizzano come substrato direttamente gli zuccheri legati al dolicolo; le reazioni finali hanno luogo nel lume del RE, a seguito della traslocazione del complesso dolicol fosfato-oligosaccaride alla superficie interna del reticolo. Il precursore oligosaccaridico completo risulta composto da 14 residui saccaridici, 2 di *N*-Acetilglucosamina, 3 di glucosio e 9 di mannosio e viene trasferito, ad opera di una oligosaccaridiltransferasi specifica, sottoforma di unità intatta ad un'asparagina all'interno di un polipeptide accettore.

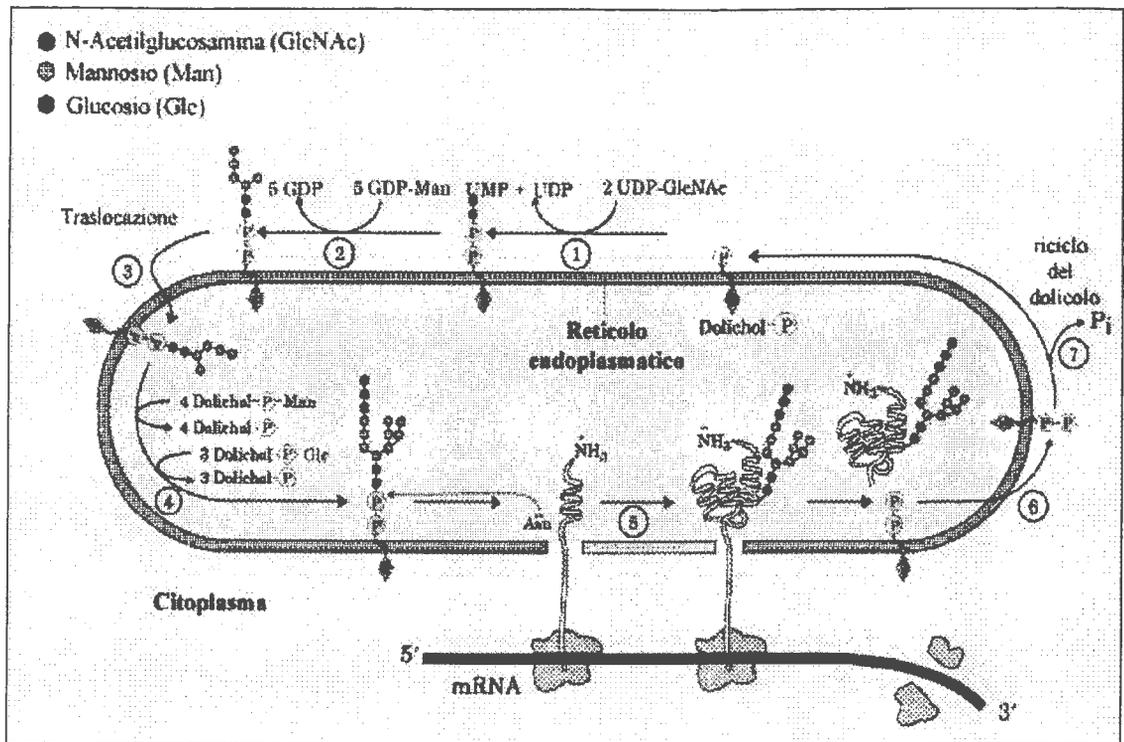


Figura 4. Schema della maturazione di una N-glicoproteina neosintetizzata nel RE.

Nei passaggi successivi si assiste al rimaneggiamento delle strutture oligosaccaridiche: la maturazione della glicoproteina ha inizio nel lume del reticolo endoplasmatico rugoso con la rimozione dei tre residui glucosidici e di un mannosio e continua mentre la catena polipeptidica nascente si sposta nel RE. Infine passa attraverso le diverse cisterne dell'apparato di Golgi dove l'oligosaccaride viene ulteriormente modificato sia mediante la rimozione che l'aggiunta di carboidrati.

Tutti gli N-glicani noti hanno una porzione interna pentasaccaridica in comune,  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; a seguito del processamento nell'apparato di Golgi, le catene glicosidiche si distinguono in tre categorie, sulla base di tre strutture fondamentali: glicani complessi, ibridi e ad alto contenuto di mannosio.

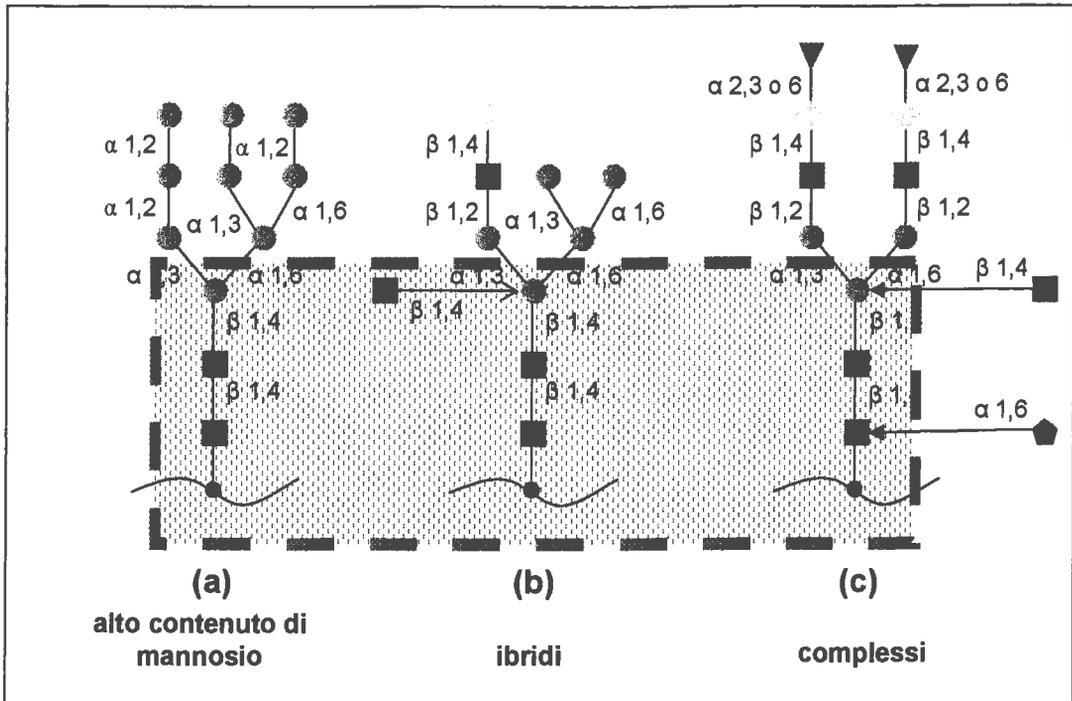


Figura 5. Struttura delle tre principali classi di N-glicani.

La O-glicosilazione, a differenza di quella in *N*, è un evento completamente post-traduzionale, nel senso che avviene sulla catena polipeptidica già formata, e, nella maggioranza dei casi, non richiede una sequenza consenso e nemmeno un precursore glicidico. Si svolge interamente nel Golgi dove gli oligosaccaridi si formano per aggiunta di uno zucchero alla volta: il primo è generalmente una *N*-Acetilgalattosamina, trasferita da una glicosiltransferasi su una serina o una treonina della catena polipeptidica.

Gli O-glicani sono molto meno ramificati degli *N*-glicani e si presentano di solito con strutture bi-antennarie; sono molto eterogenei e vengono classificati anch'essi in base al nucleo centrale. La maggior parte delle proteine che portano oligosaccaridi con legame O vengono secrete, ma tale modificazione si verifica, in minor misura, anche sulle proteine citoplasmatiche, nucleari e di membrana<sup>[65]</sup>.

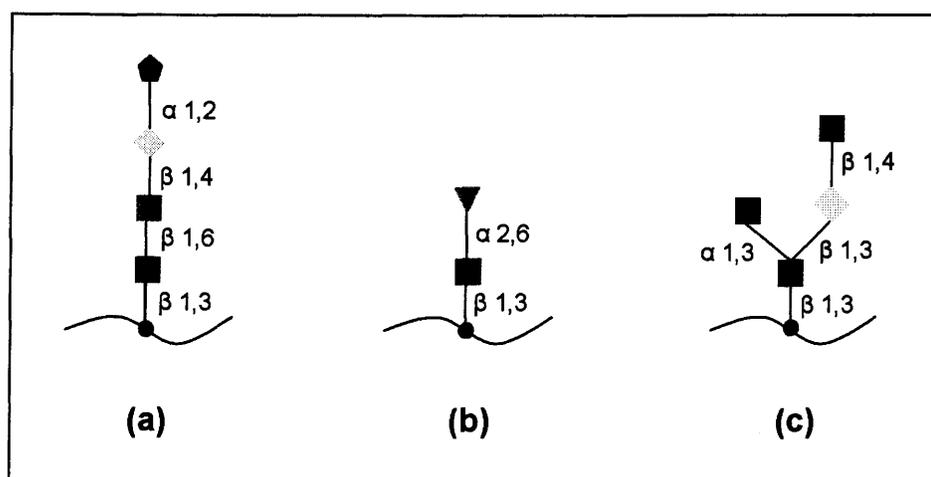


Figura 7. Esempi di O-glicani.

- GalNAc
- ◊ Gal
- GalNAc
- ▼ Ac. sialico
- ◆ Fucosio

Le cellule eucariotiche dispongono di un macchinario estremamente complesso e ridondante per la biosintesi delle glicoproteine che, infatti, richiede da parte della cellula un'elevata spesa sia in termini energetici che molecolari: a questo proposito, si stima che l'intero processo sfrutti ben il 2-3% del genoma umano.

La varietà delle strutture glicosidiche prodotte durante la glicosilazione è immensa, ma estremamente specifica all'interno di una specie, un tessuto e un determinato tipo cellulare. Questa sorprendente eterogeneità e specificità dipende, in primo luogo, dagli enzimi coinvolti: sono più di 250 i catalizzatori specifici che sintetizzano e continuamente rimodellano i carboidrati delle glicoproteine e si è visto che un unico enzima è in grado di formare più legami e che più enzimi possono catalizzare la medesima reazione.

In secondo luogo, l'esistenza di glicoforme dipende dall'accessibilità della catena alle glicosidasi e alle glicosiltransferasi e quindi dalla conformazione della porzione proteica che si trova nelle vicinanze della catena oligosaccaridica<sup>[66]</sup>. Infine non bisogna dimenticare che i carboidrati di per sé presentano una notevole eterogeneità, conferita loro dalla "quasi" equivalenza dei gruppi ossidrilici (non anomerci) di un monosaccaride che possono reagire in modo simile per formare un legame glicosidico.

### 1.3: III - PRINCIPALI FUNZIONI DEI GLICANI.

Nonostante la presenza delle glicoproteine e dei glicolipidi sulla membrana plasmatica sia stata evidenziata più di quarant'anni fa, le conoscenze in merito alla loro struttura e funzione sono ancora poco note<sup>[2]</sup>.

Ad esempio per lungo tempo si è pensato che il ruolo del glicocalice fosse solo quello di proteggere le cellule dall'ambiente circostante, grazie alla repulsione elettrostatica, o semplicemente quello di caratterizzare tipi cellulari diversi. Una visione così semplicistica non era però in grado di spiegare il perchè della straordinaria variabilità dei glicoconiugati e, inoltre, la loro localizzazione sulla superficie esterna della membrana sembrava suggerire che i carboidrati fossero in qualche modo coinvolti in processi biologici più complessi, come la comunicazione cellulare<sup>[67]</sup>.

Purtroppo però, proprio la varietà e la complessità delle glicoforme espresse sulla superficie cellulare hanno reso lo studio dei glicoconiugati alquanto laborioso. Un fatto ormai accertato è che le porzioni oligosaccaridiche sono parte integrante di tali macromolecole e influiscono profondamente sulle loro proprietà fisiche e sulle funzioni biologiche.

Per quanto riguarda i glicolipidi, gli studi in merito alle loro strutture e funzioni sono più accurati rispetto a quelli sulle glicoproteine, principalmente perché le porzioni saccaridiche sono molto meno complesse e perciò più facili da studiare e da caratterizzare. Si è visto, infatti, che le catene glicidiche

presenti sui lipidi influenzano la rigidità della membrana e la funzione di alcune proteine di superficie, come le integrine e i recettori per i fattori di crescita<sup>[68]</sup>.

Per quanto riguarda le proteine, il significato dell'abbondante glicosilazione è molteplice. All'interno della cellula gli oligosaccaridi contribuiscono al corretto ripiegamento dei polipeptidi nel RE e al successivo mantenimento conformazionale: le proteine erroneamente glicosilate, infatti, non si ripiegano in maniera corretta e vengono di conseguenza degradate. In generale, però, la presenza di porzioni saccaridiche sulle proteine conferisce una maggiore resistenza all'attacco delle proteasi, perché ne incrementano la rigidità strutturale o perché gli zuccheri proteggono stericamente i siti soggetti all'azione di questi enzimi. Inoltre i glicani possono agire come segnali per il corretto indirizzamento delle glicoproteine ai vari compartimenti cellulari o alla via secretoria.

All'esterno della cellula i carboidrati garantiscono l'elevatissima selettività che è alla base dei fenomeni di comunicazione e riconoscimento cellulare: interagiscono con una grande varietà di ligandi e perciò mediano una serie di importanti processi quali la fecondazione, l'embriogenesi, l'organogenesi, ecc. Presiedono ai fenomeni di adesione omo- ed etero-tipica; modulano il sistema immunitario, mascherando potenziali siti antigenici o comportandosi essi stessi da antigeni; possono reagire come recettori altamente specifici per virus, batteri e parassiti o per tossine vegetali e batteriche. Sono anche mediatori di diversi meccanismi di regolazione del metabolismo epatico. Per esempio glicoproteine plasmatiche che, in seguito alla rimozione di residui di acido sialico all'estremità delle loro porzioni saccaridiche, espongono residui di galattosio, vengono

riconosciute dagli asialo-recettori epatici, rimosse dal circolo, trasferite ai lisosomi e degradate. Infine, gli oligosaccaridi sulla superficie cellulare sono anche coinvolti nei fenomeni di trasformazione e progressione neoplastica: molto spesso le strutture glicosidiche che compaiono durante tali processi sono correlate con quelle che si osservano durante l'embriogenesi, per cui ci si riferisce a questi determinanti come epitopi "onco-fetali"<sup>[2, 3] [65]</sup>. Analogamente infatti, a quanto si verifica nei normali processi fisiologici dell'embriogenesi, anche nella trasformazione neoplastica, le cellule vanno incontro ad un rapido processo proliferativo ed interagiscono con cellule di tipo diverso che consente loro di invadere regioni diverse dell'organismo. Mentre, però, questi processi nell'embriogenesi sono il presupposto per il corretto raggiungimento di un'architettura morfologica normale, nel caso della trasformazione neoplastica questo evento è responsabile del fenomeno delle metastasi.

### **1.3: IV - ALTERAZIONI DELLA GLICOSILAZIONE NELLA TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA.**

Tutte le forme tumorali, siano esse naturali e/o sperimentali, sono caratterizzate da modificazioni del profilo di glicosilazione delle glicoproteine cellulari<sup>[69][70]</sup>.

E' ancora dibattuta la questione se l'aberrante glicosilazione riscontrata nelle cellule neoplastiche sia una conseguenza o una delle cause. Recenti studi danno credito ad entrambe le ipotesi, indicando, da un lato, che alcune, se non tutte le glicoforme alterate compaiono in seguito alla trasformazione oncogenica come risultato di anomalie molecolari accumulate in diversi sistemi regolatori della cellula. D'altra parte, i cambiamenti nella struttura saccaridica delle glicoproteine svolgono sicuramente anche un ruolo cruciale nell'induzione di invasione e metastasi tumorale<sup>[4]</sup>. E' stato riscontrato, infatti, che gli epitopi glicidici mediano *per se* l'adesione cellulare del tumore attraverso interazioni carboidrato-carboidrato (sialil-Le<sup>x</sup>, sialil Le<sup>a</sup>, ecc.) o attraverso interazioni carboidrato-proteina (selectina, galectina, ecc.). Inoltre l'alterata N- od O-glicosilazione dei maggiori recettori di membrana (integrine, caderine, CD44, GFR -growth factor receptor-) modula le loro funzioni di controllo dell'adesione cellulare, motilità e invasività delle cellule trasformate<sup>[1]</sup>.

I cambiamenti del profilo di glicosilazione evidenziati nelle cellule trasformate sono estremamente variabili e non ancora tutti codificati: alcune modificazioni hanno un effetto metastatico e altre inibitorio e, generalmente, non sono tumore-specifiche, anzi, molte delle strutture glicosidiche riscontrate nelle neoplasie sono diffuse, magari in piccola parte, anche nelle corrispondenti cellule normali o, maggiormente, in altri tipi di cellule e tessuti. Possono riguardare la perdita o l'aumento di espressione di certe componenti oligosaccaridiche, la presenza di strutture incomplete o tronche, l'accumulo di precursori e, meno frequentemente, la comparsa di nuovi epitopi.

La presenza di strutture così eterogenee non deve tuttavia essere interpretata come casuale conseguenza del disordine biologico creatosi nelle cellule tumorali: in realtà infatti sembra esser compromesso un limitato numero di vie biosintetiche che coinvolgono i carboidrati. In particolare, la trasformazione neoplastica è stata associata a due principali tipi di modificazioni: alterazioni del grado di ramificazione degli *N*-glicani e alterazione del contenuto di acido sialico nel glicocalice<sup>[65]</sup>.

L'alterazione strutturale delle catene *N*-glicosidiche espresse nelle cellule trasformate è un fenomeno osservato sin dal 1969 e riportato in un interessante studio svolto sulle glicoproteine di membrana. Tale studio prendeva in considerazione cellule normali e le corrispondenti cellule trasformate, metabolicamente incubate con precursori monosaccaridici, ad esempio la glucosamina, marcati rispettivamente con  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ . La frazione contenente la membrana plasmatica veniva poi isolata e le glicoproteine espresse sulla superficie dei due tipi cellulari venivano digerite. L'analisi dei profili dei glicopeptidi marcati mediante gel filtrazione indicavano la presenza di glicopeptidi di maggiori dimensioni nelle cellule trasformate rispetto a quelle normali. Questo fenomeno è noto come "fenomeno di Warren-Glick".

Il fenomeno di Warren-Glick è stato descritto per molti tipi di trasformazione neoplastica, tuttavia non è un evento generalizzato: ad esempio non si manifesta nelle linee tumorali caratterizzate da bassa tumorigenicità e bassa capacità metastatica.

Successivamente altri studi permisero di caratterizzare meglio la componente glicidica delle cellule trasformate e di notare che era arricchita di

oligosaccaridi di tipo complesso: si ipotizzò inoltre che, dal punto di vista molecolare, le modificazioni associate al fenomeno di Warren-Glick derivassero da un'alterazione dell'attività di una o più  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminil transferasi (GlcNAcT). Questa ipotesi è stata ampiamente studiata e delle sei GlcNAcT coinvolte nella sintesi degli oligosaccaridi di tipo complesso, la *N*-acetilglucosaminil transferasi V (GlcNAcT-V) mostrava un'attività tre volte superiore nelle cellule trasformate rispetto alle normali<sup>[71]</sup>. L'anomalo comportamento dell'enzima sembra essere legato ad una sua sovraespressione conseguente ad alterazioni a livello trascrizionale o indotta dall'attivazione di oncogeni o dall'infezione di virus oncogenetici. L'esito di tale iperattività è l'aumento di ramificazioni  $\beta$ 1-6 degli *N*-glicani e quindi un incremento delle dimensioni dei glicopeptidi. Una simile modificazione è stata riscontrata in diversi modelli di tumori umani, tra cui l'epatocarcinoma cellulare.

Molto interessante è l'osservazione che le cellule trasformate che presentavano un'aumentata espressione di GlcNAcT-V, risultavano particolarmente aggressive e metastatiche, comportamento che veniva perso in seguito all'inattivazione dell'enzima. Non è ancora chiaro il preciso meccanismo molecolare responsabile di simili comportamenti, ma le osservazioni fatte suggeriscono che la GlcNAcT-V svolge un ruolo critico nella biologia del cancro e fanno sì che si possa considerare tale enzima una onco-proteina.

Una modificazione della struttura dei carboidrati legati in *N* può derivare anche dall'anormale espressione di un'altra *N*-acetilglucosaminil transferasi, la GlcNAcT-III: è stata riscontrata un'aumentata attività di GlcNAcT-III in alcuni tipi di neoplasie, ma l'effetto della sua sovra-espressione è ancora poco chiaro. Ad

ogni modo, sembra che la GlcNAcT-III porti ad una riduzione della metastasi tumorale. Essa è, infatti, responsabile della mancata funzionalità dei recettori per i fattori di crescita, favorisce l'espressione sulla superficie cellulare di molecole d'adesione quali la E-caderina e il CD44 e promuove l'adesione cellulare omotipica<sup>[65] [72]</sup>.

L'elevata capacità metastatica di certe forme tumorali è stata spesso correlata anche ad un incremento del contenuto di acido sialico dei glicconiugati di membrana. L'acido sialico è situato esclusivamente in posizione terminale di un glicano ed è carico negativamente: queste sono le due principali proprietà che rendono l'acido sialico responsabile della ridotta capacità adesiva delle cellule alle componenti della matrice extracellulare, in particolare al collagene di tipo VI e alla fibronectina, e pertanto del fenotipo metastatico.

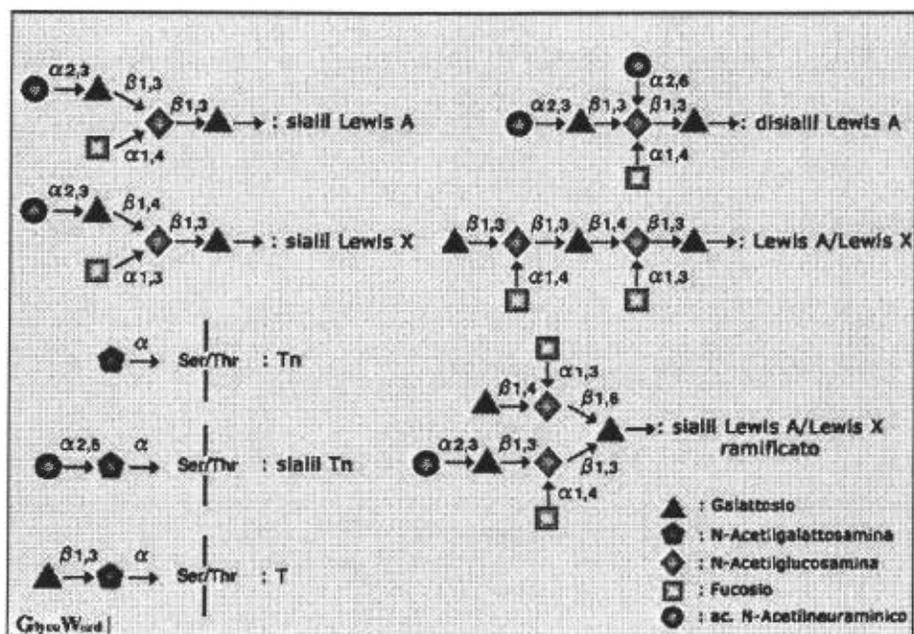
La maggiore sialilazione può manifestarsi in seguito ad un'aumentata attività delle sialil transferasi, per esempio dell' $\alpha$  2-6 sialil transferasi, o ad una ridotta attività delle sialidasi; oppure può essere conseguente all'aumento delle ramificazioni degli *N*- e degli *O*-glicani, alterazione che crea residui terminali di Gal $\beta$ 1-4GlcNAc suscettibili a sialilazione.

Inoltre, bisogna sottolineare che la relazione tra sialilazione e potenziale metastatico delle cellule tumorali non riguarda solo i livelli ma anche la posizione dei residui di acido sialico: è stato dimostrato, infatti, che un grado elevato di acido sialico legato  $\alpha$  2-3 aumenta il l'aggressività delle cellule trasformate.

Sulla base di queste e di numerose altre osservazioni quali ad esempio un'associazione tra la scomparsa degli antigeni sanguigni dei gruppi A e B e la presenza di alcuni carcinomi, come quello polmonare, gastrointestinale,

cervicale, orale e vescicale si cominciò a delineare più marcatamente la correlazione tra strutture saccaridiche e tumore: a questi epitopi glicosidici venne dato il nome di TACA, *Tumor-Associated Carbohydrate Antigen*<sup>[4]</sup>.

Esistono molteplici tipologie di TACA che differiscono sia per la struttura chimica che per il tipo di macromolecole (glicolipidi o glicoproteine) a cui sono associati.



**Figura 7. Struttura dei principali Tumor-Associated Carbohydrate Antigen.**

I dati raccolti negli ultimi decenni dimostrano che la presenza, o assenza, e il livello di espressione dei TACA nelle forme neoplastiche, sono strettamente correlati alla tendenza metastatica e all'invasività delle cellule tumorali, anche se i meccanismi molecolari che stanno alla base di tali comportamenti sono ancora poco chiari.

Per esempio è stato evidenziato che l'accumulo di strutture gangliosidiche, quali l'asialo-GM2, il fucosil-GM1, il GD3 e il GD2, nelle cellule trasformate stimola la vascolarizzazione e la crescita tumorale. In maniera simile si comportano i TACA appartenenti alla cosiddetta "globo-series", come il globotriaosilceramide (Gb3), riscontrato nel linfoma di Burkitt, e il globo-H, espresso in molte neoplasie umane.

Ancora, la comparsa o la sovra-espressione degli antigeni sanguigni Lewis (a, b, x, y) e delle loro forme sialilate sembra essere correlata con un fenotipo metastatico e quindi con uno stadio avanzato di tumore. Infine, nel tumore colon-rettale, polmonare, mammario e diversi altri è stata rilevata la presenza e/o l'accumulo dei TACA associati alle mucine, quali l'antigene T, il sialil T (ST), il Tn e sialil Tn (STn).

Altre tipologie di TACA sembrano invece svolgere un ruolo nella soppressione della progressione tumorale, come per esempio gli antigeni appartenenti agli istogruppi A e B e il galattosilgloboside (GalGb4), la cui riduzione o completa scomparsa è correlata ad invasività e metastasi tumorale<sup>[68]</sup>.

Il quadro che è emerso negli ultimi anni è comunque estremamente complesso<sup>[4]</sup>.

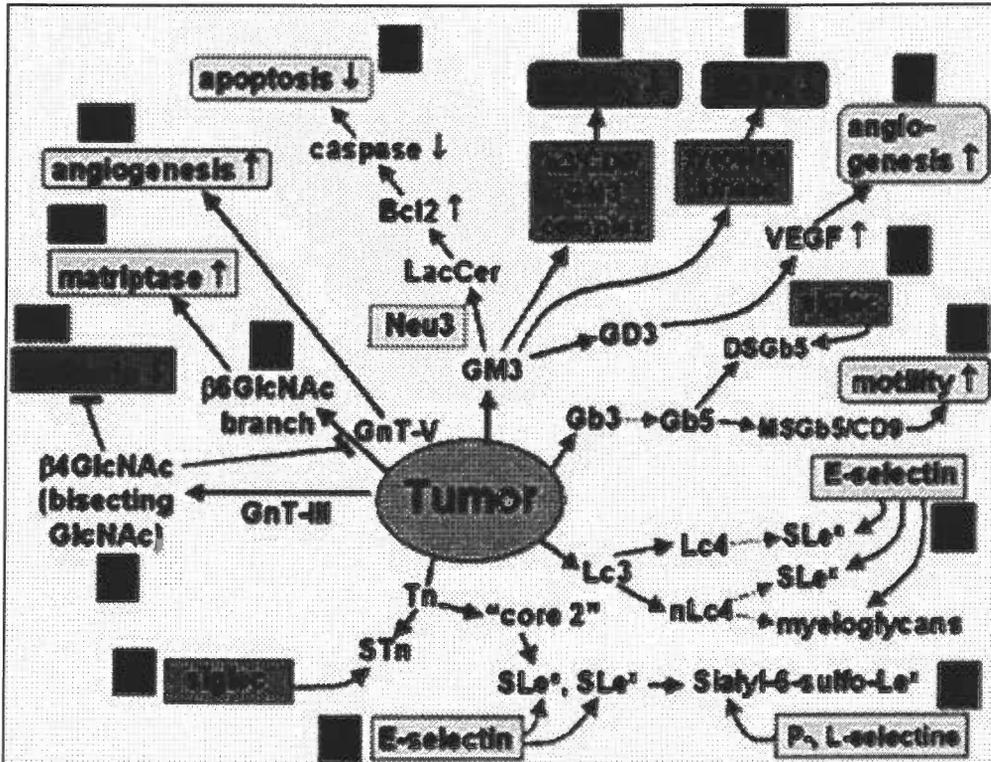


Figura 8. Rappresentazione schematica delle variazioni dei profili di glicosilazione correlati alla trasformazione neoplastica

La malignità delle cellule tumorali è caratterizzata da alcuni fenotipi-chiave: apoptosi (percorso 1), motilità (percorsi 2 e 5), EGFR - tirosin chinasi (percorso 3), angiogenesi (percorsi 4 e 6b), attività delle matriptasi (enzimi che distruggono la matrice extracellulare, percorso 6a), adesione cellula-cellula attraverso caderine (percorso 7a), alla matrice attraverso integrine e a ECs e piastrine attraverso E- o P-selectina (percorso 8), adesione a cellule sanguigne e altre cellule parenchimatose (percorso 9). Ciascun fenotipo può risultare sovra- o sotto-regolato ( $\uparrow$  o  $\downarrow$ ) dall'anormale stato di glicosilazione. Inoltre, i fenotipi di colore verde inibiscono l'invasività del tumore mentre quelli rosa la promuovono; i ligandi di colore giallo hanno effetti variabili o non del tutto chiariti nei confronti dell'invasione tumorale. Si noti che un dato fenotipo può essere prodotto da differenti stati di glicosilazione e che un determinato pattern glicosidico può generare fenomeni diversi. Appare comunque chiaro che i cambiamenti nello stato di glicosilazione hanno un effetto cumulativo sulla malignità delle cellule tumorali.

L'individuazione e la classificazione di queste strutture saccaridiche , a livello delle singole forme tumorali, offre un potenziale informativo enorme per l'elaborazione di strumenti diagnostici precoci, specifici ed altamente prognostici. Il significato dei TACA dal punto di vista prognostico è potenzialmente utile soprattutto per prevedere la progressione della malattia. Dati clinici rivelano, ad esempio, che quando la concentrazione nel siero dell'antigene STn nel cancro ovarico è superiore a quello dei soggetti normali, la prognosi favorevole relativa ai 5 anni è inferiore al 10%. Allo stesso modo è stato osservato che nel cancro al colon la sopravvivenza a 5 anni nel caso di positività all'antigene STn è di circa il 75% mentre nei casi di negatività la sopravvivenza a 5 anni arriva al 100%. Pertanto gli studi rivolti all'identificazione e all'utilizzo di questi marcatori tumorali hanno come obiettivi:

- Ricercare possibili e significative correlazioni tra le alterazioni e la prognosi della trasformazione neoplastica;
- Stabilire la relazione di causa/effetto delle alterazioni nella comparsa e o nella progressione della trasformazione neoplastica;
- Utilizzare la specificità di queste alterazioni dei profili di glicosilazione per la messa a punto di strumenti diagnostici precoci e sensibili.

A questo proposito, è particolarmente interessante la possibilità di impiego di questi determinanti quali "target" terapeutici mirati per la progettazione, ad esempio, di vaccini diretti contro la componente oligosaccaridica specifica della cellula tumorale o per il miglioramento delle attuali terapie farmacologiche.

L'identificazione, ad esempio, di un recettore (lectina e/o anticorpo) che specificatamente riconosce il determinante oligosaccaridico alterato permetterebbe di inviare a bersaglio il farmaco riducendo enormemente le dosi da utilizzare e quindi la sua citotossicità.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Le patologie tumorali costituiscono una delle più rilevanti questioni di ordine sociale e sanitario dei paesi industrializzati.

L'epatocarcinoma cellulare costituisce da solo più del 5% delle neoplasie maligne, con un numero stimato di casi annui superiore a 500.000: l'incidenza del tumore è in crescita in molte aree geografiche, Italia inclusa.

La prognosi dell'epatocarcinoma cellulare è solitamente severa in relazione al fatto che la patologia insorge spesso in un fegato già compromesso da cirrosi o epatite. Il tasso di sopravvivenza è perciò molto basso e l'elevata mortalità è da ricondurre principalmente alla difficoltà nell'impostare un adeguato trattamento terapeutico e alla mancanza di una cura efficace e risolutiva. D'altra parte, il successo di una terapia è sempre legato ad una diagnosi precoce, mentre purtroppo nella maggioranza dei casi il tumore viene identificato in uno stadio ormai avanzato: l'HCC non ha una sintomatologia caratteristica e tipica delle fasi iniziali e mostra, anche nei primi stadi di sviluppo, una forte tendenza alla diffusione in sede intravascolare epatica ed intrabiliare.

In quest'ottica identificare nuovi biomarker il più possibile precoci ed espressi specificatamente sulle cellule tumorali permetterebbe di mettere a punto degli strumenti diagnostici e terapeutici innovativi ed estremamente sensibili.

In tutte le neoplasie umane è stata osservata un'aberrante glicosilazione dei lipidi e delle proteine espressi sulla superficie cellulare. L'oggetto di indagine di questo lavoro è costituito dal proteoma della membrana plasmatica con particolare interesse rivolto nei confronti della frazione glicoproteica dell'epatocita normale e patologico; gli strumenti di indagine sono quelli della proteomica e della glicomica, indirizzati all'analisi del profilo d'espressione e di glicosilazione di proteine che caratterizzano uno stato patologico rispetto alla condizione fisiologica. Questo approccio comparativo consente di individuare cambiamenti, qualitativi e quantitativi, del glicoma e del proteoma cellulare a seguito della trasformazione e progressione neoplastica: proteine che compaiono (o scompaiono) o che sono presenti a livelli diversi oppure che mostrano strutture oligosaccaridiche differenti come conseguenza dell'insorgere di una patologia, possono essere utilizzate come marker specifici nella diagnosi di tumori, nel monitoraggio dei trattamenti o in qualità di target a scopo terapeutico.

Finora, gli studi condotti sulle proteine di membrana e sulle loro modificazioni post-traduzionali non hanno fornito dati esaustivi per la loro identificazione e caratterizzazione. Questo è dovuto principalmente all'assenza di strategie efficaci per l'analisi complessiva di tali macromolecole: i problemi principali riguardano la limitata abbondanza delle proteine di membrana, e quindi la difficoltà di estrazione e riconoscimento di queste ultime, e l'enorme variabilità delle glicoforme all'interno di una stessa popolazione di glicoproteine.

Sulla base di queste considerazioni, lo scopo del presente lavoro è quello di effettuare un approfondito studio metodologico che permetta di ottenere

proteine di membrana in forma sufficientemente pura ed in una fase sufficientemente arricchita da consentire l'analisi con un approccio proteomico. Inoltre, procedere con la messa a punto di un sistema ottimale per la separazione della porzione glicidica da quella proteica e, quindi, per la caratterizzazione dei glicani legati alle proteine di membrana.

## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 MATERIALI**

Il terreno Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), il siero fetale bovino, la soluzione di streptomicina/ampicillina e la Glutamina sono della Gibco BRL (Milano I). La ImmunoPure Immobilized Monomeric Avidin, la NHS-LC-Biotina e la D-Biotina sono state fornite dalla Pierce (Rockford, IL). Per la quantificazione delle proteine sono stati utilizzati il Bradford Reagent e il Bicinchoninic acid kit entrambi della Sigma (St.Louis, MO). L'anticorpo anti-biotina coniugato con fosfatasi alcalina deriva dalla Sigma (St.Louis, MO), la carta 3MM dalla Whatman (Brentford, UK), la membrana PVDF dalla Millipore (Mass. USA) e CSPD e NitroBlock della Tropix (California, USA) ed il sistema Trans-blot Semi-Dry Transfer Cell della Biorad. Per la colorazione delle glicoproteine è stato utilizzato il colorante Pro-Q Emerald 300 della Molecular Probes (Leiden, NL). Per la colorazione argentea sono stati utilizzati i seguenti reagenti: sodiotiosolfato, nitrato d'argento, sodiocarbonato e formaldeide tutti della Sigma (St.Louis, MO). Per l'estrazione delle proteine e la reidratazione delle strip sono stati utilizzati i seguenti reagenti: Urea, CHAPS, TBP (Tributil fosfina), Tiourea, DTT, Iodoacetammide e SB3-10 della Sigma e l'IPG Buffer (carrier ampholytes

pH 3-10) della Amersham Biosciences (Arlington Heights, IL). Per i gel mono e bidimensionali sono stati usati acrilammide/bisacrilammide (29:1), ammoniopersolfato, Tris, TEMED e SDS della Sigma (St.Louis, MO). Per le prove di deglicosilazione sono state utilizzate la Fetuina e la Glicopeptidasi F della Sigma (St.Louis, MO). Per l'elettroforesi bidimensionale è stato usato il sistema di isoelettrofocalizzazione "*Ettan IPGphor*", Strip Holder da 7 cm e 13 cm, Immobiline DryStrip pH 3-10L da 7 cm e 13 cm e il sistema per la seconda dimensione *Hoefler SE600 Ruby* della Amersham Biosciences. Per la digestione in gel sono stati utilizzati: la tripsina "Sequencing Grade Modified Trypsin" della Promega (WI, USA), il bicarbonato di sodio, potassio ferricianuro, acido trifluoroacetico della Sigma e acetonitrile della Carlo Erba. Per le analisi dei glicani e dei peptidi sono stati usati rispettivamente: il sistema di cromatografia liquida Surveyor interfacciato con lo spettrometro di massa LCQ Deca XP ed LCQ Deca della Thermo Finnigan. Per l'acquisizione delle immagini sono stati utilizzati il transilluminatore GelDoc2000 della Biorad e l'Image Master della Amersham Bioscience. Per gli esperimenti di immunocitochimica sono stati usati i seguenti anticorpi primari: mouse Anti-HSP90 della Stressgen bioreagents (Canada), rabbit Anti-GRP94 della Serotec (USA), Bip/GRP78, l'Anti-biotina (FITC conjugate), Anti-mouse-TRITC conjugate, Anti-Rabbit-FITC-conjugate, la paraformaldeide e il TritonX100 della Sigma.

### **3.1: I - COLTURE CELLULARI.**

Sono state utilizzate le linee cellulari CHANG liver, HepG2 e MC615 fornite dall'ATCC e una linea primaria di condrociti da cartilagine articolare di maiale.

Le cellule CHANG, HepG2 ed i condrociti sono state propagate in DMEM contenente 10% di siero fetale bovino, 2mM di L-Glutammina, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina, mentre le MC615 sono state coltivate in terreno DMEM/F12 con 10% siero fetale, 2mM Glutammica e 100U/ml penicillina/streptomina, a 37°C in una atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>

### **3.2 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DI MEMBRANA**

#### **3.2: I - METODO 1.**

Per ottenere le proteine di membrana è stato utilizzato un protocollo di estrazione differenziale che prevede l'utilizzo di urea, detergenti e agenti riducenti. Il protocollo si divide in tre fasi e prevede l'utilizzo di tre soluzioni di estrazione differenti.

- Nel primo passaggio, un pellet di cellule (circa 10 milioni), dopo lavaggio con PBS, è stato risospeso in una soluzione di Tris base 40 mM a cui sono state

aggiunte 150 unità di DNAasi. Le cellule sono state quindi incubate a temperatura ambiente per 20 minuti, vortexate per 5 minuti e sonicate, successivamente sono state centrifugate a 13,000 rpm per 10 minuti. Il surnatante viene scartato.

- Nel secondo passaggio, il pellet è stato risospeso in una soluzione contenente 8 M urea, 4% CHAPS, 2 mM TBP, 40 mM Tris base e 0.2% Anfoline. Il campione è stato vortexato per 5 minuti, sonicato e in seguito centrifugato a 13,000 rpm per 10 minuti. Il surnatante viene scartato.
- Nel terzo passaggio il pellet, ottenuto dopo centrifugazione nella seconda fase, viene risospeso in una soluzione contenente urea 5 M, 2 mM tiourea, 2% CHAPS, 2% SB3-10, 2 mM TBP, 40 mM Tris base e 0,2% Anfoline.

Le proteine così ottenute possono essere caricate in prima dimensione, focalizzazione isoelettrica, poiché la soluzione utilizzata nella terza fase estrattiva coincide con il tampone di reidratazione delle ImmobilineDry Strip.

#### ➤ **Quantificazione delle proteine.**

Per la quantificazione delle proteine estratte si utilizza un saggio Bradford modificato che permette di minimizzare le interferenze date dalle alte concentrazioni di urea nei campioni. Il reattivo di Bradford va diluito 1:4 con acqua. A 3,5 ml di reattivo diluito vengono aggiunti 80µl di una soluzione di HCl 0,12 M e successivamente 20 µl del campione da quantificare. L'assorbanza è

stata misurata ad una lunghezza d'onda di 595 nm. La curva di taratura va effettuata utilizzando BSA disciolta nel tampone di lisi contenente urea 5 M, 2 mM tiourea, 2% CHAPS, 2% SB3-10, 2 mM TBP, 40 mM Tris base.

### **3.2: II - METODO 2.**

Il metodo utilizzato permette di marcare selettivamente le proteine sulla superficie cellulare utilizzando un particolare tipo di biotina modificata. Un monolayer di cellule (HepG2 o CHANG) coltivato in fiasche da 175 cm<sup>2</sup> viene lavato tre volte con PBS. Le cellule in adesione vengono successivamente fatte incubare con 10 ml di una soluzione di Sulfo-NHS-LC-biotin 0.5 mg/ml in PBS per 20 minuti a 37°C sotto lieve agitazione. La reazione di biotinilazione viene bloccata aggiungendo Tris-HCl pH 7.5 ad una concentrazione finale di 50 mM. Dopo la biotinilazione le cellule in adesione vengono lavate per tre volte con PBS, in seguito vengono staccate meccanicamente dalla fiasche, risospese in PBS e centrifugate a 1500 rpm per 15 minuti. Eliminato il surnatante le cellule vengono risospese in una soluzione di CHAPS 2% in PBS e quindi sonicate. Dopo sonicazione le cellule lisate sono state centrifugate a 13,000 rpm per 20 minuti ed il surnatante ottenuto, contenente le proteine di membrana marcate, è stato purificato secondo la metodologia descritta nel rispettivo paragrafo.

➤ ***Cinetica di biotinilazione.***

Per settare le condizioni migliori del metodo di estrazione proposto è stata eseguita una cinetica di biotinilazione. A questo proposito sono state fatte giungere a confluenza 5 fiasche da 75 cm<sup>2</sup> di HepG2. A quattro di esse è stata aggiunta la soluzione di biotinilazione (Sulfo-NHS-LC-biotin 0.5 mg/ml in PBS) mentre ad una il solo PBS; tutte le fiasche sono state quindi messe ad incubare a 37°C sotto lieve agitazione. La reazione di biotinilazione è stata bloccata a 5 min, a 10 min, a 20 min e a 30 min. Le cellule di ogni fiasca sono state lavate e staccate meccanicamente e le proteine estratte e purificate con il metodo descritto di seguito. 10 µg degli estratti proteici sono stati separati con una classica SDS-PAGE utilizzando un gel al 10% e di seguito è stato eseguito un Western Blot utilizzando il protocollo descritto nel paragrafo successivo.

➤ ***Preparazione della colonna "ImmunoPure Immobilized Monomeric Avidin Gel".***

Per la purificazione delle proteine marcate con la Sulfo-NHS-LC-biotin è stata utilizzata la ImmunoPure Immobilized Monomeric Avidin Gel, funzionalizzata con un particolare tipo di avidina, difettiva di due subunità, che permette la formazione di legami reversibili con la biotina.

2,5 ml di resina (*bed volume*) in una colonna cromatografia di dimensioni 1x10 cm sono stati lavati abbondantemente con PBS e quindi condizionati con 2 volumi di una soluzione 2 mM D-biotina in PBS, per bloccare eventuali siti di legame non-reversibile per la biotina. Le molecole di biotina che interagiscono con i siti di legame reversibile sono state staccate dalla resina mediante lavaggio con 5 volumi di una soluzione di Glicina 0.1 M a pH 2.8. La resina è stata successivamente lavata abbondantemente con PBS.

➤ ***Purificazione delle proteine estratte.***

Una volta condizionata la resina, il lisato cellulare è stato caricato in colonna per tre volte. Successivamente la colonna è stata lavata con una soluzione di CHAPS 1% in PBS per rimuovere tutte le proteine non biotinilate. Le proteine legate sono state eluite utilizzando due volumi di una soluzione 5 mM di D-biotina disciolta in PBS con 1% CHAPS.

La frazione di proteine di membrana così ottenute è stata dializzata contro acqua milliQ per una notte e quindi liofilizzata. I campioni proteici sono stati quantificati mediante il saggio Bradford classico.

➤ ***SDS-PAGE delle proteine biotinilate.***

Per valutare il grado di purezza e l'integrità delle proteine estratte e purificate per affinità su colonna funzionalizzata con avidina, è stata effettuata

una separazione su SDS-PAGE. A tale proposito sono stati caricati 15 µg/lane di estratti di CHANG e di HepG2 su un gel di poliacrilammide all'10% e la corsa elettroforetica è stata condotta a 100V. Le proteine separate sono state poi rilevate mediante colorazione argentica e ProQ Emerald 300, specifico per glicoproteine.

➤ ***Western blot delle proteine biotinilate.***

E' stato utilizzato il metodo dell'elettrotrasferimento mediante Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell. Sull'anodo sono stati posti nell'ordine: due fogli di carta 3MM imbibiti con una soluzione di Tris base 0,3 M e metanolo 10%, un altro foglio di carta 3MM e la membrana di PVDF imbibiti con una soluzione di Tris-base 25 mM e metanolo 10%, il gel di poliacrilammide riequilibrato in un tampone Tris base 25 mM, glicina 40 mM e metanolo 10% e tre fogli di carta 3MM imbibiti nello stesso tampone. Dopo aver posizionato il catodo è stato effettuato il trasferimento per 25 minuti con un amperaggio costante di 4 mA/cm<sup>2</sup> di superficie di trasferimento.

La membrana è stata poi incubata per 1 ora a temperatura ambiente sotto leggera agitazione con una soluzione saturante (BSA 2%, NaCl 0,5 M, Tween20 0,1% in PBS) che blocca il legame aspecifico degli anticorpi. Si è aggiunto quindi l'anticorpo anti-biotina coniugato con fosfatasi alcalina diluito 1:30000 nella soluzione saturante e la membrana incubata 1 ora a temperatura ambiente sotto leggera agitazione. Segue una fase di lavaggio di 1 ora in soluzione

saturante alternata da brevi lavaggi con acqua milliQ ed infine due lavaggi di 5 minuti ciascuno con Assay Buffer (0,1 M Dietanolamina pH 10, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,02% NaN<sub>3</sub>). E' stato infine usato il sistema di rilevazione a chemiluminescenza CSPD/NitroBlock per impressionare le lastre fotografiche ad alta sensibilità (Sigma).

### **3.3 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE.**

#### **3.3: I - PRIMA DIMENSIONE: FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF).**

Si è proceduto con un'analisi bidimensionale, di tipo analitico, dei campioni proteici estratti per settare il protocollo di focalizzazione. Per la prima dimensione sono stati caricati 50 µg di proteine di membrana delle linee cellulari CHANG ed HepG2 su strip da 7 cm precedentemente solubilizzati in 125 µl di un tampone di reidratazione per le Immobiline DryStrip contenente urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, 60 mM DTT, IPG Buffer pH 3-10 e 0,0002% blu di bromofenolo e lasciati incubare 1 ora a temperatura ambiente. Dopo il posizionamento degli strip holder sul sistema "EttanIPGphor" si è proceduto con la reidratazione delle strip per 12 ore sotto un voltaggio di 50 V a 20°C. In queste condizioni è possibile operare, nello stesso tempo, sia la reidratazione del gel sulla strip che favorire la migrazione delle proteine verso il loro punto

isoelettrico. È stato impostato il seguente programma di focalizzazione specifico per il pH della strip (pH3-10L) usata e per la lunghezza (7cm) della stessa:

<b>STEP</b>	<b>VOLTAGGIO</b> (V)	<b>VOLT-ORA</b> (KV)	<b>MODALITÀ</b>
<b>Step1</b>	500V	0.15	Gradient
<b>Step2</b>	4000V	5.6	Gradient
<b>Step3</b>	5000V	5	Step-n-Hold
<b>Step4</b>	10V	-	Mantenimento

Le analisi bidimensionale preparative sono state eseguite caricando 100 µg di proteine estratte per ciascuna linea cellulare su strip da 13 cm di pH 3-10L. In questo caso è stato impostato il seguente programma di focalizzazione:

<b>STEP</b>	<b>VOLTAGGIO</b> (V)	<b>VOLT-ORA</b> (KV)	<b>MODALITÀ</b>
<b>Step1</b>	1000V	0.55	Gradient
<b>Step2</b>	6000V	10.5	Gradient
<b>Step3</b>	8000V	16	Step-n-Hold
<b>Step4</b>	10V	-	Mantenimento

### 3.3: II - SECONDA DIMENSIONE: SDS - PAGE.

Per la seconda dimensione è stato utilizzato il sistema Hoefer SE 600 Ruby. La seconda dimensione consiste in una classica SDS-PAGE secondo Laemmli preceduta da due tappe di equilibratura delle strip. La prima fase di equilibratura prevede la riduzione dei ponti disolfuro delle proteine mediante l'utilizzo di un tampone contenente SDS 2%, Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Urea 6 M, Glicerolo 30%, blu di bromofenolo 0,002% e DTT 65 mM. La seconda fase di equilibratura viene condotta nello stesso tampone contenente iodoacetammide 135 mM invece che DTT per l'alchilazione dei gruppi tiolici sulle proteine. Dopo l'equilibratura nel tampone di corsa (Tris 25mM, Glicina 192 mM e SDS 0.1%), le strip sono state posizionate sul lato catodico del Running gel di poliacrilammide al 8% e sigillate con una soluzione di agarosio 0.5% contenente Blu di Bromofenolo. Le impostazioni del programma per la corsa elettroforetica prevedono uno step a 100V per 30 minuti ed uno step a 200V per 4 h 30 min.

### 3.4 METODI DI COLORAZIONE DEI GEL.

- **Impregnazione argantica.** La colorazione argantica utilizzata è stata modificata per essere compatibile con le analisi di spettrometria di massa. Dopo la seconda dimensione, i gel vengono brevemente lavati in acqua milliQ e immersi per 30 minuti in una soluzione di fissaggio contenente metanolo 45% e acido acetico 5%. Segue una fase di

lavaggio di 1 ora in abbondante acqua milliQ. A questo punto, dopo rimozione dell'acqua, i gel sono stati trattati con una soluzione di sensibilizzazione contenente  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,02% per 2 minuti e di seguito lavati 2 volte con acqua per un minuto. Ai gel è stata aggiunta quindi una soluzione fredda di nitrato di argento 0,1% per 30 minuti. Segue una fase di lavaggio uguale a quella descritta precedentemente. Per lo sviluppo dell'immagine è stata utilizzata una soluzione di sodio carbonato anidro 3% e formaldeide 0,03%. Per bloccare la reazione di sviluppo e conservare i gel è stata utilizzata una soluzione 1% di acido acetico.

Le immagini sono state acquisite e digitalizzate con il sistema *ImageMaster* della Amersham Biosciences.

- **Colorazione specifica per glicoproteine.** Il metodo di colorazione per le glicoproteine prevede l'utilizzo del colorante Pro-Q Emerald 300. Si tratta di un idrazide fluorescente che può essere coniugata alle glicoproteine mediante il meccanismo dell'acido periodico di Schiff (PAS). I glicoli presenti nelle glicoproteine vengono prima ossidati ad aldeidi utilizzando il periodato e poi fatti reagire con il colorante per formare un coniugato altamente fluorescente. Il protocollo prevede l'incubazione dei gel a temperatura ambiente per 45 minuti nella *Fix Solution* (50% metanolo). In seguito i gel sono stati lavati per 10 minuti in agitazione con la *Wash Solution* (3% acido acetico). Segue l'ossidazione dei carboidrati con la soluzione di acido periodico (acido periodico 1% v/v in acido acetico 3%) per 30 minuti. I gel vengono successivamente lavati in *Wash Solution* per

10 minuti e quindi colorati con la *Staining Solution* (500 µl di Pro-Q Emerald in 25 ml di Pro-Q Emerald Buffer forniti dalla casa produttrice) per 90-120 minuti al buio. Al termine della fase di colorazione i gel sono lavati e conservati nella Wash Solution.

L'acquisizione delle immagini è stata effettuata con una transilluminatore GelDoc2000 della Biorad.

### **3.5. DIGESTIONE IN GEL DI PROTEINE SEPARATE MEDIANTE SDS-PAGE.**

#### **3.5: I - "DESTAINING" DEGLI SPOT PROTEICI.**

Gli spot di interesse sono stati excisi dal gel riponendo quest'ultimo su una lastra di vetro pulita ed utilizzando un bisturi con lama sterile per minimizzare le contaminazioni da Cheratine. Gli spot così ottenuti sono stati quindi trasferiti in provette da 1,5 ml sterili e lavati con 300 µl di acqua milliQ sterile per 15 minuti per rimuovere l'acido acetico.

Dopo aver rimosso l'acqua di lavaggio, agli spot sono stati aggiunti 50 µl di una soluzione di Potassio Ferricianuro 15 mM e Sodio Tiosolfato 50 mM per 5-10 minuti finché i frammenti di gel non si decolorano completamente.

Dopo aver eliminato il surnatante, i frammenti di gel sono stati lavati con 300 µl di acqua milliQ sterile per 15 minuti e per altri 15 minuti con 300 µl CH<sub>3</sub>CN. Agli

spot sono stati aggiunti, dopo eliminazione della soluzione di lavaggio, 300  $\mu\text{l}$  di una soluzione di Bicarbonato di Ammonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 100 mM per 15 minuti. Rimosso il surnatante, gli spot sono stati lavati con 300  $\mu\text{l}$  di una soluzione 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  /  $\text{CH}_3\text{CN}$  (50:50 v/v) per 15 minuti sotto lenta agitazione.

I frammenti di gel, dopo aver scartato il surnatante, sono stati frantumati utilizzando uno stick di teflon per aumentare la superficie di contatto tra il gel e le soluzioni.

In seguito sono stati disidratati con 100  $\mu\text{l}$  di  $\text{CH}_3\text{CN}$  ed essiccati in un concentratore Speed Vac.

### **3.5: II - RIDUZIONE ED ALCHILAZIONE.**

I frammenti di gel sono stati reidratati con 50  $\mu\text{l}$  di una soluzione 100 mM di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  contenente 10 mM di DTT; la reazione di riduzione è stata eseguita per 1 h ad una temperatura di 56°C. Dopo aver rimosso la soluzione di riduzione, sono stati aggiunti 50  $\mu\text{l}$  di una soluzione di 100 mM di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  contenente 50 mM di iodoacetammide; la reazione di alchilazione è stata eseguita per 30 minuti al buio. A questo punto i frammenti di gel sono stati lavati due volte, per 15 minuti, prima con 300  $\mu\text{l}$  di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e successivamente con 300  $\mu\text{l}$  di una soluzione 50:50 di  $\text{CH}_3\text{CN}$  e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  20 mM. Dopo ciascun lavaggio è stato eliminato il surnatante. A questo punto sono stati aggiunti 100  $\mu\text{l}$  di  $\text{CH}_3\text{CN}$  per disidratare i frammenti di gel, incubando 5 minuti, e dopo

rimozione del surnatante, i campioni sono stati essiccati mediante concentratore SpeedVac.

### **3.5: III - DIGESTIONE CON TRIPSINA.**

I frammenti di gel sono stati reidratati aggiungendo 5  $\mu\text{l}$  di una soluzione 100 mM di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  contenente 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  di tripsina.

Dopo una fase di incubazione di 2 minuti sono stati aggiunti 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione 100 mM di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in modo da coprire totalmente i frammenti di gel, che sono stati messi in seguito ad incubare a 37°C per tutta la notte.

Il giorno successivo il surnatante è stato raccolto e trasferito in provette da 1,5 ml; ai frammenti di gel sono stati quindi aggiunti 100  $\mu\text{l}$  di acqua millQ mantenendo le provette in agitazione per 5 minuti. Successivamente il surnatante delle provette con i frammenti di gel è stato prelevato ed unito alla prima frazione raccolta. Un'ulteriore fase di estrazione dei peptidi prevede l'aggiunta per due volte consecutive di 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione contenente 60% di  $\text{CH}_3\text{CN}$  e 1% Acido Trifluoroacetico (TFA) in agitazione per 10 minuti. Il surnatante raccolto negli ultimi due passaggi viene anch'esso riunito alle frazioni precedenti. A questo punto i peptidi estratti dai frammenti di gel sono stati concentrati mediante concentratore Speed Vac.

### 3.6 ANALISI DEI PEPTIDI.

I peptidi sono stati analizzati utilizzando un sistema LC/MS costituito da un'HPLC Surveyor e collegato con uno spettrometro di massa LCQ Deca-Ion trap Quadrupolo. Le condizioni di analisi sono riassunte nella seguente tabella:

Colonna	PEP100 C8 5 $\mu\text{m}$ (150x1mm)							
Temperatura colonna	27°C							
Fase mobile	Eluente A: H <sub>2</sub> O, 0.1% Acido Formico Eluente B: CH <sub>3</sub> CN, 0.1% Acido Formico							
Gradiente	T (min)	0	2.5	75	78	88	90	100
	%A	100	100	15	5	5	100	100
	%B	0	0	85	95	95	0	0
Flusso	400 $\mu\text{l}/\text{min}$							
Volume di iniezione	10 $\mu\text{l}$							
MS detector	Sorgente						tipo ESI	
	Vtaggio sorgente						5.0 kV	
	Polarità						positiva	
	Temperatura capillare						200°C	
	Sheath gas flow (N <sub>2</sub> )						70	
	Flusso gas ausiliario						8	
	Vtaggio capillare						50 V	
	Tube lens offset						69 V	
	MS run time						100 min	
	Scan mode						MS and MS/MS	
	mass range						400-1900 m/z	

L'interpretazione dei dati e l'identificazione delle proteine sono state eseguite mediante il Database Mascot Search (Matrix Science) ed il sistema Turbo Sequest Search.

### **3.7 IMMUNOCITOCHIMICA**

Le cellule HepG2 e CHANG sono state piastrate su vetrini coprioggetto adagiati sul fondo di una multiwell da 12 pozzetti in numero di  $25 \times 10^4$  per pozzetto.

Dopo aver rimosso il terreno di coltura ed aver lavato i pozzetti con PBS, tutte le cellule sono state fissate con paraformaldeide 2% al buio per 10 min. Dopo il lavaggio dal fissativo, le cellule sono state lavate con una soluzione saturante contenente 1 mg/ml di BSA in PBS per tre volte. In parallelo, come controllo, le stesse cellule sono state trattate con il protocollo classico che prevede una fase di permeabilizzazione. In questo caso le cellule sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente (r.t.) in una soluzione di PBS contenente Triton X100 0,1% e successivamente saturate con la stessa soluzione a cui è stata aggiunta la BSA (1 mg/ml) per 45 minuti a r.t. Dopo la saturazione alle cellule sono stati aggiunti gli anticorpi primari nelle seguenti diluizioni: Anti-biotina 1:100, Anti-HSP90 1:200, Anti-GRP94 1:500 e Anti-GRP78 1:500 in PBS

contenente 2mg/ml di BSA e nel caso della permeabilizzazione anche 0,01% Triton per tre ore a r.t. Successivamente le cellule sono state lavate dall' anticorpo primario con la soluzione saturante e incubate con l'anticorpo secondario anti-Rabbit coniugato con fluoresceina e, nel caso dell'anti-HSP90, con anti-Mouse coniugati con rodamina e fluoresceina nella diluizione 1:1000 in PBS contenente 2mg/ml di BSA, fatta eccezione per quelle trattate con l'antibiotina, già coniugata con la fluoresceina. Dopo l'incubazione per 30 min al buio e a temperatura ambiente le cellule sono state lavate con PBS contenente 1mg/ml di BSA ed i vetrini riposti su un vetrino portaoggetto precedentemente trattato con il MOWIOL e la resina DAPI per visualizzare i nuclei. Per minimizzare gli effetti del fissativo sulle proteine di membrana e quindi, per essere certi che i segnali di fluorescenza visualizzati derivassero effettivamente dalla superficie cellulare, un esperimento analogo, a quello appena descritto, è stato eseguito su cellule non fissate. L'osservazione delle cellule è stata effettuata utilizzando il microscopio Leica DC 300F.

### 3.8 PROTOCOLLI DI “N - DEGLICOSILAZIONE.

#### ➤ **DEGLICOSILAZIONE IN SOLUZIONE**

Per la deglicosilazione in gel sono stati sciolti circa 50 µg di Fetuina in 50 µL di NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM (pH 8.6) e 0.4% SDS. Circa 5 µL di questa soluzione vengono prelevati per analisi SDS PAGE (per saggiare il grado di deglicosilazione prima e dopo trattamento enzimatico). Il campione glicoproteico così preparato viene scaldato a 100°C per 3 min. Dopo raffreddamento al campione vengono aggiunti 50 µL di una soluzione di CHAPS 1% in tampone NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM (pH 8.6). A questo punto vengono aggiunti 0.2 U di PNGasi F ed il campione incubato per 24 h a 37°C. Si procede, quindi, con la precipitazione delle proteine in 4 volumi di Etanolo 75% v/v per 1h in ghiaccio e quindi centrifugazione a 13000 rpm per 30 minuti. I glicani, presenti nel surnatante, vengono recuperati e concentrati mediante concentratore Speed Vac.

#### ➤ **DEGLICOSILAZIONE IN GEL**

L'enzima utilizzato per la N-deglicosilazione è la Peptide: *N*-GlycosidaseF, anche nota come PNGasi F. Si è messo a punto un protocollo di deglicosilazione in gel bidimensionale utilizzando come standard glicoproteico la Fetuina. A questo proposito sono stati utilizzati 20 µg di Fetuina. Dal gel ottenuto

sono state excise le bande di interesse con un bisturi pulito, cercando di ottenere pezzi di gel molto piccoli che successivamente sono stati messi in provette da 1.5 ml e lavati con 1 ml di 20 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 7.0 per 2 volte, in agitazione, lasciando incubare 30 min. Dopo eliminazione della soluzione di lavaggio, alle bande sono stati aggiunti 300 µl NaHCO<sub>3</sub> pH 7.0. A tale soluzione sono stati aggiunti 20 µl di DTT 45 mM e quindi incubati a 60°C per 30 minuti. Dopo una fase di raffreddamento a temperatura ambiente sono stati aggiunti 20 µl di iodoacetamide 100mM e quindi incubati per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. La soluzione è stata successivamente eliminata. A questo punto, ai frammenti di gel è stata aggiunto 1 ml di una soluzione 1:1 di CH<sub>3</sub>CN/20 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 7.0 a cui segue una fase di incubazione di 1h per rimuovere gli agenti riducenti e l'SDS. I frammenti di gel sono stati successivamente disidratati mediante concentratore SpeedVac.

Dopo la disidratazione sono stati aggiunti 3 U di PNGasi F in 30 µl 20 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 7.0. La reidratazione dei gel è stata eseguita in ghiaccio e in seguito sono stati aggiunti 100 µl di buffer 20mM NaHCO<sub>3</sub> pH 7.0. La fase di incubazione con PNGasi F è stata eseguita a 37°C per 12-18 h.

A questo punto i glicani sono stati estratti recuperando la soluzione di digestione ed operando 3 lavaggi di 30 minuti usando acqua milliQ e sonicando ad intermittenza. Le frazioni di estrazione sono state quindi riunite e liofilizzate.

### **3.9 ANALISI DEI GLICANI.**

I glicani ottenuti mediante deglicosilazione enzimatica sono stati analizzati utilizzando un sistema LC/MS costituito da un HPLC Surveyor dotato di "MS Pump" e di autocampionatore e collegato con uno spettrometro di massa LCQ Deca XP. Le condizioni di analisi sono riassunte nella seguente tabella:

Colonna	"Ammino" Luna 5 $\mu$ m Phenomenex						
Temperatura colonna	27°C						
Fase mobile	Eluente A: CH <sub>3</sub> CN Eluente B: Formiato di Ammonio 5 mM pH 3.5						
Gradiente	T (min)	0	5	10	20	25	
	%A	100	100	80	0	100	
	%B	0	0	20	100	0	
Flusso	400 $\mu$ l/min						
Volume di iniezione	10 $\mu$ l						
MS detector	Sorgente					tipo ESI	
	Vtaggio sorgente					4.5 kV	
	Polarità					positiva	
	Temperatura capillare					240°C	
	Sheath gas flow (N <sub>2</sub> )					20	
	Flusso gas ausiliario					0	
	Vtaggio capillare					24 V	
	Tube lens offset					35 V	
	MS run time					25 min	
	Scan mode					MS	
	mass range					200-2000 m/z	

Per la gestione dello strumento e per l'analisi dei dati è stato impiegato il software Xcalibur 1.3 della Thermo Finnigan.

## 4. RISULTATI

La strategia sviluppata in questo lavoro di Tesi si basa sull'impiego di due linee cellulari: la linea CHANG, come modello di epatocita normale, e la linea HepG2, come modello di epatocarcinoma cellulare.

La linea CHANG deriva da tessuto di fegato normale, presenta marker antigenici e caratteristiche genetiche riscontrate nella linea cellulare tumorale HeLa; sotto il profilo proteico, queste cellule mostrano una notevole somiglianza con le cellule normali di fegato e sono quindi citate spesso in letteratura come modello di epatocita in condizione fisiologica<sup>[6]</sup>.

Le cellule HepG2 sono una linea cellulare stabilizzata in coltura derivata da cellule di un epatocarcinoma umano.

Per quanto riguarda l'approccio sperimentale, ci si è subito scontrati con la difficoltà oggettiva di intraprendere "ex abrupto" un'analisi glicomica e proteomica delle glicoproteine di membrana. Infatti, in letteratura non sono disponibili dati esaustivi in merito ad approcci procedurali univoci e standardizzati per lo studio di queste particolari proteine. Si è reso perciò necessario estrapolare dai vari protocolli descritti quelle tecniche, relative a problematiche analoghe, che si adattassero meglio alle nostre esigenze, in termini di purezza, resa e compatibilità con analisi successive.

## 4.1 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE.

Le strategie di frazionamento del campione devono essere opportunamente adattate sulla base delle caratteristiche fisico-chimiche, della localizzazione topografica e dell'abbondanza delle proteine d'interesse. Inoltre, devono essere condotte in modo da preparare il campione per le analisi successive, quali l'elettroforesi bidimensionale.

Le glicoproteine di membrana sono proteine scarsamente rappresentate: si stima, infatti, che solamente il 30% delle proteine espresse venga esposto sulla membrana cellulare. L'estrazione deve perciò essere molto accurata e mirata, in modo da permettere di discriminare le proteine di membrana da quelle provenienti da altri compartimenti cellulari. Si tratta, inoltre di proteine ad alto PM e poco solubili per la presenza di porzioni altamente idrofobiche che, in soluzione, tendono ad aggregare e precipitare: ciò comporta la perdita di parte del campione, già quantitativamente limitato, e una bassa risoluzione in 2-DE. Infine, proprio per la struttura e la posizione della membrana, il campione può contenere contaminazioni di molecole endogene cariche negativamente (nucleotidi, fosfolipidi, ecc.) che complicano ulteriormente la fase di solubilizzazione e di risoluzione delle glicoproteine.

Sulla base di queste considerazioni un metodo di estrazione ottimale deve mirare innanzitutto ad arricchire il campione in proteine di membrana e ad ottenere un prodotto il più possibile puro, privo di contaminazioni, in forma solubile e che rimanga tale durante la successiva fase di IEF. Oltre a ciò deve essere tale da consentire la separazione delle proteine come singola catena polipeptidica durante la 2-DE. A tal fine, il campione deve essere trattato in modo da distruggere tutte le interazioni inter- e intra- molecolari, senza però causare alterazioni della carica netta delle proteine e precludere così la fase di isoelettrofocalizzazione.

Sono state valutate due procedure di estrazione, basate su differenti principi separativi.

In un primo momento è stato utilizzato un protocollo di estrazione differenziale che prevede l'utilizzo di detergenti, agenti riducenti e agenti caotropici. Il metodo, messo a punto da Molloy su cellule batteriche di *E. coli*, è uno dei più utilizzati in quanto è estremamente veloce, poco costoso e permette di superare gli inconvenienti relativi alla solubilità delle proteine transmembrana e alla compatibilità con l'elettroforesi bidimensionale. Questo approccio si articola in tre fasi. Nella prima fase viene effettuata una blanda lisi per consentire la separazione del contenuto citoplasmatico dalle membrane; nella seconda vengono solubilizzate le proteine legate debolmente alla membrana plasmatica mentre nella terza fase si procede con la disgregazione delle membrane e si assiste al passaggio in soluzione delle proteine di membrana grazie alla presenza di surfattanti che minimizzano le interazioni idrofobiche<sup>[73]</sup> [74].

Il protocollo di Molloy, per quanto rapido e versatile, non impedisce che vi siano contaminazioni di proteine provenienti da altri compartimenti cellulari, come abbiamo potuto notare, anche solo da un esame visivo, dai gel sviluppati nei quali i caratteristici pattern di distribuzione delle glicoproteine (trenini di spot) sono coperti da altri tipi di segnale, privi di questa peculiarità.

Per superare i limiti dell'utilizzo di questa strategia di frazionamento, è stato preso in considerazione un altro tipo di approccio, estremamente interessante e versatile, basato sulla marcatura ("tagging") delle proteine di membrana<sup>[75]</sup>.

Le tecnologie di marcatura sono note da molto tempo e sono state utilizzate in una varietà di applicazioni ma, sorprendentemente, pochissimi studi hanno incluso tale procedura come parte di una strategia per isolare proteine da miscele complesse e aumentare così la sensibilità di procedure quali la 2-DE.

La strategia di tagging scelta si basa sulla marcatura delle proteine di membrana mediante l'utilizzo di un analogo della biotina. La biotinilazione delle proteine è una procedura ormai ben consolidata ed utilizzata comunemente in biochimica ed in molti ambiti immunodiagnostici per l'elevata affinità della biotina con l'avidina e la streptavidina e per la sua specificità e stabilità in diverse condizioni sperimentali<sup>[76]</sup> [77].

In genere viene adoperato un particolare tipo di biotina, modificata con gruppi funzionali che possono reagire in maniera specifica, e spesso irreversibile, con gli ammino-gruppi dei residui di lisina delle proteine, senza però alterarne le attività biologiche: il risultato è una proteina dotata di un segnale altamente specifico.

Nella maggior parte dei protocolli si fa riferimento a proteine in soluzione e già purificate. Per questo tipo di tagging sono disponibili diversi dati sperimentali che confermano l'efficacia e la validità del metodo.

Per quanto riguarda le proteine di membrana, i protocolli esistenti devono essere opportunamente adattati alle necessità del caso: nello specifico, è fondamentale che la marcatura avvenga su cellule intere, e non su proteine in soluzione, ed esclusivamente a livello delle proteine di membrana. A tal proposito, sono state sviluppate diverse molecole derivate dalla biotina, dotate di caratteristiche chimiche particolari che possono essere sfruttate in base alle esigenze specifiche. Ad esempio esiste un tipo di biotina modificata con l'aggiunta di un gruppo solfonato, la "Sulfo-NHS-LC-biotina"<sup>[75][78]</sup>. La carica negativa portata dal gruppo solfonato garantisce una buona solubilità della biotina in solventi acquosi e ne impedisce l'attraversamento della membrana plasmatica, risolvendo entrambe le problematiche, indicate precedentemente.

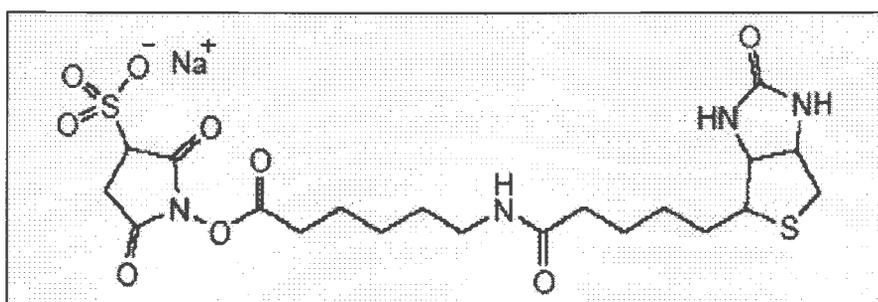
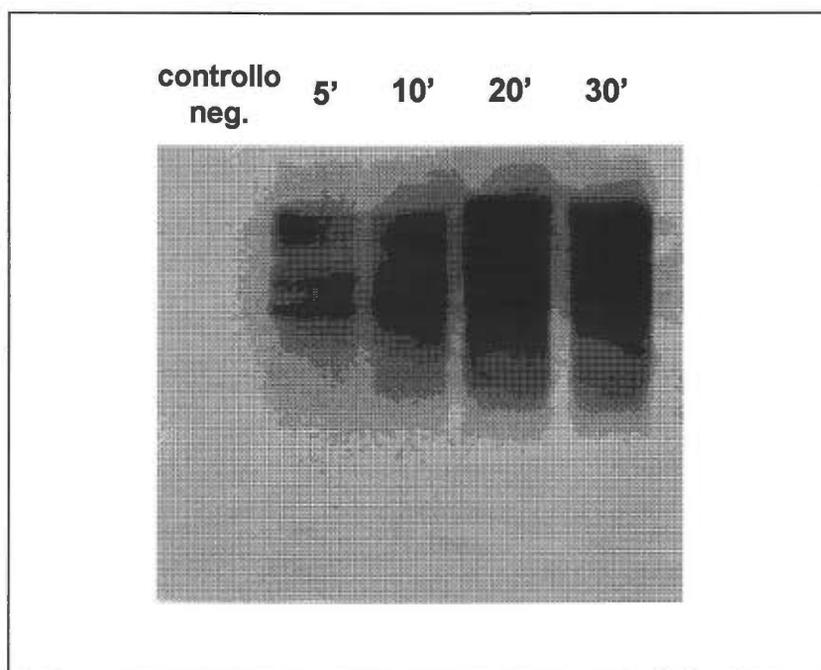


Figura 9. Struttura chimica della "Sulfo-NHS-LC-Biotina".

La biotinilazione delle proteine di membrana viene eseguita semplicemente incubando le cellule con una soluzione contenente la "Sulfo-NHS-LC-biotina". In via preliminare, è stata valutata la cinetica della reazione di biotinilazione in modo da elaborare le migliori condizioni di marcatura. A tal fine,

sono state utilizzate 5 fiasche di cellule HepG2, incubate con biotina per tempi progressivi. Dopo i passaggi di estrazione, quantità uguali di proteine per ciascun campione sono state separate mediante SDS-PAGE monodimensionale: il gel è stato poi sottoposto a western blot ed il segnale della biotina legata alle proteine è stato rivelato mediante un anticorpo anti-biotina coniugato con fosfatasi alcalina.



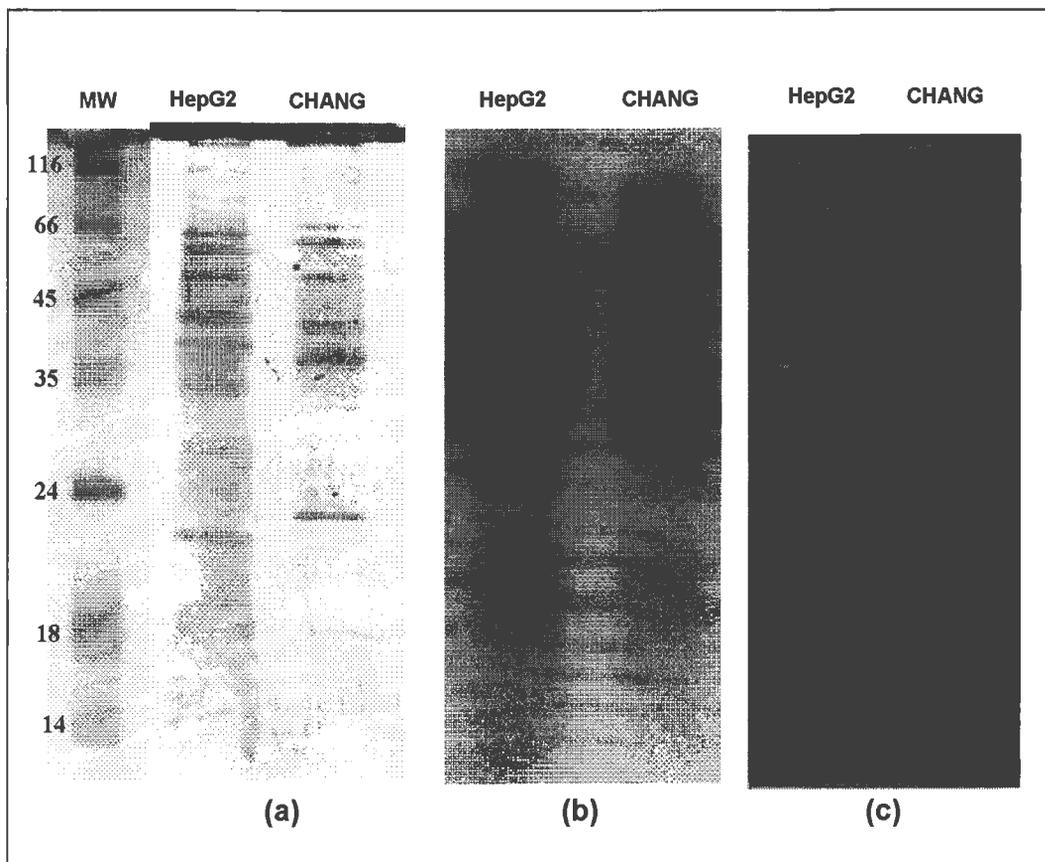
**Figura 10. Western Blot della cinetica di biotinilazione.**

E' interessante notare come il massimo grado di biotinilazione venga raggiunto dopo 20 minuti e non si osserva un aumento significativo dopo 30 minuti, come indicato dal relativo segnale di chemiluminescenza, probabilmente a causa della degradazione delle molecole di biotina.

## 4.2 PURIFICAZIONE PROTEINE ESTRATTE.

Le proteine di membrana, seppur marcate con la biotina, risultano difficili da individuare mediante elettroforesi a causa della loro limitata abbondanza a livello cellulare. Prima dell'analisi mediante elettroforesi bidimensionale, si è perciò reso necessario procedere ad una fase di purificazione ed arricchimento del campione, in modo da separare le proteine biotinilate da quelle non marcate. A questo proposito si può sfruttare il legame altamente specifico tra biotina e avidina. Tale interazione è solitamente irreversibile e per permettere l'eluizione delle proteine d'interesse dopo il legame, è stata utilizzata una colonna di affinità funzionalizzata con un particolare tipo di avidina, difettiva di due subunità, che instaura con la biotina dei legami di tipo reversibile.

L'eluizione delle proteine biotinilate legate dalla colonna avviene per competizione mediante una soluzione a maggior concentrazione di biotina (5 mM), espediente che non danneggia né il ligando né l'avidina. Per valutare il grado di purezza e l'integrità delle proteine eluite è stata effettuata una separazione tramite elettroforesi monodimensionale, sia per i campioni provenienti dalla linea CHANG che per quelli HepG2. Sono stati realizzati tre gel, colorati rispettivamente con impregnazione argentica e con Pro-Q Emerald 300, mentre l'ultimo è stato sottoposto a western blot.



**Figura 11. Analisi degli estratti proteici di CHANG ed HepG2.**

**(a) SDS-PAGE 10% colorazione argentica;**

**(b) WB con anticorpo anti-biotina;**

**(c) SDS-PAGE 10% colorazione ProQ Emerald 300.**

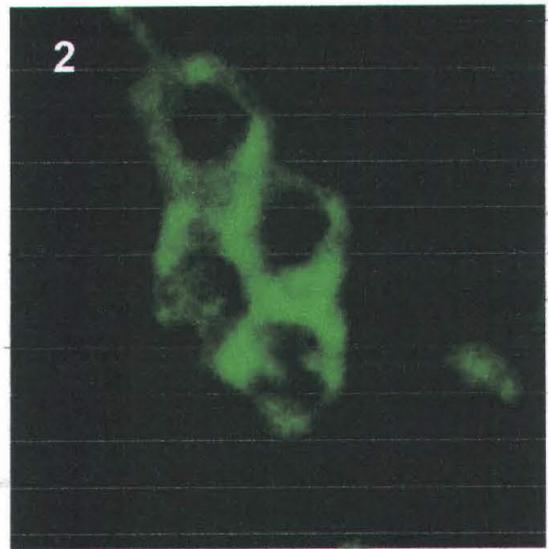
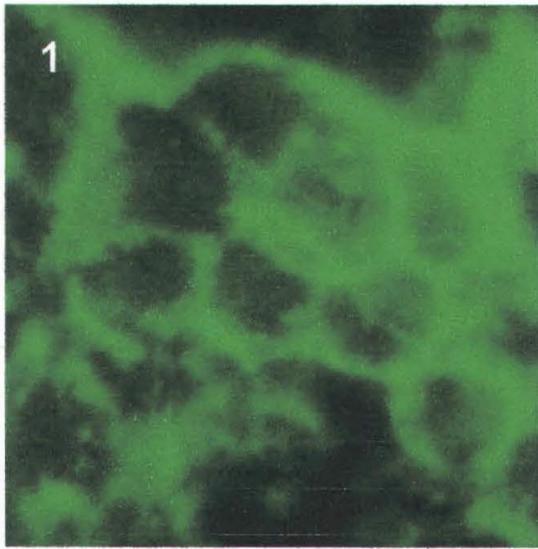
I risultati di queste prove preliminari forniscono informazioni interessanti: nella figura **11(a)** si può osservare come la maggior parte delle proteine estratte presenti un peso molecolare elevato e che queste sono tutte biotinilate (figura **11(b)**). Infine, per dimostrare che si tratta effettivamente di glicoproteine, il gel in figura **11(c)** è stato colorato con un colorante specifico per i glicani, il Pro-Q Emerald 300. Si tratta di un idrazide fluorescente che può essere coniugata con le glicoproteine mediante il meccanismo dell'acido periodico di Schiff (PAS): i glicoli presenti nelle glicoproteine vengono prima ossidati ad aldeidi tramite il

periodato e poi fatti reagire con il ProQ Emerald 300 per formare un colorante altamente fluorescente<sup>[48]</sup>. Il profilo evidenziato ha una buona corrispondenza con quello della colorazione argintica.

Un'ulteriore conferma che la sulfo-NHS-LC-biotina è in grado di marcare selettivamente la membrana plasmatica deriva da esperimenti di immunocitochimica eseguiti su entrambe le linee cellulari utilizzando un anti-biotina coniugato con fluoresceina.

Lo scopo di questo esperimento era quello di verificare la presenza delle proteine biotinilate sulla membrana plasmatica; è stato quindi necessario preservare l'integrità della membrana utilizzando un protocollo di immunocitochimica che non prevede passaggi di permeabilizzazione. Come si può notare in figura **12** la fluorescenza indica la localizzazione dell'agente biotiniliante sulla superficie cellulare.

Sulla base di queste osservazioni preliminari, sono state effettuate le prove di separazione in 2-DE con lo scopo di iniziare a caratterizzare la componente glicoproteica.



**Fig.12 . Le linee cellulari HepG2 (1) e CHANG (2) liver sono state biotinilate e successivamente trattate con anti-biotina coniugato con Fluoresceina. Controllo cellule HepG2 non biotinilate (3).**

### 4.3 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE.

La fase di preparazione del campione per l'IEF è il passaggio cruciale per la buona riuscita di un'analisi 2-DE. A causa della grande diversità dei campioni proteici, soprattutto in relazione alle loro caratteristiche chimiche, i protocolli usati devono essere di volta in volta opportunamente adattati. In linea generale, questa fase deve portare alla completa solubilizzazione, denaturazione, riduzione delle proteine d'interesse e deve impedirne l'aggregazione per tutta la durata degli esperimenti.

E' già stato più volte ribadito che le glicoproteine di membrana sono particolarmente difficili da trattare, per la loro scarsità, idrofobicità e per le loro elevate dimensioni.

Alcuni accorgimenti vengono apportati indipendentemente dal tipo di proteine analizzate e questo vale principalmente per la presenza, nel campione di partenza, di impurità di natura non proteica, quali ad esempio sali o molecole cariche che possono interferire con la focalizzazione e quindi con la separazione e la successiva visualizzazione e devono perciò venir rimossi o comunque mantenuti a concentrazioni il più basse possibili. Nel nostro caso, le proteine purificate si trovano in PBS. Un metodo molto efficiente per rimuovere questo tipo di contaminanti e che comporta una perdita di campione minima è la dialisi. Per le glicoproteine di membrana è da evitare una lunga dialisi in quanto, essendo poco solubili, tendono a precipitare. Tuttavia si è osservato che sono sufficienti circa 24 ore di dialisi per ottenere una buona rimozione di sali senza provocare aggregazione delle proteine. A questo punto il campione viene liofilizzato.

Notevoli miglioramenti sono stati introdotti nella fase di solubilizzazione del campione. La scelta del metodo più appropriato viene in ogni caso fatta tenendo conto del tipo di campione, ma in generale vengono utilizzati particolari reagenti che, da un lato, portano e mantengono le proteine in soluzione, dall'altro consentono di conservare intatta la carica netta della catena polipeptidica, per non precludere la fase di focalizzazione isoelettrica. Gli agenti

chimici più utilizzati in tal senso comprendono sostanze surfattanti, caotropiche e agenti riducenti

I tensioattivi vengono normalmente impiegati in sinergia con gli agenti caotropici e sono importanti nel prevenire le interazioni idrofobiche che potrebbero instaurarsi in seguito all'esposizione dei domini idrofobici per effetto di sostanze quali l'urea o la tiourea e quindi nel minimizzare la formazione di aggregati. Il surfattante più utilizzato nelle classiche elettroforesi è il sodio dodecilsolfato (SDS) che però, essendo carico negativamente, altera la carica complessiva delle proteine. Il suo utilizzo, o quello di denaturanti simili, deve perciò essere limitato, se non addirittura da evitare, nelle analisi bidimensionali, almeno per quanto concerne la prima dimensione. Tra i detergenti non carichi e zwitterionici più utilizzati nell'IEF troviamo il Triton X-100, l'NP-40 e il CHAPS<sup>[79]</sup>.

Gli agenti caotropici sono sostanze che rompono i legami idrogeno inter- e intra- molecolari che stabilizzano la struttura tridimensionale di una proteina, portando alla sua denaturazione. Il caotropico d'elezione nella 2-DE è l'urea, priva di carica e normalmente usata a concentrazioni piuttosto elevate (fino a 8 M). Per le proteine di membrana, oltre all'urea, viene aggiunto anche un altro reagente, la tiourea: la combinazione di questi due agenti caotropici aumenta notevolmente la solubilità anche dei campioni più idrofobici<sup>[80] [81]</sup>.

Infine, gli agenti riducenti vengono utilizzati principalmente per la rottura dei ponti disolfuro: i più comuni sono il DTT (ditiotreitolo), il DTE (ditioeritritolo) e la tributil fosfina (TPB)<sup>[82]</sup>. Quest'ultima, nonostante sia un efficace riducente, è in realtà da evitare perché poco solubile e instabile. Non è invece raccomandato l'uso del 2-Mercaptoetanololo, in quanto sarebbe necessario in concentrazioni elevate e le impurità presenti possono creare artefatti.

Tenendo conto delle particolari caratteristiche del nostro campione, si è scelto di risospendere il liofilo delle glicoproteine purificate in una soluzione di reidratazione contenente urea, tiourea, CHAPS e DTT. Per migliorare la separazione in prima dimensione, viene aggiunto l'IPG Buffer, una miscela di anfoline che non solo partecipano alla solubilizzazione del campione ma

producono anche una conduttività uniforme attraverso il gradiente di pH presente nelle strip, senza perturbare l'isoelettrofocalizzazione.

Una volta solubilizzato si può procedere con la separazione delle proteine mediante elettroforesi. La prima fase prevede la reidratazione delle strip con la soluzione contenente urea, tiourea, CHAPS e DTT e le proteine: la quantità di campione richiesta deve essere sufficiente da permettere la visualizzazione degli spot ma non eccessiva per poter ottenere una buona risoluzione e distinguere le diverse popolazioni proteiche. In condizioni standard, abbiamo stabilito che circa 100  $\mu\text{g}$  di proteine totali sono in grado di soddisfare queste richieste.

La fase di reidratazione viene condotta nel primo step dell'IEF per circa 12 ore a basso voltaggio (50V), per impedire la precipitazione delle proteine e per assicurarne il completo assorbimento nella strip. L'entrata delle proteine nel gel della strip è infatti una delle tappe più critiche dal momento che interviene una sorta di effetto stacking.

Per questi studi preliminari sono state utilizzate inizialmente strip da 7 cm e in seguito da 13 cm con un range di pH ampio (3-10) in modo da ottenere una mappa sufficientemente estesa da permettere di cogliere, a livello generale, il profilo proteico delle proteine estratte dalle cellule CHANG ed HepG2.

Al termine della prima dimensione, le strip vengono equilibrate in un opportuno tampone che contiene anche DTT, allo scopo di ridurre i ponti disolfuro, e iodoacetamide per alchilare i gruppi sulfidrilici. Questo trattamento previene la generazione di segnali spuri. E' presente anche l'SDS, che in questa fase è indispensabile per permettere poi la separazione delle proteine esclusivamente in base alla massa relativa.

I gel ottenuti dopo la seconda dimensione vengono poi colorati per visualizzare gli spot proteici. Condizione indispensabile è ricorrere ad un metodo di rivelazione sensibile, che consenta di evidenziare proteine poco rappresentate come appunto le glicoproteine di membrana, e che non interferisca con le successive analisi di massa.

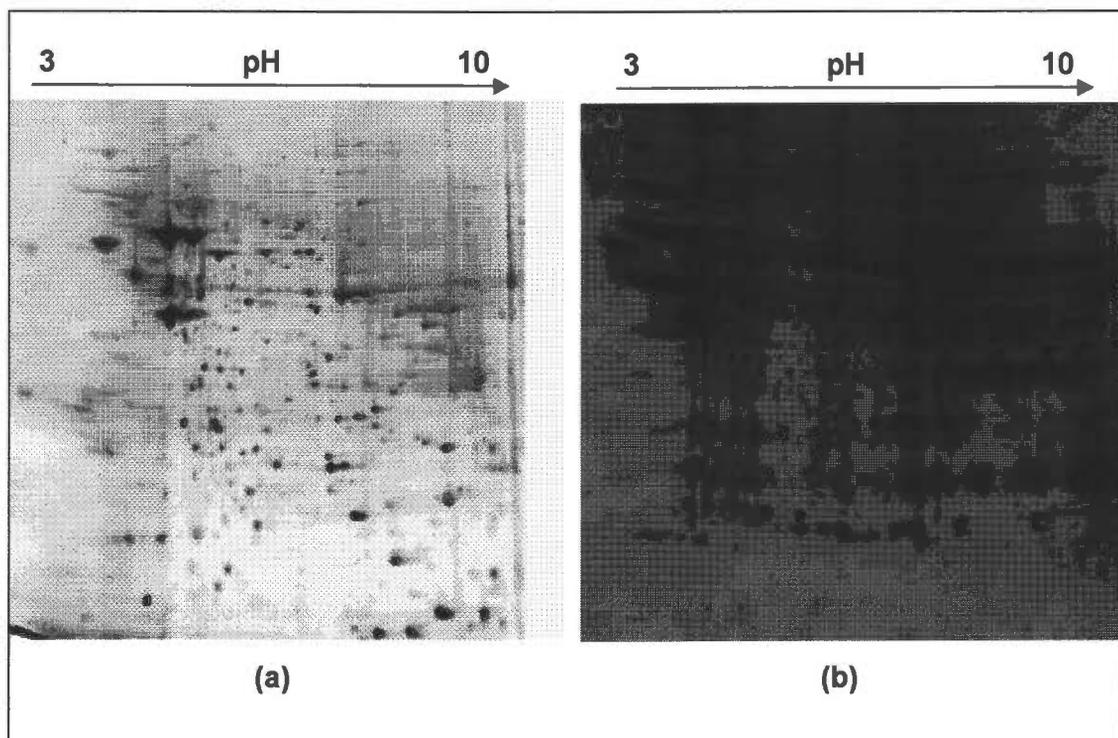
Una tecnica estremamente sensibile è l'impregnazione argentica che si basa sull'affinità delle proteine per il catione argento e permette di rivelare tra 10ng e 1 ng di proteina.

E' una metodica abbastanza complessa che richiede un elevato numero di passaggi, nel corso dei quali molti fattori possono intervenire a influenzare i risultati; inoltre, richiede reagenti ultrapuri e tempi precisi di esecuzione per essere riproducibile. Con alcune accortezze però, molti degli inconvenienti legati a questa tecnica sono superabili e grazie all'elevata sensibilità, la colorazione argentica è ampiamente utilizzata in tutti gli studi di proteomica ed è particolarmente indicata quando occorre ottenere un'informazione molto dettagliata e specifica. Tuttavia, i protocolli classici non sono compatibili con le successive analisi di spettrometria di massa a causa dell'ossidazione delle proteine determinata dall'argento; la loro struttura chimica, infatti, può risultarne modificata o addirittura distrutta, impedendo la successiva caratterizzazione. Inoltre, generalmente la visualizzazione richiede diversi pre-trattamenti del gel con soluzioni sensibilizzanti a base di glutaraldeide, acido cromico, sodio tiosolfato, ecc. che possono apportare modificazioni covalenti alle proteine.

Per lungo tempo lo studio mediante MS di proteine colorate con l'argento è stato considerato impossibile; recenti studi hanno dimostrato, invece, che con un protocollo opportunamente modificato mediante la riduzione della quantità di argento e l'eliminazione della glutaraldeide dal passaggio di sensibilizzazione e della formaldeide dalla soluzione di nitrato d'argento, si può procedere alle analisi di spettrometria di massa<sup>[47]</sup>.

Per valutare che la purificazione tramite biotinilazione porta realmente ad un arricchimento delle proteine di membrana, un *monolayer* di cellule è stato incubato con la biotina e poi lisato mediante un classico protocollo per l'estrazione totale delle proteine cellulari.

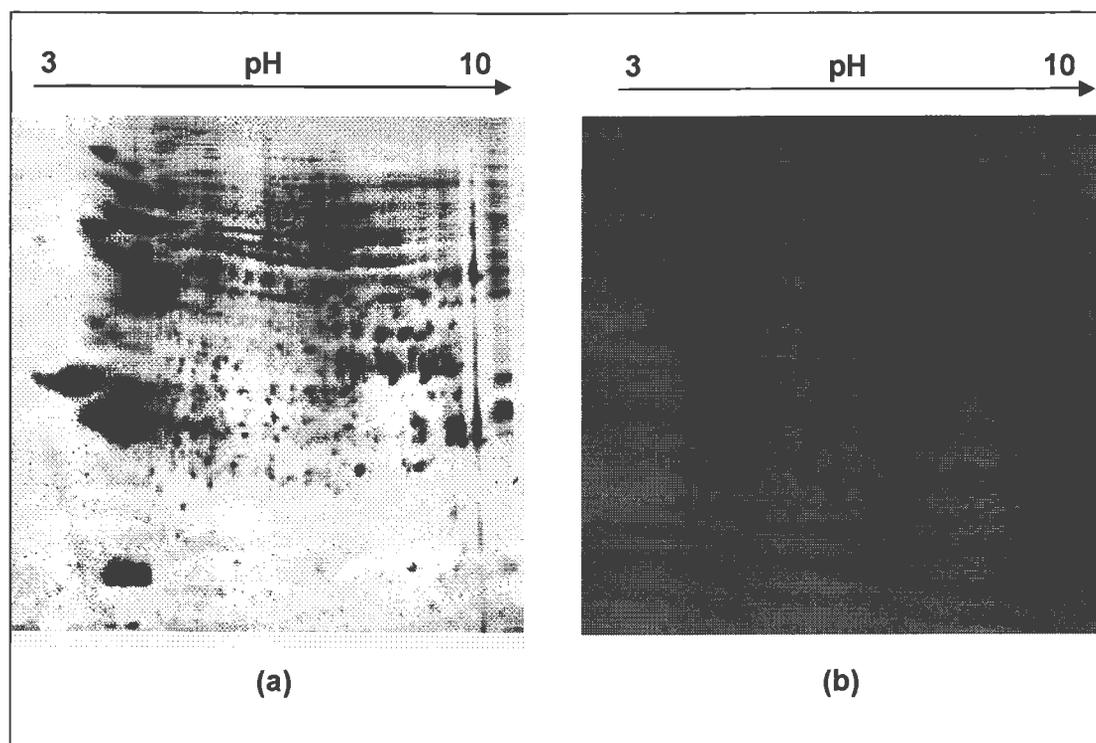
Quantità uguali di campione sono state separate in parallelo mediante 2-DE . Un gel è stato colorato con l'impregnazione argentica mentre l'altro è stato sottoposto a western blot e le proteine biotinilate sono state rivelate mediante un anticorpo anti-biotina coniugato con la fosfatasi alcalina.



**Figura 13. (a) Colorazione argentea 2-DE dell'estratto totale di proteine biotilate da cellule HepG2 e (b) rispettivo western blot con Ab  $\alpha$ -biotina.**

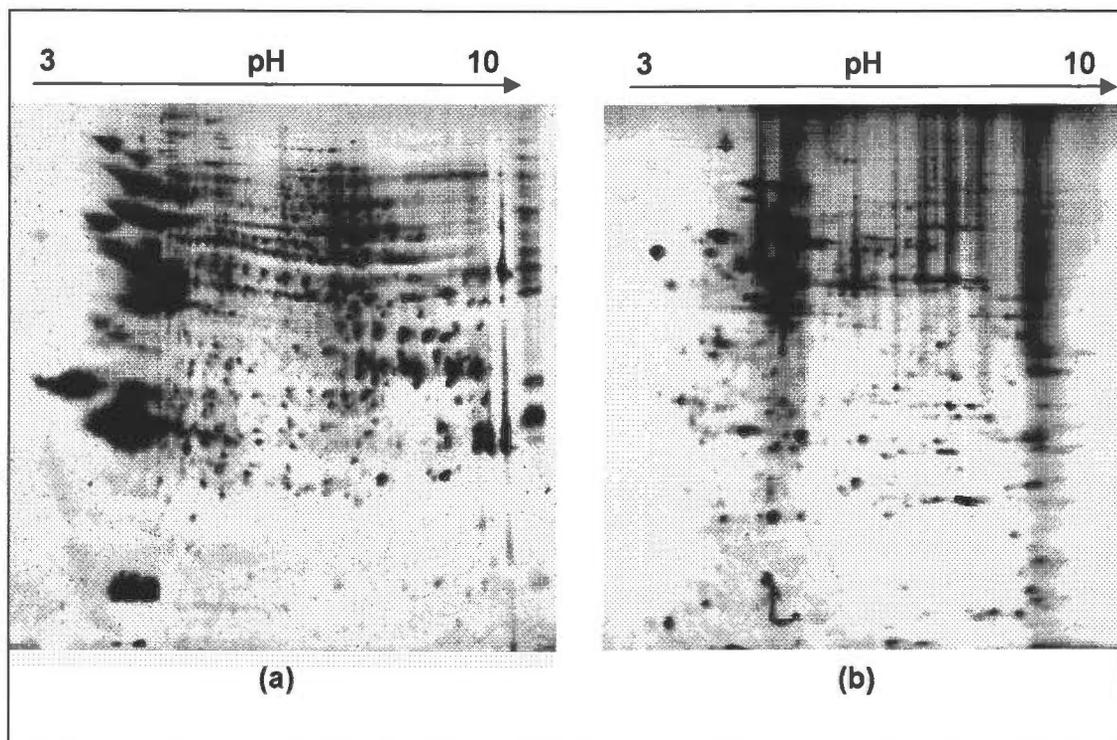
Come si può notare dalla figura 13, i due profili proteici sono molto differenti. Alcune proteine biotinilate rivelate nel western blot si presentano come trenini di spot, come ci si aspetta per le proteine che vanno incontro a numerose modificazioni post-traduzionali (fosforilazione, glicosilazione, sulfonazione, ecc.), profilo che non è d'altra parte distinguibile nel gel del lisato totale. Inoltre, sebbene vi siano alcune corrispondenze tra le due mappe proteiche riportate in figura 13, la grande maggioranza delle proteine biotinilate non è visibile nel profilo evidenziato dall'argentea. Questo suggerisce che grazie alla biotinilazione si è effettivamente ottenuta una visualizzazione selettiva e più intensa delle proteine espresse sulla superficie cellulare.

E' stata successivamente preparata una terza 2-DE in cui è stato caricato un estratto proteico biotinilato e purificato mediante l'avidina: il gel ottenuto è stato sottoposto a impregnazione argentea e successivamente confrontato con il western blot precedente (fig.14). Il profilo delle proteine biotinilate evidenziato per mezzo della colorazione è molto simile a quello ottenuto tramite chemiluminescenza con l'anticorpo anti-biotina, a significare che, in effetti, tutte le proteine estratte sono biotinilate e di membrana.



**Figura 14. (a) Colorazione argentea 2-DE delle proteine biotinilate e purificate da cellule HepG2 e (b) western blot con Ab  $\alpha$ -biotina.**

Per confermare la bontà della scelta del metodo di purificazione tramite marcatura con biotina, sono state messe a confronto le proteine estratte con la strategia differenziale di Molloy e con le proteine biotinilate e purificate secondo il procedimento descritto in questo lavoro di Tesi (fig.15).

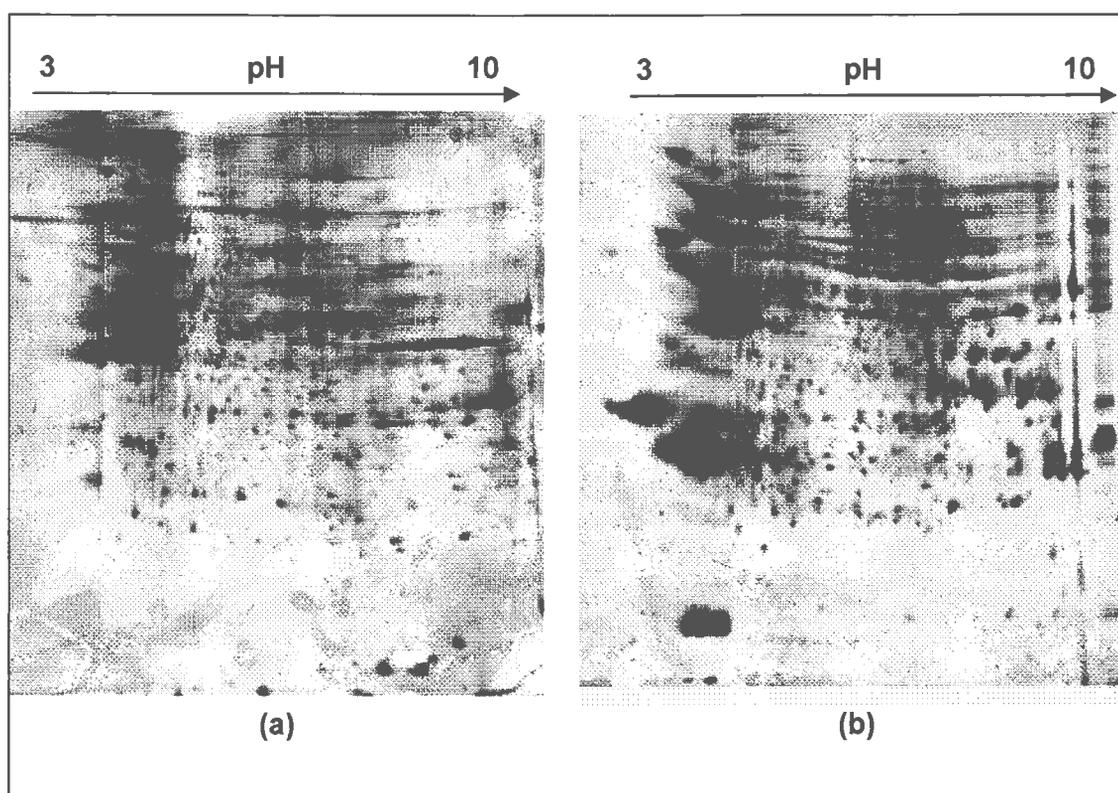


**Figura 15. Colorazioni argentiche 2-DE. (a) proteine biotinilate e purificate da cellule HepG2 , (b) proteine estratte con il metodo proposto da Molloy.**

Dall'osservazione dei pattern proteici la differenza tra le due metodologie risulta abbastanza evidente: l'estrazione differenziale con detergenti, se comparata con il lisato totale della figura 13(a), permette sì un arricchimento in proteine di membrana ma la contaminazione con proteine di altri compartimenti è comunque rilevante e pertanto il metodo appare inadatto ai nostri scopi. La marcatura con biotina viceversa è particolarmente indicata per evidenziare le proteine presenti sulla superficie cellulare.

Una volta settate le condizioni migliori di estrazione, purificazione, separazione e rivelazione si è potuti procedere con l'analisi differenziale dei

profili proteici della linea CHANG e della linea HepG2. Come si può notare in figura 16, le due linee cellulari mostrano notevoli differenze a livello d'espressione proteica, sebbene vi siano interessanti analogie nella zona corrispondente ad pH acido nella strip. Si è scelto di cominciare l'identificazione delle proteine da quelle che risultavano comuni ad entrambe le linee cellulari e che, ad una prima osservazione dei gel, si presentavano come treni di spot associabili alle diverse glicoforme di una glicoproteina.



**Figura 16.** Confronto tra i profili proteici di CHANG (a) e HepG2 (b). Gli estratti proteici sono stati ottenuti con il metodo di biotinilazione.

## 4.4 SPETTROMETRIA DI MASSA.

Una volta che le proteine sono state isolate, gli spot d'interesse sono stati excisi dal gel e preparati per le analisi di massa.

### 4.4: I - ANALISI DEI PEPTIDI

Prima di procedere con la digestione mediante tripsina e l'estrazione dei peptidi dal gel, gli spot excisi sono stati decolorati, ridotti e alchilati (vedi **Materiali e Metodi**)

La miscela peptidica ottenuta è stata concentrata e caricata nell'HPLC/MS-ESI per identificare le proteine in esame.

Nella figura **17** è mostrato un tipico spettro di massa. In **(a)** è presentato lo spettro MS, relativo ai peptidi eluiti dalla colonna HPLC e ionizzati; lo spettro **(b)** indica invece il risultato dell'analisi MS/MS, vale a dire i prodotti di frammentazione dei peptidi generati in seguito alla collisione del campione con un gas inerte (elio).

E' stato evidenziato il picco di uscita del peptide di autolisi della tripsina, che rappresenta un ottimo controllo della riuscita della digestione.

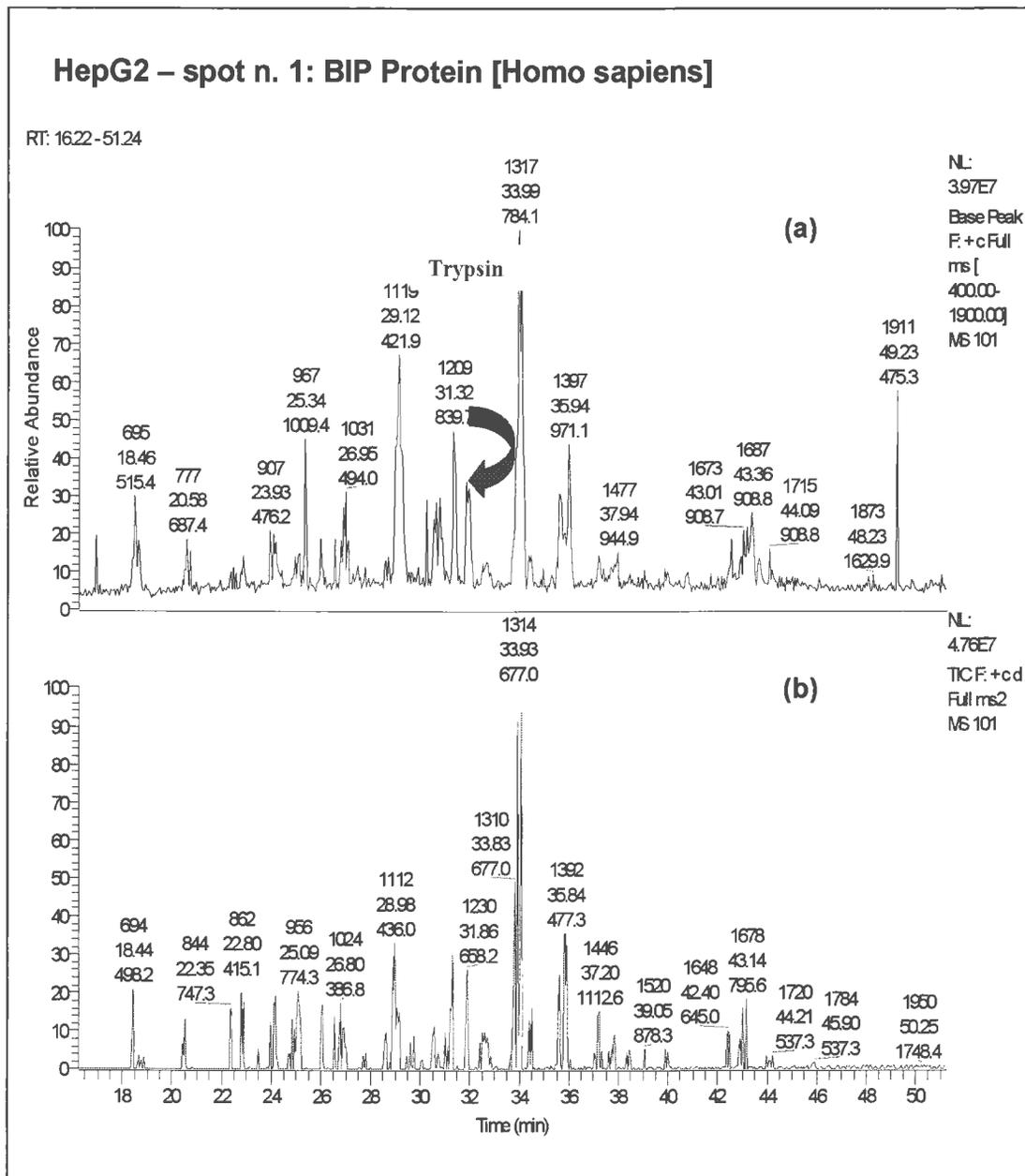


Figura 17. Spettri di massa relativi allo spot n. 1 di HepG2.

L'analisi di tali mappe peptidiche è possibile grazie ad appositi software che portano all'identificazione delle proteine in esame facendo riferimento a banche dati di proteine di cui è nota la sequenza.

Le informazioni ottenute vengono riassunte nella figura **18** in cui sono presenti il nome, la massa, il punto isoelettrico della proteina, il collegamento alla banca dati utilizzata, l'intera sequenza proteica con evidenziati i peptidi trovati durante l'analisi e un valore percentuale della copertura della sequenza identificata rispetto a quella intera, indice dell'attendibilità del risultato.

## HepG2 sample 1:

Match to: **gi|6470150** Score: **1119**

**BiP protein [Homo sapiens]**

Found in search of D:\Xcalibur\data2005\UnivTS\LuisaMarch\New\1\merge.txt

Nominal mass ( $M_r$ ): **71002**; Calculated pI value: **5.23**

NCBI BLAST search of **gi|6470150** against nr

Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Homo sapiens

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y), Glyc-Asn (N)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **40%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

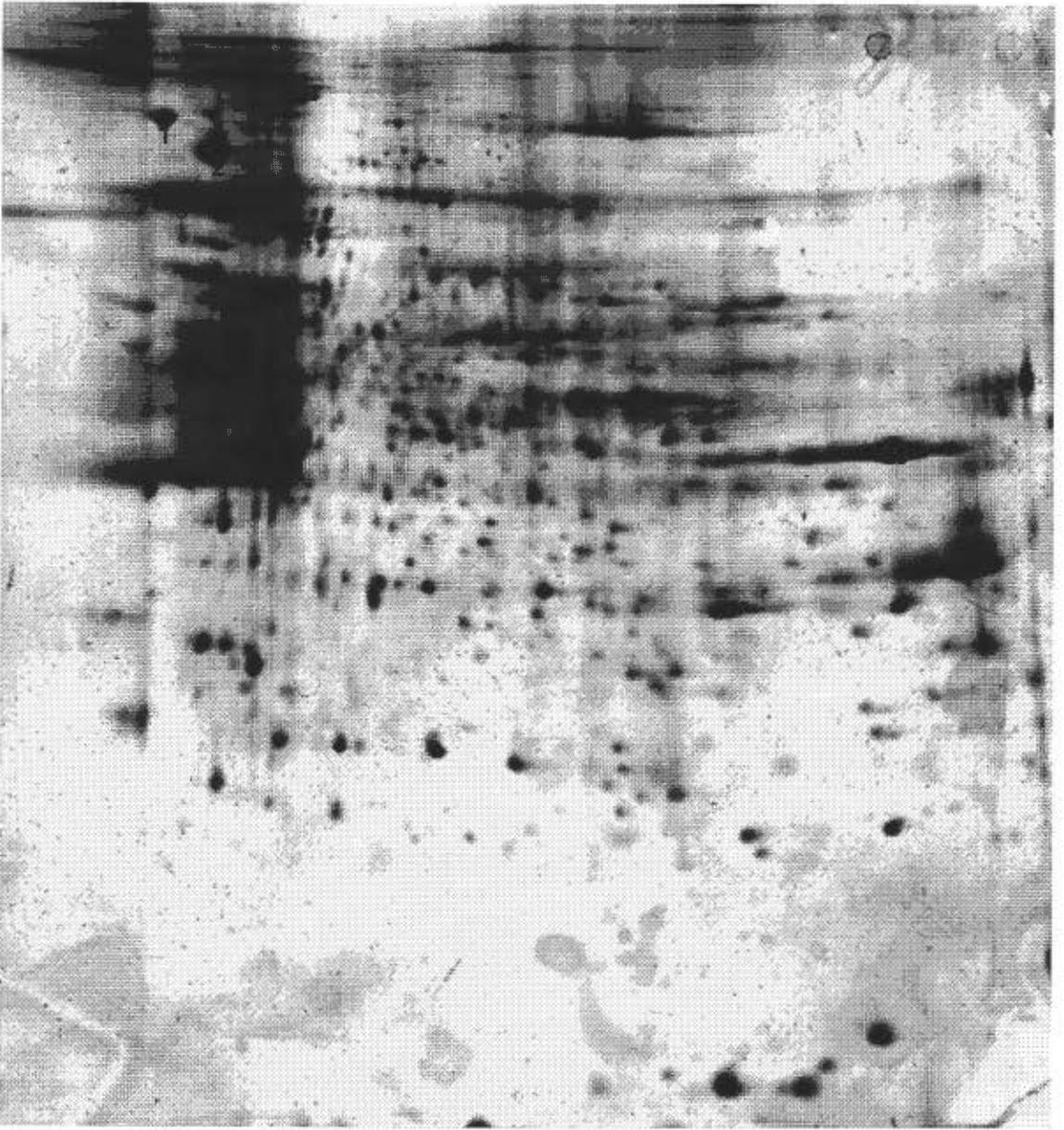
1	MEEDKKEDVGV	TVVGIDLGT	YSCVGVFKNG	RVEIIANDQG	NRITPSYVAF			
51	TPEGERLIGD	AAKNQLTSNP	ENTVFDKRL	IGRTWNDPSV	QQDIKFLPFK			
101	VVEKTKPYI	QVDIGGGQTK	TFAPEEISAM	VLTKMKETAE	AYLGKKVTHA			
151	VVTVPAYFND	AQRQATKDG	TIAGLNVMRI	INEPTAAAI	YGLDKREGEK			
201	NILVFDLGGG	TFDVSLLTID	NGVFEVVATN	GDTHLGGEDF	DQRVMEHFIK			
251	LYKKTGKDV	RKDNRAVQKL	RREVEKAKRA	LSSQHQARIE	IESFYEGEDF			
301	SETLTRAFFE	ELNMDLFRST	MKPVQKVED	SDLKKSIDE	IVLVGGSTRI			
351	PKIQQLVKEF	FNGKEPSRGI	NPDEAVAYGA	AVQAGVLSGD	QDTGDLVLLD			
401	VCPLTLGIET	VGGVMTKLIP	RNTVVPTKKS	QIFSTASDNQ	PTVTIKVYEG			
451	ERPLTKDNHL	LGTFDLTGIP	PAPRGVPIE	VTFEIDVNGI	LRVTAEDKGT			
501	GNKKNITITN	DQNRLTPEEI	ERMVNDAEKF	AEEDKKLKER	IDTRNELESY			
551	AYSLEKQIGD	KEKLGKLS	EDKETMEKAV	EKIEWLESH	QDADIEDFKA			
601	KKKELEEIVQ	PIISKLYGSA	GPPTGEEDT	AELHHHHHH				
Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence		
32 - 42	614.87	1227.72	1227.62	0.10	0	VEIIANDQGNR	(Ions score 62)	
43 - 56	784.51	1567.01	1565.77	1.24	0	ITPSYVAFTEGER	(Ions score 43)	
57 - 63	687.48	686.47	686.40	0.08	0	LIGDAAK	(Ions score 13)	
64 - 78	840.23	1678.44	1676.80	1.64	0	NQLTSNPENTVFDK	(Ions score 63)	
64 - 79	612.26	1833.76	1832.90	0.86	1	NQLTSNPENTVFDK	(Ions score 16)	
106 - 120	803.25	1604.48	1603.86	0.63	0	TKFYIQVDIGGGQTK	(Ions score 58)	
121 - 134	768.78	1535.55	1535.79	-0.24	0	TFAPEEISAMVLTK	(Ions score 59)	
147 - 163	630.57	1888.67	1886.96	1.71	0	VTHAVVTVPAYFNDAQR	(Ions score 17)	
147 - 163	944.79	1887.56	1886.96	0.60	0	VTHAVVTVPAYFNDAQR	(Ions score 44)	
168 - 179	609.59	1217.16	1216.62	0.54	0	DAGTIAGLNVMR	(Ions score 66)	
180 - 195	830.70	1659.39	1658.89	0.51	0	IINEPTAAAIAYGLDK	(Ions score 91)	
180 - 196	908.61	1815.21	1814.99	0.22	1	IINEPTAAAIAYGLDKR	(Ions score 71)	
180 - 196	606.46	1816.36	1814.99	1.37	1	IINEPTAAAIAYGLDKR	(Ions score 26)	
327 - 334	918.95	917.94	917.47	0.47	0	VLESDSLK	(Ions score 35)	
327 - 335	523.92	1045.82	1045.57	0.26	1	VLESDSLK	(Ions score 20)	
335 - 349	795.20	1588.39	1587.85	0.55	1	KSDIDEIVLVGGSTR	(Ions score 65)	
336 - 349	730.99	1459.96	1459.75	0.21	0	SDIDEIVLVGGSTR	(Ions score 40)	
353 - 358	728.41	727.40	727.46	-0.06	0	IQQLVK	(Ions score 34)	
359 - 368	606.24	1210.47	1210.56	-0.09	1	EFNGKEPSR	Glyc-Asn (N) (Ions score 43)	
<b>43) No Confirm!!</b>								
429 - 446	983.71	1965.40	1964.02	1.38	1	KSQIFSTASDNQPTVTIK	(Ions score 52)	
430 - 446	919.09	1836.16	1835.93	0.24	0	SQIFSTASDNQPTVTIK	(Ions score 61)	
447 - 456	596.63	1191.25	1190.63	0.62	0	VYEGERELTK	(Ions score 32)	
457 - 474	967.71	1933.41	1933.01	0.41	0	DNHLGTFDLTGIPAPR	(Ions score 51)	
506 - 514	537.86	1073.71	1073.55	0.17	0	ITITNDQNR	(Ions score 39)	
515 - 522	986.49	985.48	985.51	-0.03	0	LTPEEIER	(Ions score 11)	
515 - 522	494.10	986.18	985.51	0.68	0	LTPEEIER	(Ions score 29)	
541 - 555	901.73	1801.45	1800.89	0.56	1	IDTRNELESYAYSLK	(Ions score 27)	
545 - 555	1316.67	1315.66	1315.63	0.03	0	NELESYAYSLK	(Ions score 7)	
545 - 555	658.90	1315.79	1315.63	0.16	0	NELESYAYSLK	(Ions score 46)	
545 - 561	658.91	1973.69	1971.94	1.75	1	NELESYAYSLKQIGDK	Glyc-Asn (N) (Ions score 22)	
604 - 615	699.47	1396.92	1396.78	0.14	0	ELEEIVQPIISK	(Ions score 43)	

Figura 18. Peptide Mass-fingerprinting mediante il software Mascot.

Degli spot proteici analizzati risultavano particolarmente interessanti 7 per la linea CHANG (fig. 19, 19a) e 8 per la linea HepG2 (fig.20, 20a e Tabella 1)

**Table 1.** Membrane proteins identified in HpG2 cells

No.	protein	Swiss-Prot or NCBI entry	Theoretical Mr/pI	Sequence coverage (%)
1	Bip Protein GRP78	AAF13605	71002/5.23	40
2	ACTG1	AAH18774	42108/5.31	39
3	Thyroid hormone binding protein precursor (PDI)	AAA61169	57468/4.82	16
4	MTHSP75	AAA67526	74019/5.97	12
5	Alpha-tubulin	CAA25855	50810/5.02	14
7	HSP60	AAK60261	27136/4.62	10
8-9	Aldolase A	CAA30979	39706/8.34	6
11	GRP94 (gp96)	AAK74072	90309/4.73	16
12	HSP90	AAF82792	73170/5.07	18

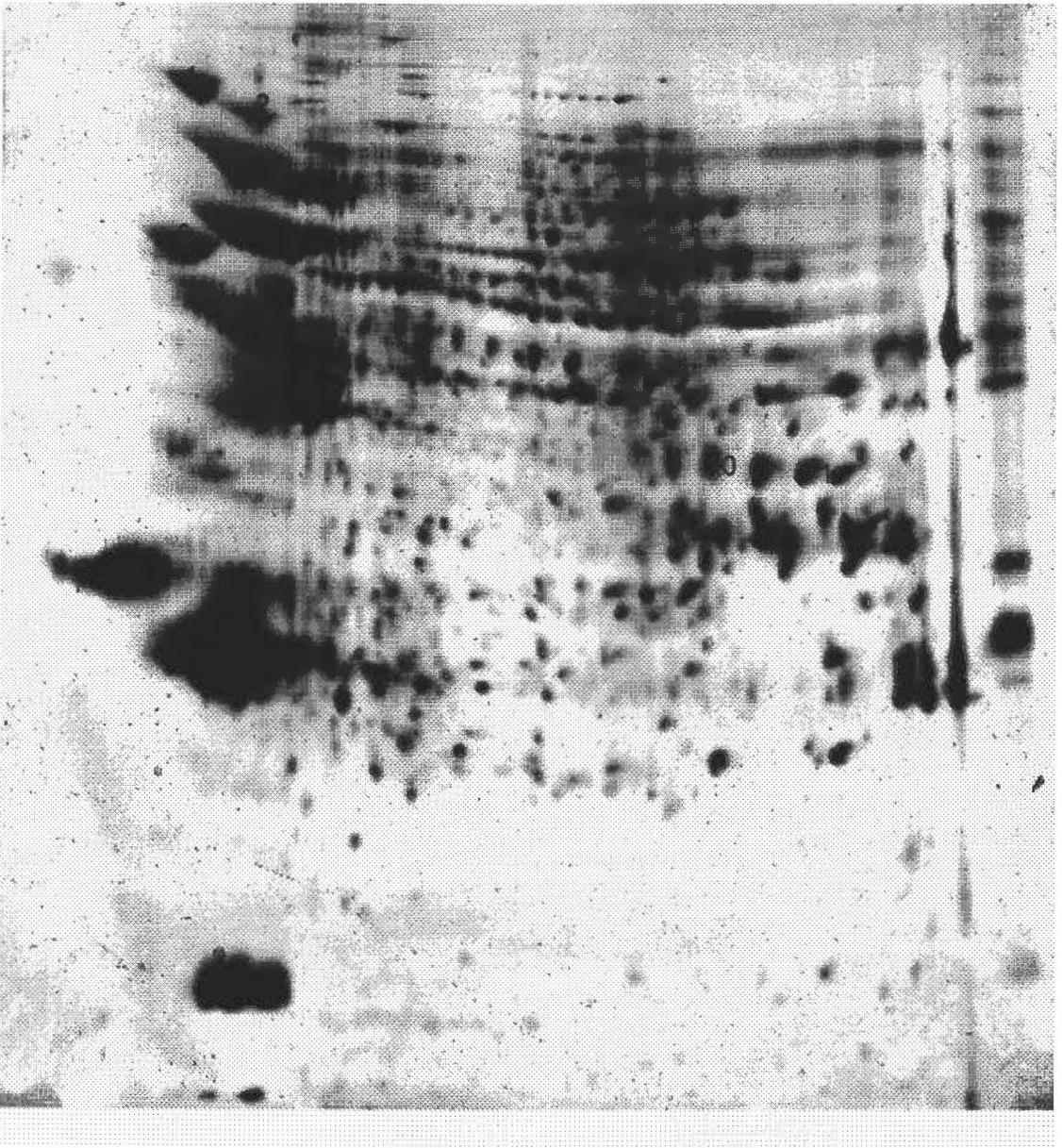


**Figura 19. Mappa 2-DE della linea cellulare CHANG: sono evidenziati gli spot analizzati.**

<b>SPOT</b>	<b>PROTEINA</b>
<b>1</b>	<b>Heat Shock Protein gp96</b>
<b>2</b>	<b>Chaperone Protein HSP90 beta</b>
<b>3</b>	<b>GRP78/Bip</b>
<b>4</b>	<b>MT Heat Shock Protein 75</b>
<b>5</b>	<b>Short Heat Shock Protein HSP60s2</b>
<b>6</b>	<b>Tubulin</b>
<b>7</b>	<b>Mutant beta-Actin</b>



**Figura 19 (a). Particolare della mappa 2-DE.**



**Figura 20. Mappa 2-DE della linea cellulare HepG2: sono evidenziati gli spot analizzati.**

SPOT	PROTEINA
1	Gp96/GRP94
2	HSP90
3	GRP78/Bip
4	MTHSP75
5	HSP60
6	PDI
7	Alpha-tubulin
8	ACTG1



Figura 20 (a). Particolare della mappa 2-DE.

#### 4.4: II- Proteine identificate: HEAT SHOCK PROTEINS

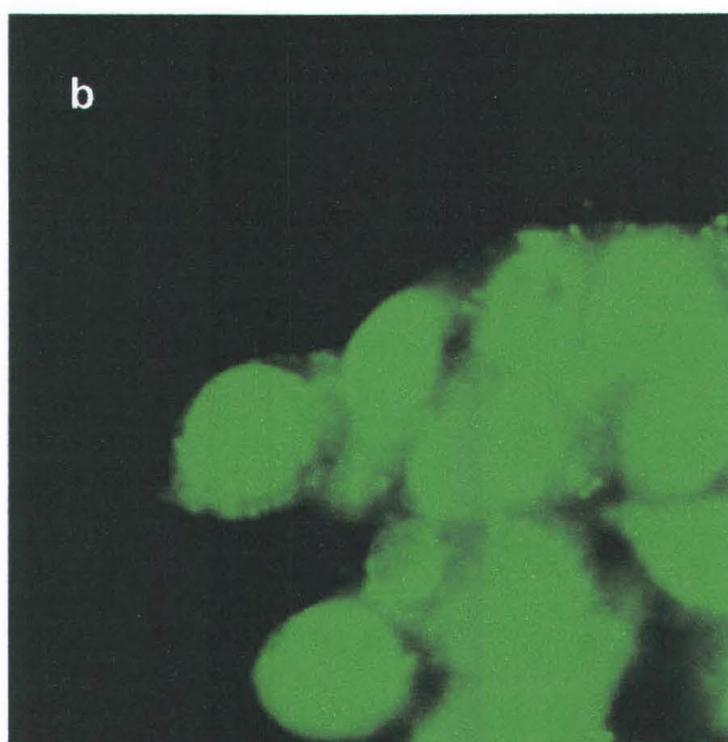
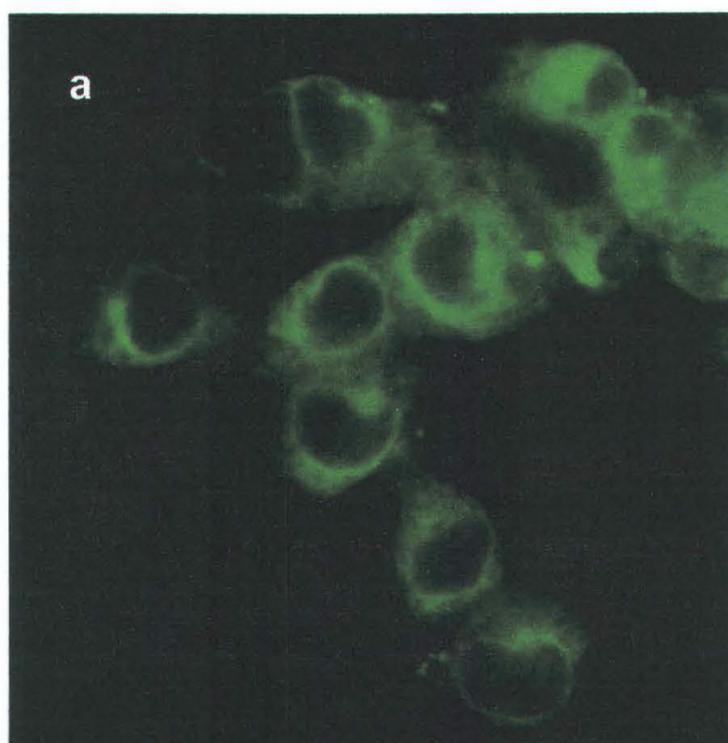
Le analisi di spettrometria di massa hanno fornito risultati interessanti, anche se inaspettati. Di particolare importanza è il ritrovamento di segnali attribuibili a proteine con funzioni di Chaperonine. Come riportato nelle tabelle annesse alle figure **19** e **20**, tra queste sono state identificate costantemente: GRP78/Bip, HSP60, MTHSP75, HSP90, gp96/GRP94 in entrambe le linee cellulari mentre PDI è stata identificata nelle HepG2.

I risultati ottenuti con l'analisi proteomica sono stati supportati e confermati dagli esperimenti di immunocitochimica. Se le risultanze sperimentali dell'analisi proteomica sono vere, allora vi deve essere una corrispondenza con quelli ottenuti con altri approcci sperimentali. L'immunocitochimica ha il vantaggio di fornire un'immagine istantanea di uno specifico stato fisiologico e di uno specifico fenotipo. In termini generali l'immunocitochimica permette di identificare e localizzare uno specifico antigene se è disponibile l'anticorpo appropriato. Nel nostro caso è stato possibile identificare in maniera inequivocabile a livello di membrana cellulare, come previsto dall'analisi proteomica la presenza di GRP94, GRP78 e HSP90. Sono state analizzate in maniera più dettagliata le proteine sopracitate, tra quelle identificate, perché possiedono aspetti interessanti sia dal punto di vista funzionale (HSP90 e GRP78) che glicobiologico (gp96).

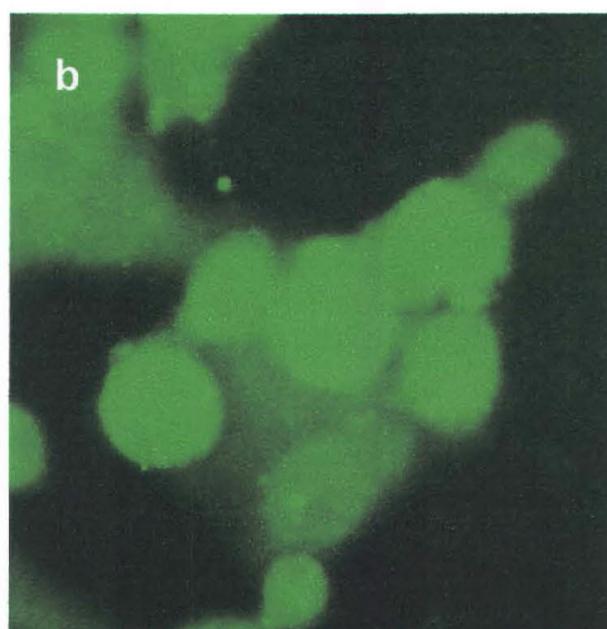
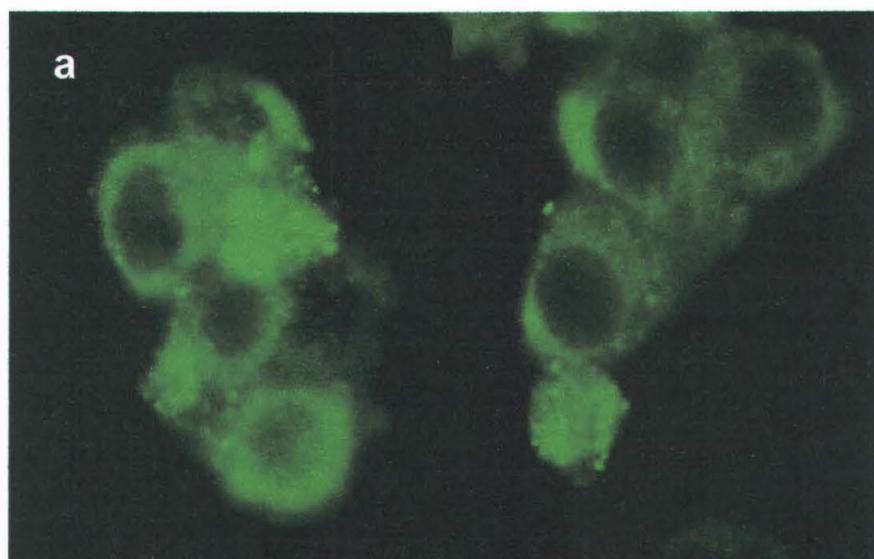
Ad esempio nelle figure **21** e **22** vengono riportati i risultati relativi ai saggi di immunocitochimica eseguiti, in condizioni non permeabilizzanti, con l'anticorpo anti-GRP78. E' ben evidente la localizzazione di membrana degli antigeni che appare ancora più chiara nella figura **23** dove e' stata omessa anche la fase di *fixing* che comporta sempre una forma di aggregazione della componente proteica. Gli stessi saggi sono stati ripetuti, nell'ambito di entrambe le linee cellulari, per GRP94 e HSP90; i risultati sono riportati nelle figure **24**, **25**, **26** e **27**. È interessante notare come per HSP90 i segnali di fluorescenza tendono a concentrarsi in alcune zone della superficie, conferendo alla cellula

una sorta di polarità, dovuta probabilmente ad una clusterizzazione della proteina sulla membrana. Questa osservazione potrebbe trovare corrispondenza con le ipotesi di coinvolgimento di HSP90 in fenomeni di migrazione e rimodellamento della matrice extracellulare come verrà discusso nel capitolo successivo.

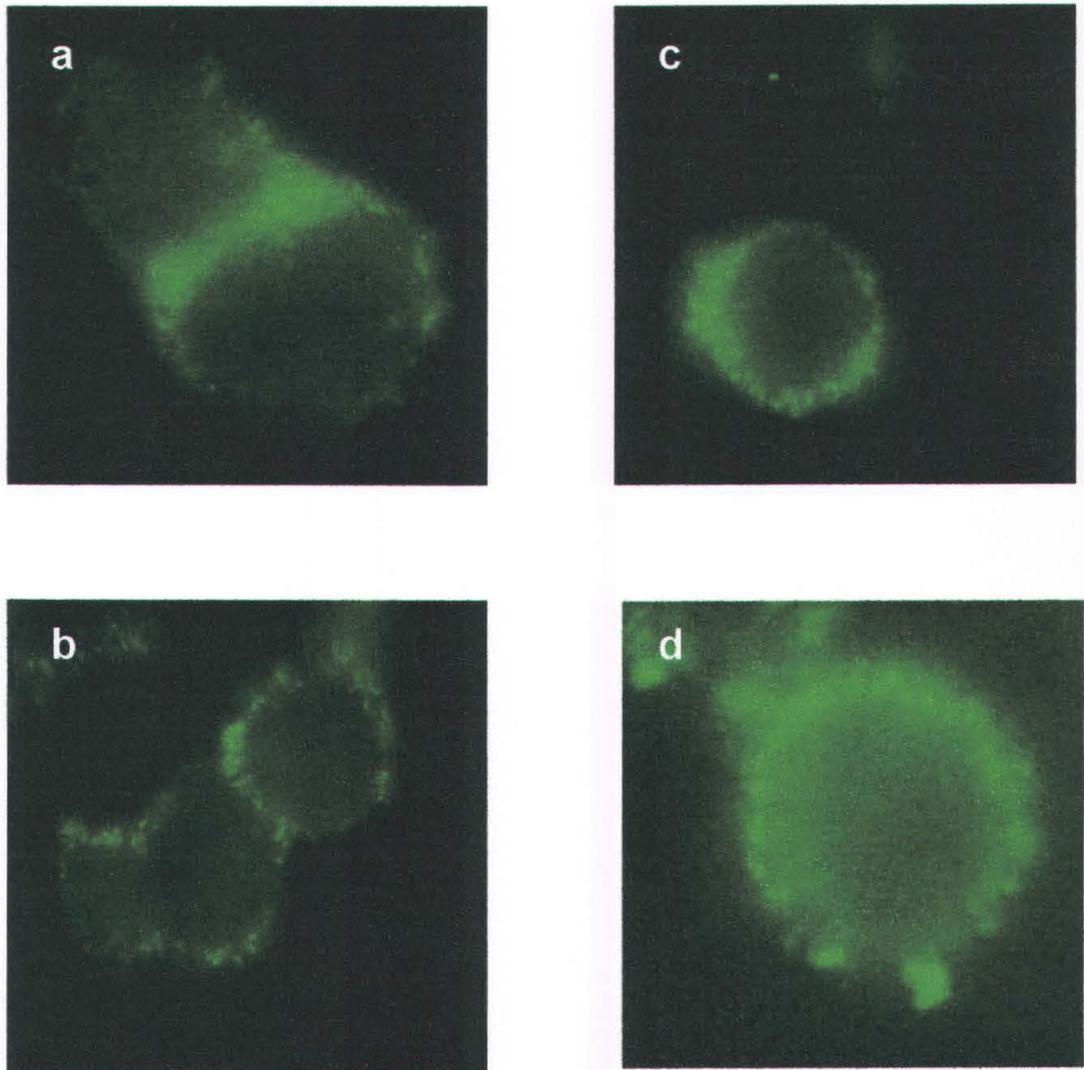
I risultati riportati sono piuttosto inattesi soprattutto per quanto riguarda la linea cellulare CHANG che era stata scelta ed utilizzata, anche in accordo con le risultanze di letteratura, come modello di epatocita "normale". Infatti dai dati di letteratura, dalle ipotesi fatte dalla comunità scientifica e dalle osservazioni derivate da questo lavoro, emerge la tendenza ad associare i fenomeni di "delocalizzazione" di chaperonine a cellule trasformate in senso neoplastico, mentre, fatta eccezione per alcuni casi, ciò non avviene nelle controparti normali. Da un punto di vista del profilo del proteoma di membrana le CHANG non possono essere considerate come una linea cellulare normale e di conseguenza non può essere utilizzata come un effettivo modello di epatocita normale. Si poneva, quindi, da parte nostra, il problema di convalidare sia i risultati ottenuti che l'efficacia del metodo sviluppato. Per affrontare questo punto abbiamo pensato di utilizzare un modello cellulare di condrocita di cui era disponibile la linea primaria. La scelta di questo modello cellulare ha un puro significato di esemplificazione e i risultati ottenuti, seppure interessanti, non possono essere correlati con il modello cellulare oggetto di questo lavoro di Tesi. Dai dati relativi ai saggi di immunocitochimica, riportati in fig. 28, si osserva che non vi è riconoscimento anticorpale sulla superficie cellulare dal momento che la fluorescenza visualizzata è paragonabile alla fluorescenza di base dei condrociti. Gli stessi esperimenti, riproposti per la linea di derivazione condrocitaria trasformata MC615, in cui i segnali di fluorescenza indicano un riconoscimento degli anticorpi a livello della membrana, avvalorano le ipotesi fatte in questo lavoro (fig.29). I risultati ottenuti rappresentano una significativa conferma sia della nostra ipotesi che della correttezza della procedura sperimentale. Rimane ancora da stabilire se queste osservazioni sono valide anche per gli epatociti.



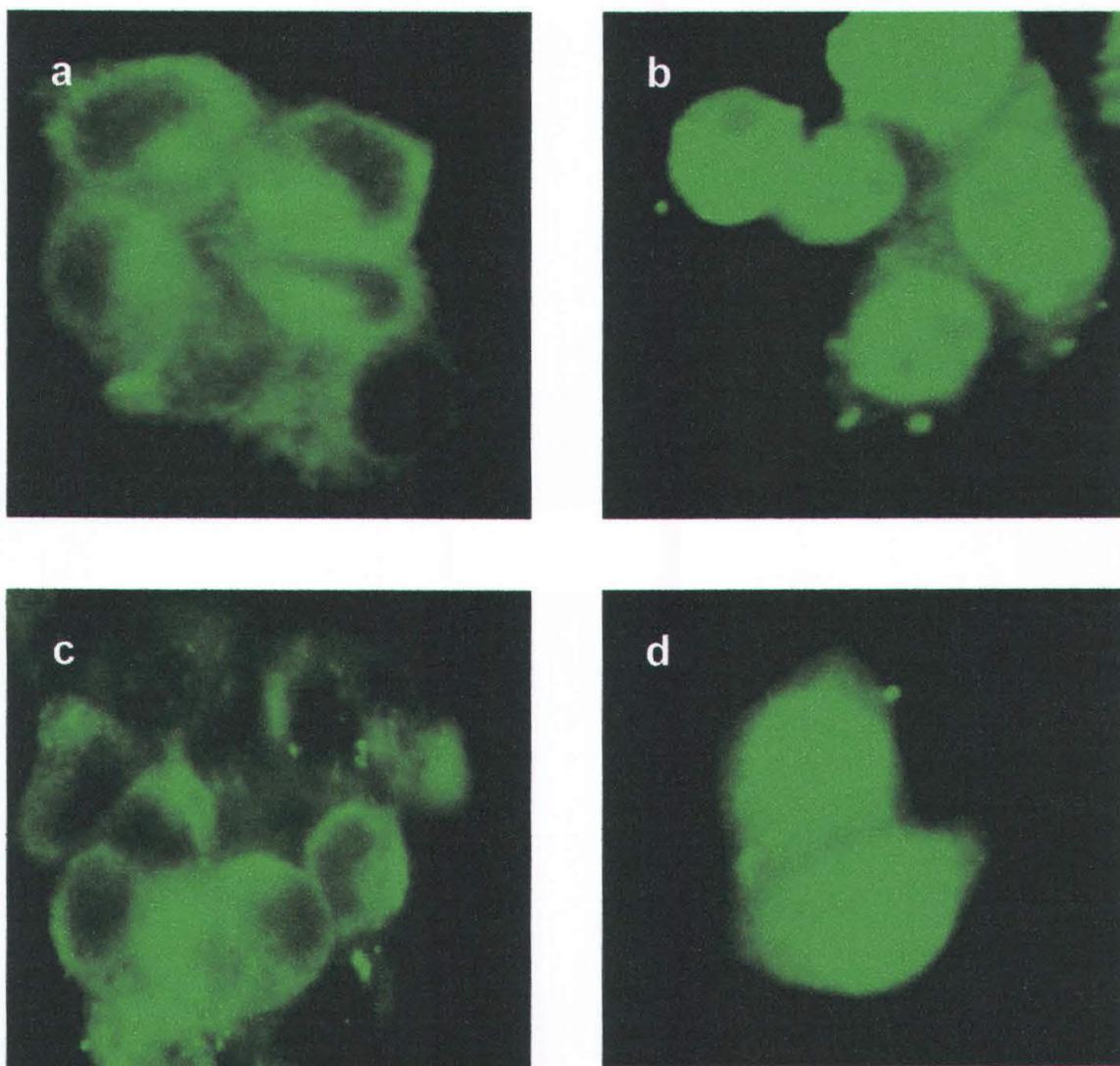
**FIG .21 Immunofluorescenza. La linea cellulare HepG2 è stata trattata con anticorpo anti-GRP78/Bip. (a) Cellule non permeabilizzate, (b) cellule permeabilizzate.**



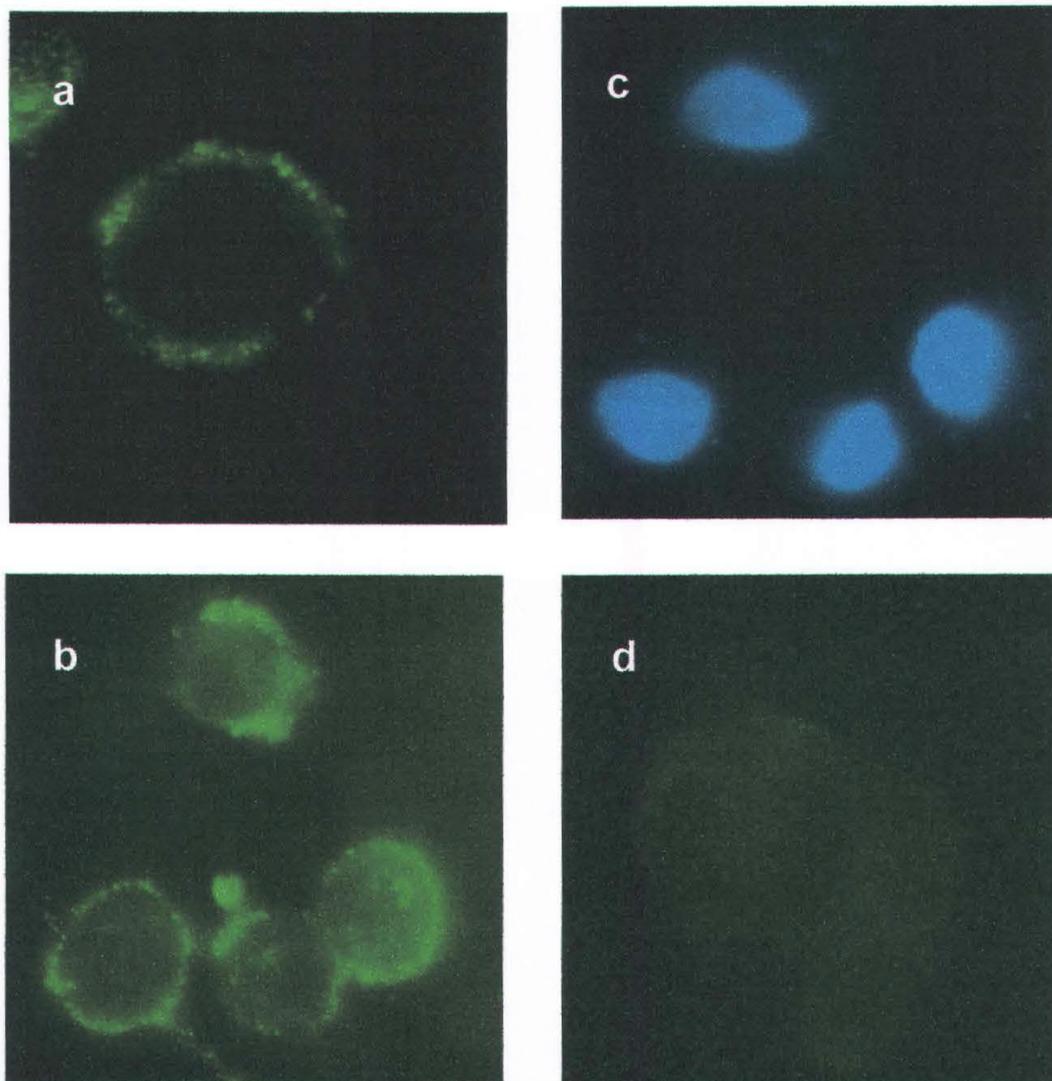
**FIG.22. Immunofluorescenza. La linea cellulare CHANG è stata trattata con anticorpo anti-GRP78/Bip. (a) Cellule non permeabilizzate, (b) cellule permeabilizzate.**



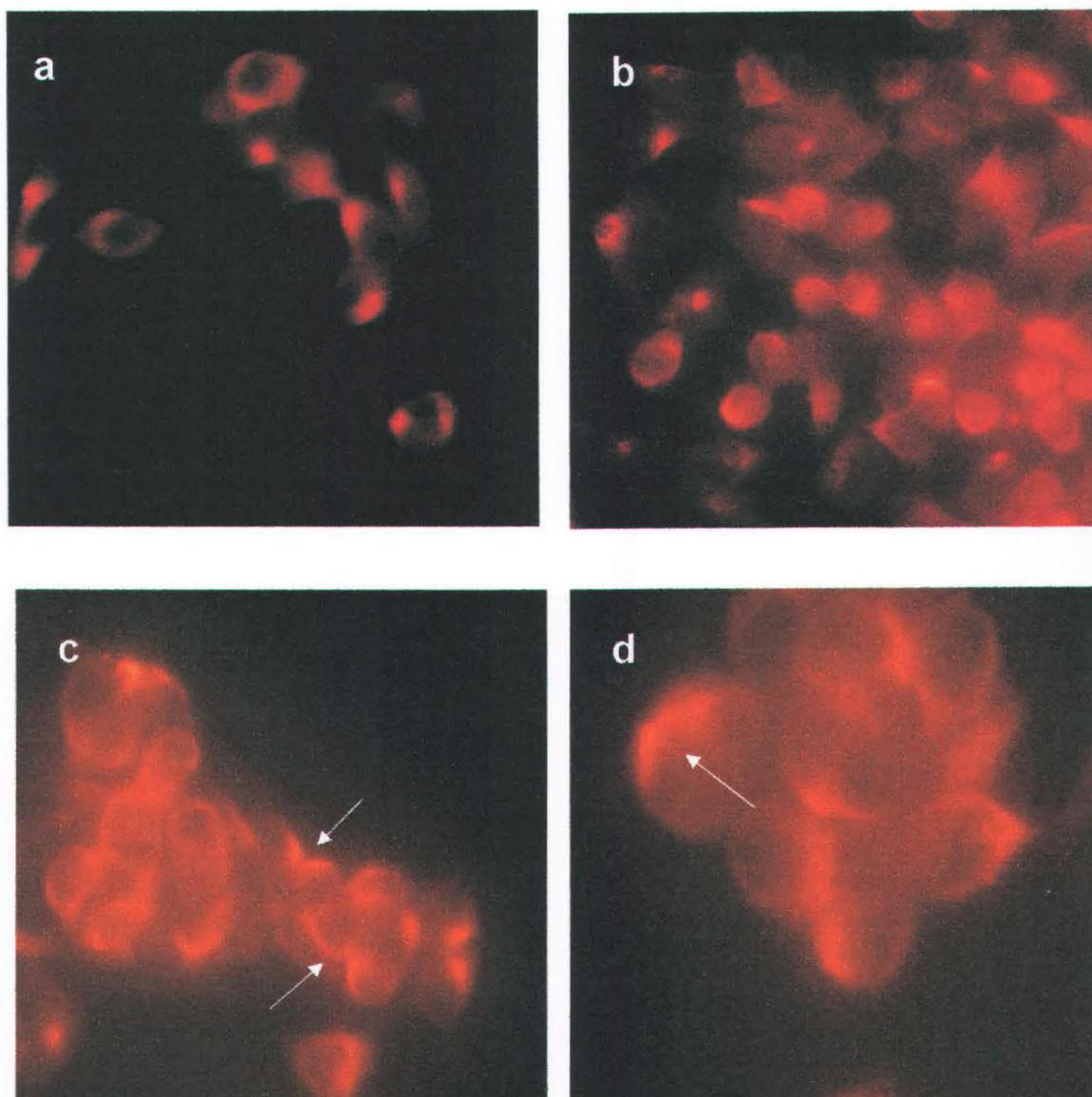
**FIG.23. Immunofluorescenza. Le linee cellulari HepG2 (a) e (b) e CHANG Liver (c) e (d) sono state trattate con anticorpo anti-Grp78/Bip. Cellule non fissate e non permeabilizzate.**



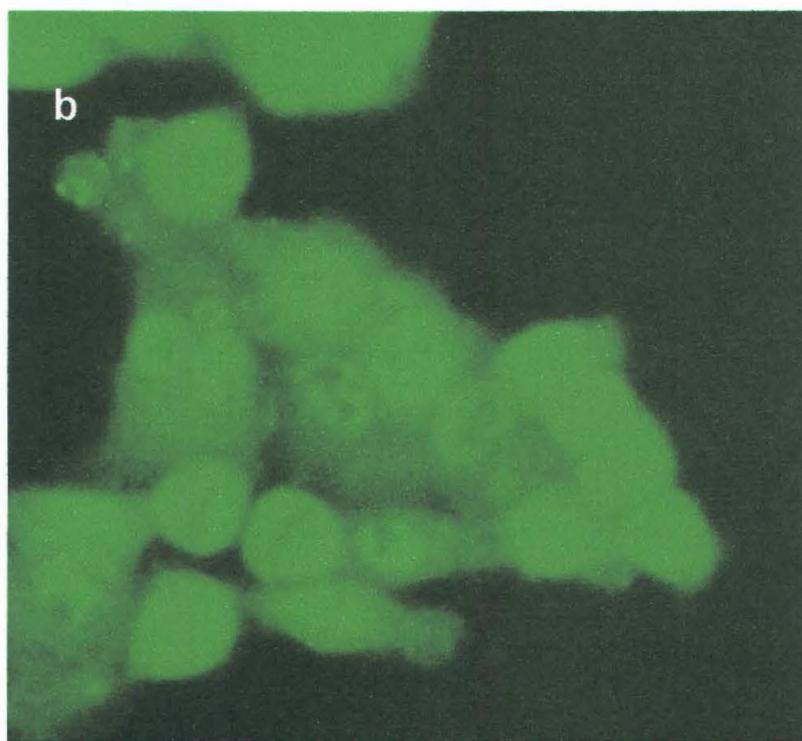
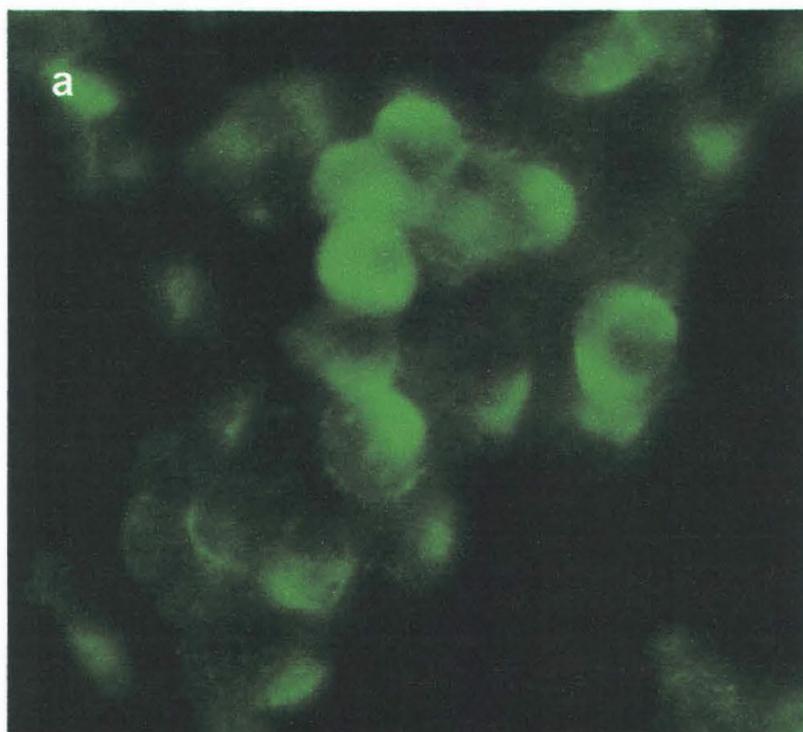
**Fig.24 Immunofluorescenza.** La linea cellulare HepG2 (a) e (b) e la linea cellulare CHANG (c) e (d) sono state trattate con anticorpo anti-Grp94/gp96. In (a) e (c) cellule non permeabilizzate. In (b) e (d) cellule permeabilizzate.



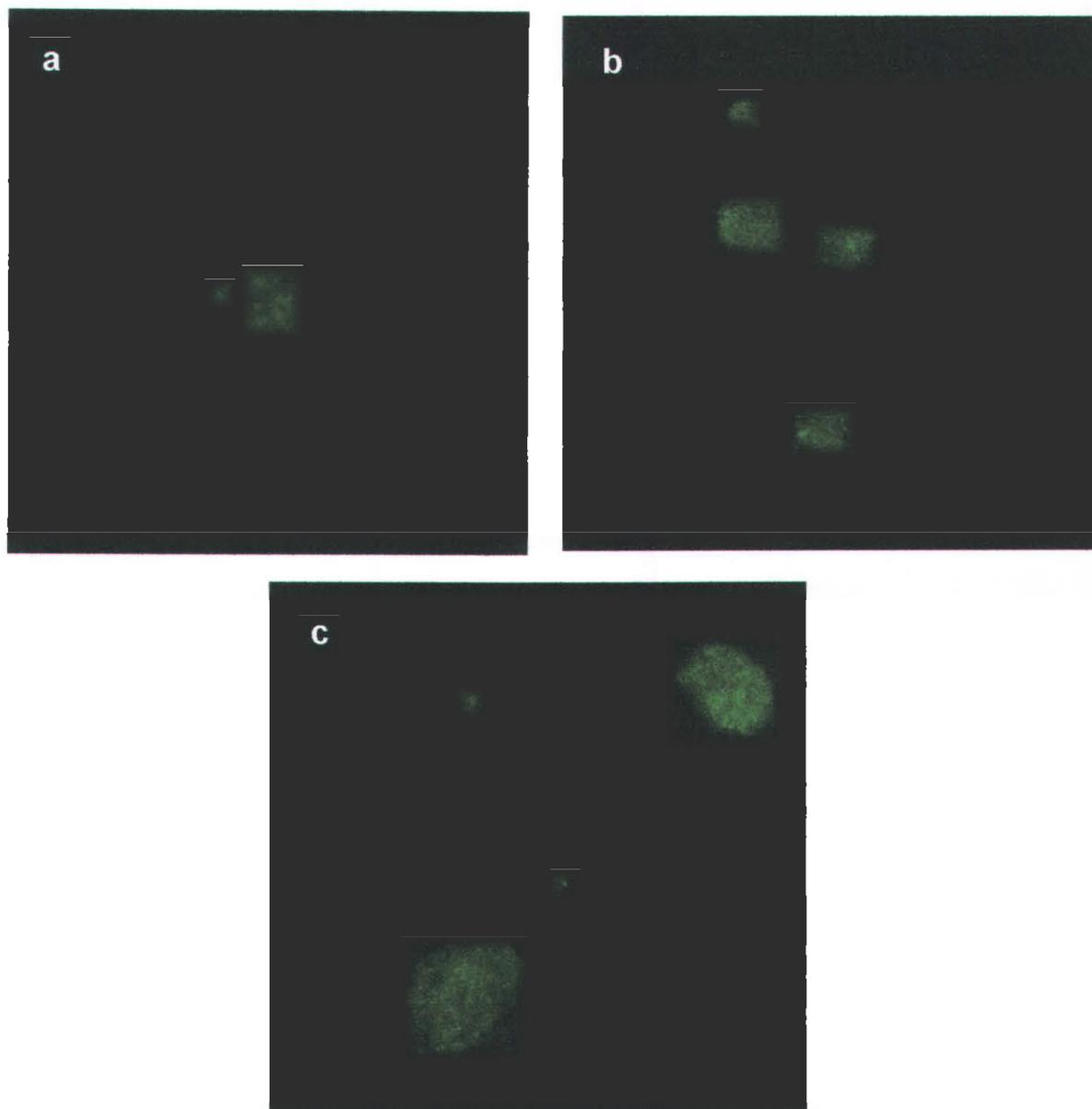
**FIG.25. Immunofluorescenza. Le linee cellulari CHANG (a) ed HepG2 (b), non fissate e non permeabilizzate, sono state trattate con anticorpo anti-gp96/GRP94. In (c) Nuclei delle cellule evidenziati con DAPI. In (d) controllo di cellule trattate con il solo anticorpo secondario.**



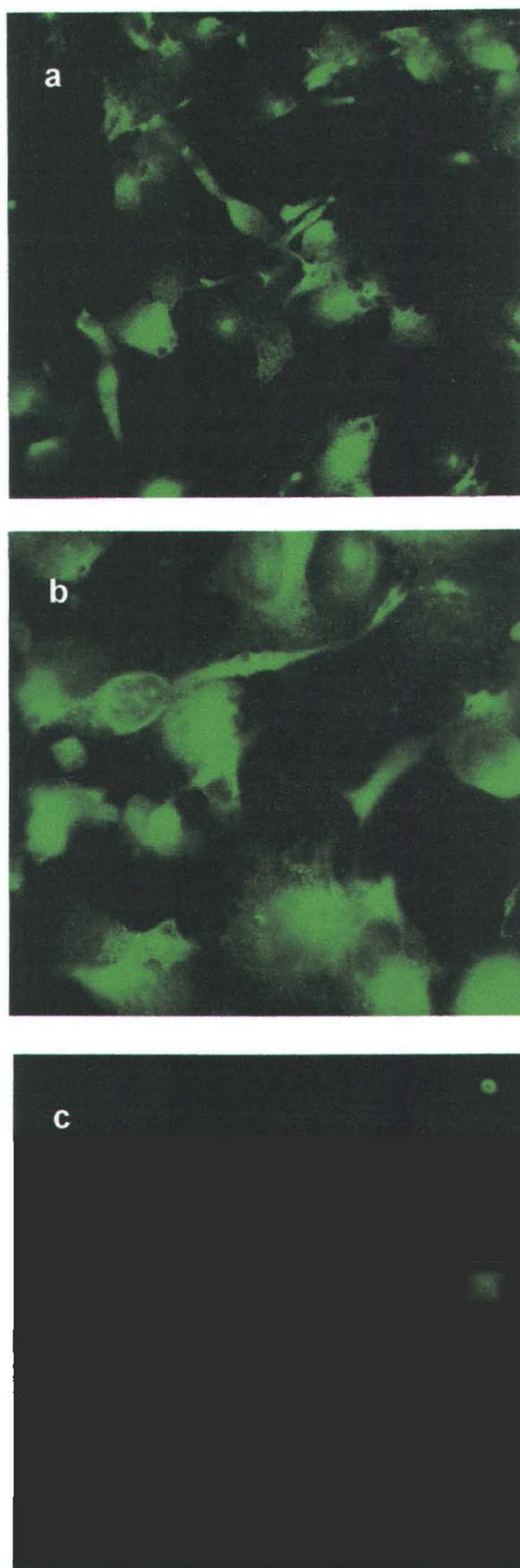
**Fig.26. Immunofluorescenza. Le cellule HepG2, non permeabilizzate, sono state trattate con anticorpo anti Hsp90. Le frecce indicano zone di apparente clusterizzazione della proteina.**



**Fig 27 Immunofluorescenza. La linea cellulare CHANG liver è stata trattata con anticorpo anti-Hsp90. (a) Cellule non permeabilizzate, (b) cellule permeabilizzate.**



**Fig 28. Immunofluorescenza. La linea primaria di condrociti di maiale è stata trattata con anticorpo anti-GRP94 (a) e anti-GRP78 (b). (c) Fluorescenza di base di condrociti non trattati.**



**Fig 29. Immunofluorescenza. La linea MC615 è stata trattata con anticorpo anti-GRP94 (a) e anti-GRP78 (b). (c) controllo MC615 non trattate.**

#### 4.4: III - ANALISI DEI GLICANI

Le difficoltà incontrate nella messa a punto di una strategia ottimale per l'analisi dei glicani riguardano principalmente la necessità di seguire dei protocolli di deglicosilazione che consentano di preservare la componente proteica e di garantire l'integrità delle catene oligosaccaridiche presenti.

In letteratura sono disponibili diverse informazioni in tal senso, ma nella maggior parte dei casi si tratta di approcci che, nel tentativo di preservare la porzione glicosidica, danneggiano quella proteica o viceversa. In nessuno di questi procedimenti viene esaminato il problema dal punto di vista dell'analisi della struttura glicoproteica integrale. Inoltre, i protocolli più consolidati non esaminano il problema dal punto di vista della proteomica e quindi dell'analisi 2-DE in quanto generalmente prevedono la deglicosilazione di proteine in soluzione.

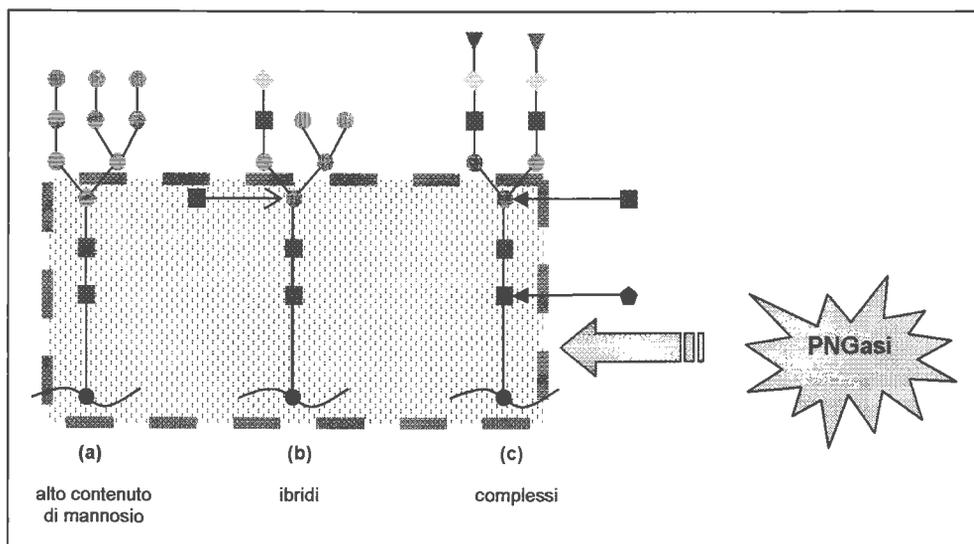
Si è reso quindi necessario individuare le condizioni sperimentali, tra quelle descritte in letteratura, che consentano l'ottimizzazione delle analisi di spettrometria di massa, sia per quanto riguarda i glicani che la proteina.

Esistono approcci di tipo chimico ( $\beta$ -eliminazione<sup>[83][84]</sup>, idrazinolisi<sup>[85][86]</sup>, ecc.) e di tipo enzimatico<sup>[87]</sup>: i primi risultano poco adatti ai nostri scopi perché efficienti solamente con glicoproteine o glicopeptidi in soluzione e, inoltre, sono piuttosto aggressivi.

Sono stati perciò presi in considerazione metodi di deglicosilazione per via enzimatica. E' bene ricordare che la glicosilazione delle proteine può avvenire in due modi, attraverso legame *N*- od *O*-glicosidico. La *N*-glicosilazione è quella che conferisce alla proteina il maggior grado di variabilità ed è quindi la più informativa: quindi, nel caso in cui siano presenti modificazioni nel profilo di glicosilazione tra due tipi cellulari o, all'interno di uno stesso sistema, tra diverse condizioni, ci si aspetta che queste si concentrino a livello degli *N*-glicani.

L'enzima di elezione per la *N*-deglicosilazione è la Peptide:*N*-GlicosidasiF, nota come PNGasi F. Si tratta di un'amidasi che agisce

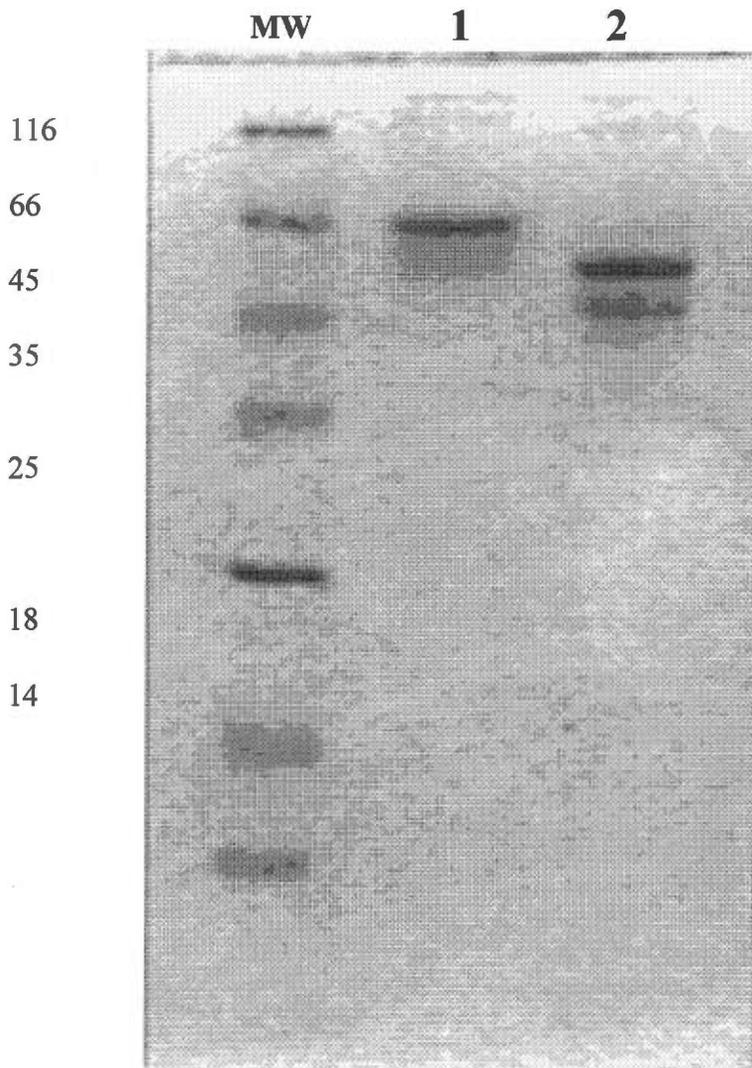
preferenzialmente a livello del primo residuo di GlcNAc legato all'asparagina tagliando completamente la catena oligosaccaridica<sup>[57]</sup>.



**Figura 30. Rappresentazione schematica dell'azione della PNGase F.**

In via preliminare è stata valutata l'efficienza di deglicosilazione dell'enzima PNGase F su uno standard glicoproteico. La scelta è ricaduta sulla Fetuina, una glicoproteina di cui è ben nota e caratterizzata la componente oligosaccaridica<sup>[87]</sup>. Dopo deglicosilazione, eseguita in soluzione acquosa, lo standard è stato separato mediante SDS-PAGE (fig. 31).

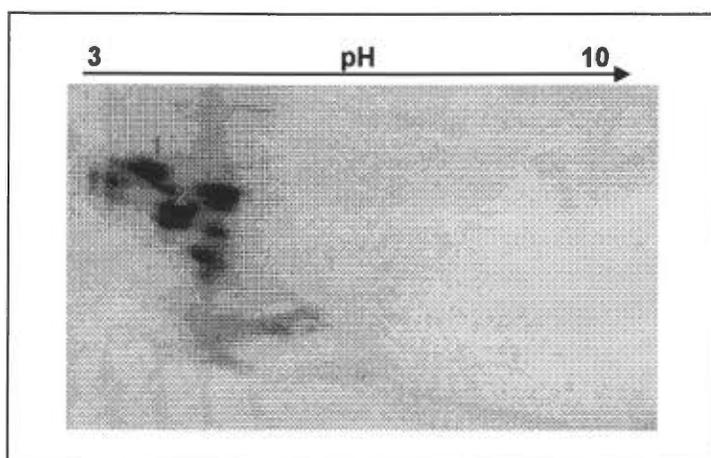
I risultati rivelano un significativo cambiamento del peso molecolare attribuibile ad una efficienza di deglicosilazione prossima al 100%.



**Fig.31. SDS PAGE dello standard Fetuina (lane 1),Fetuina deglicosilata (lane 2)**

Lo stesso standard glicoproteico è stato utilizzato per la messa a punto del protocollo di deglicosilazione in gel.

E' stata condotta una 2-DE con un campione di Fetuina; il gel, colorato con il silver staining, mostra tre spot (fig. 32). Tutti e tre sono stati excisi e sottoposti a deglicosilazione con PNGasi F.



**Figura 32. 2-DE della Fetuina.**

I glicani rilasciati dopo idrolisi enzimatica sono stati analizzati mediante HPLC/MS-ESI: gli spettri di massa ottenuti (fig. 33, 34, 35) hanno confermato la buona riuscita della prova di deglicosilazione in gel, in quanto nei campioni analizzati si sono trovati i valori  $m/z$  corrispondenti alle strutture N-glicosidiche riportate in letteratura per la Fetuina<sup>[88]</sup>.

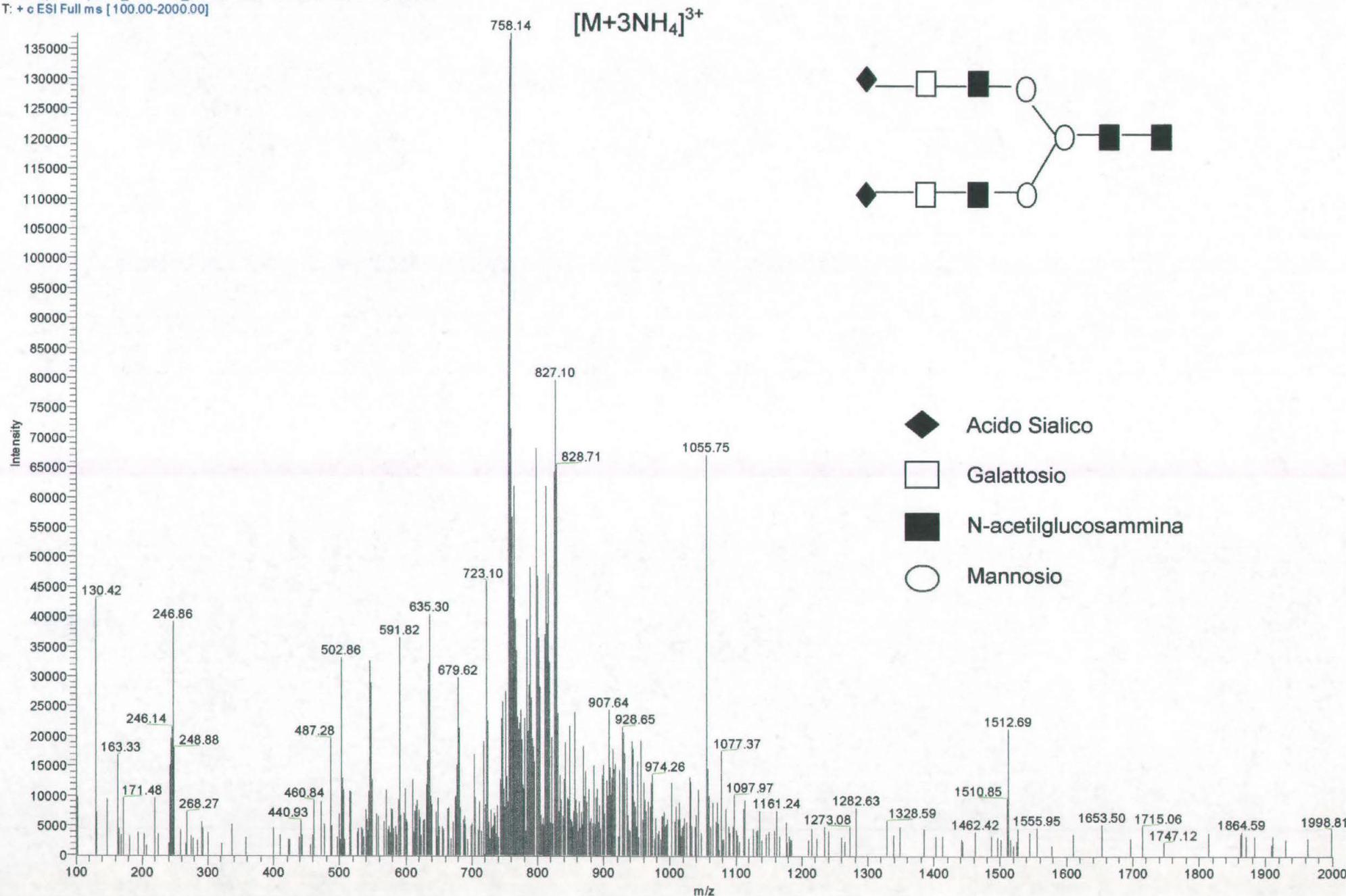


Fig. 33 Spettro ESI glicani derivati da deglicosilazione della Fetuina con PNGase F

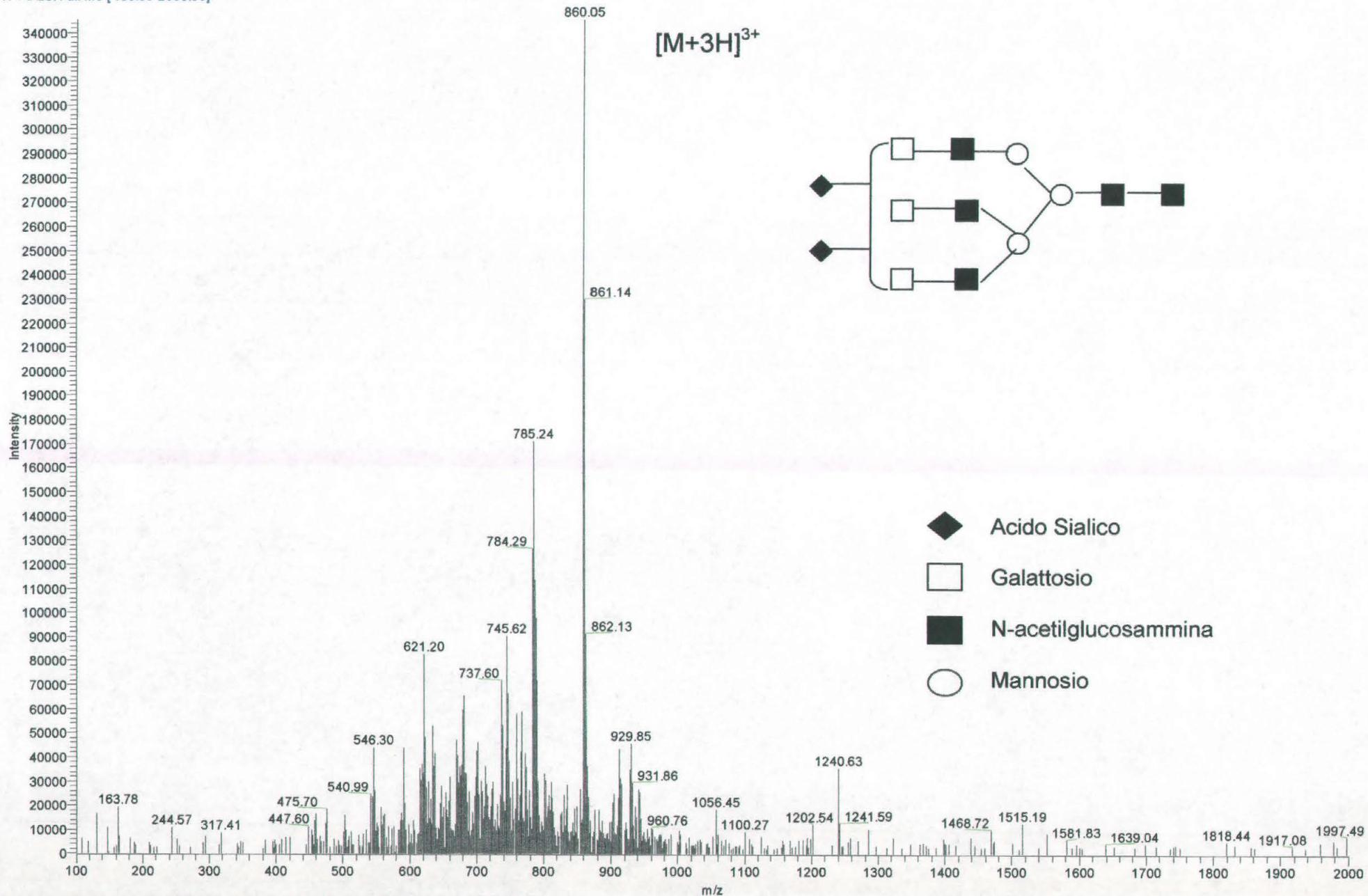


Fig. 33 Spettro ESI oligosaccarici derivati da deglicosilazione della Fetuina con PNGasIF

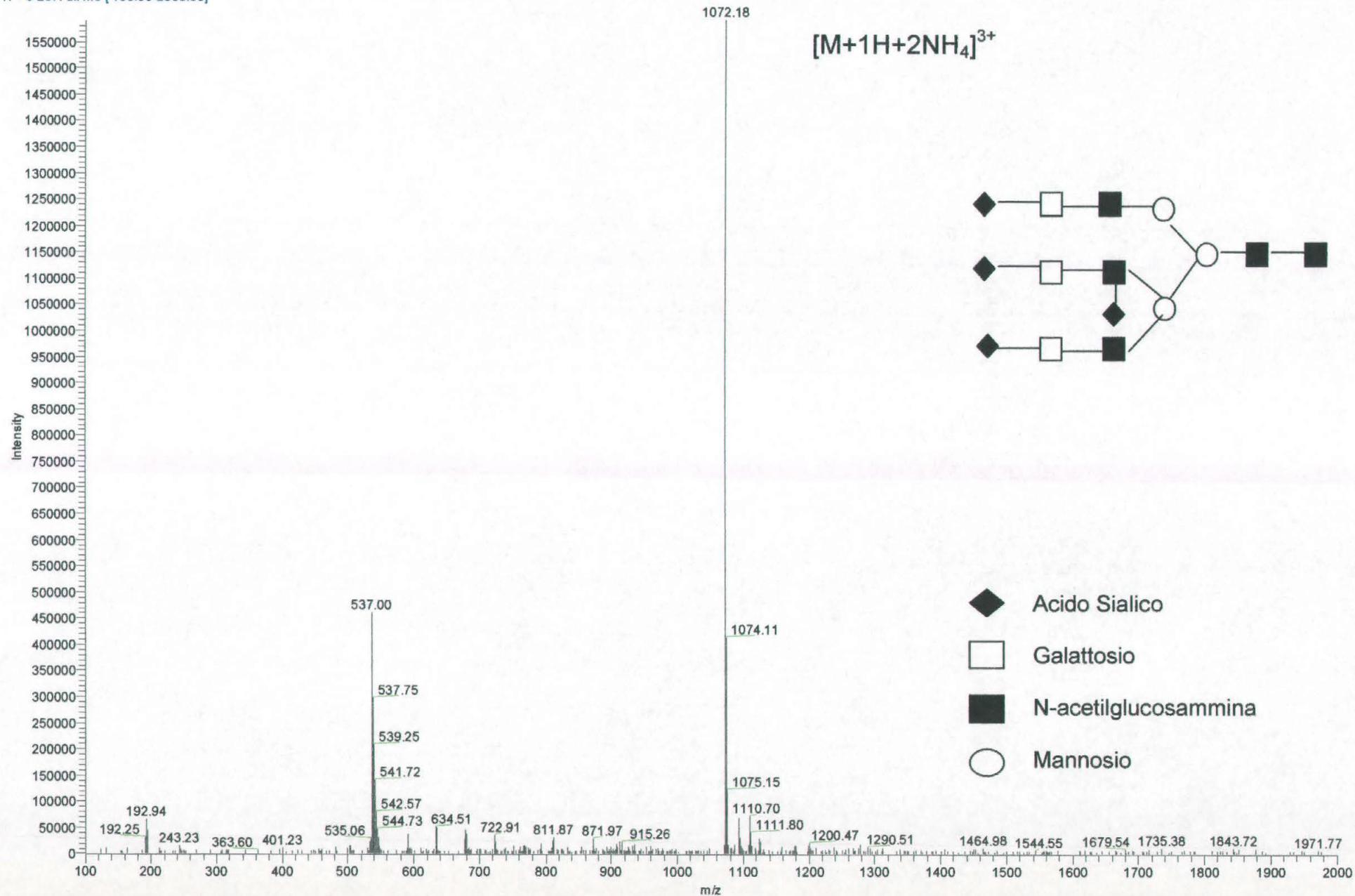


Fig.33. Spettro ESI glicani derivati da deglicosilazione della Fetuina con PNGasiF

## 5. DISCUSSIONE

In questo lavoro si è cercato di fornire gli strumenti per l'analisi del proteoma della membrana plasmatica con l'intento di porre attenzione nei confronti delle glicoproteine e delle eventuali modificazioni della loro componente oligosaccaridica, nell'ambito dell'HCC, con lo scopo di individuare nuovi marker glicoproteici da utilizzare in diagnostica e terapia.

La limitata disponibilità di dati sperimentali di riferimento per quanto riguarda un approccio di proteomica della membrana plasmatica, ha reso ardua l'interpretazione di molti dei risultati ottenuti riportati in questo lavoro di Tesi.

In via preliminare si è reso necessario mettere a punto la maggior parte dei protocolli sperimentali atti ad ottenere il maggior grado di informazioni possibile in merito all'espressione differenziale delle glicoproteine di membrana. Questa fase propedeutica ma indispensabile ha impegnato gran parte del tempo richiesto per lo sviluppo di questo progetto di ricerca.

In primo luogo è stato necessario mettere a punto un metodo di estrazione, confrontando e modificando alcune delle metodologie già esistenti, al fine di sviluppare una strategia che permettesse di ottenere i risultati migliori in termini di purezza e arricchimento del campione proteico. Più precisamente, tra quelle disponibili, due sono state messe a confronto e sviluppate a seconda delle nostre esigenze.

Analizzando i campioni di glicoproteine estratte secondo la strategia differenziale proposta da Molloy<sup>[28]</sup> dopo separazione elettroforetica, si è osservato, in effetti, un arricchimento di proteine di membrana, ma la contaminazione da parte della componente citoplasmatica o proveniente dalle membrane degli organelli è risultata essere ancora troppo alta.

Al metodo appena indicato si è preferito quello che prevede la marcatura della superficie cellulare con un derivato della biotina e la successiva purificazione su colonna funzionalizzata con avidina<sup>[75]</sup>. Si è dimostrato, infatti, che attraverso questo metodo estrattivo si possono ottenere proteine che presentano un peso molecolare elevato e che per la maggior parte appartengono alla classe delle glicoproteine, essendoci una buona corrispondenza tra il profilo proteico rivelato in colorazione argentica e quello rivelato con un metodo di colorazione specifico per le glicoproteine (ProQ Emerald 300). Inoltre, tramite analisi di immunocitochimica, in fase pre-estrattiva, e di western blot si è verificato che tutte le proteine estratte sono biotinilate; infine, dai gel bidimensionali ottenuti sono evidenziabili le caratteristiche tipiche delle glicoproteine, che si presentano come trenini di spot costituiti dalle diverse glicoforme esistenti, differenti tra loro sia per *pI* che per massa relativa. L'osservazione di questi risultati ci ha fatto ragionevolmente supporre che il metodo di estrazione e purificazione prescelto portasse, effettivamente, ad un arricchimento in proteine di membrana.

Successivamente l'analisi comparativa eseguita sulle mappe proteiche relative alla linea cellulare CHANG ed HepG2 ha messo in luce numerose differenze, di tipo proteico, esistenti a livello della membrana cellulare, ma ha evidenziato anche alcune somiglianze degne di nota. Si è scelto di cominciare l'identificazione delle proteine da quelle che risultavano comuni ad entrambe le linee cellulari e che, ad una prima osservazione dei gel, si presentavano come treni di spot associabili a diverse glicoforme di una glicoproteina.

Le analisi di spettrometria di massa hanno fornito risultati interessanti, anche se inaspettati. Di particolare importanza è il ritrovamento di segnali attribuibili a proteine con funzioni di Chaperonine. Come riportato nelle tabelle annesse alle figure **18** e **19**, tra queste sono state identificate costantemente: GRP78/Bip, HSP60, MTHSP75, HSP90, gp96/GRP94 in entrambe le linee cellulari e PDI nelle HepG2.

Le chaperonine sono alcune delle proteine più abbondanti presenti nella cellula. Esse sovrintendono funzioni cruciali per il mantenimento dell'omeostasi

cellulare e per questo motivo sono rimaste altamente conservate durante l'evoluzione. Alcune delle loro funzioni prevedono il corretto ripiegamento di proteine neosintetizzate, la stabilizzazione di catene polipeptidiche durante il trasporto al compartimento di destinazione e di proteine parzialmente denaturate in seguito ad uno stress cellulare<sup>[89]</sup>. Nei momenti in cui la sintesi proteica è elevata, come ad esempio in caso di infezione virale, o durante stress cellulare queste "chaperonine" legano siti idrofobici esposti su catene polipeptidiche nascenti proteggendo le proteine neosintetizzate da un errato ripiegamento, prevenendo interazioni casuali con altre molecole e mediando cambiamenti conformazionali e formazione di complessi multimerici<sup>[90][91]</sup>. Per alcune di esse, inoltre, è stato ampiamente dimostrato un ruolo immunologico. Non tutte le proteine con funzione di chaperone, comunque, sono in grado di mediare una risposta immunitaria, tra quelle che sono state identificate come antigeni anti-tumorali ricordiamo le citoplasmatiche HSP70, HSP90 e l'HSP110, e la GRP94, nota anche come gp96, e la calreticulina appartenenti al reticolo endoplasmico<sup>[92]</sup>.

L'attività immunogenica di queste proteine dipende sostanzialmente da tre caratteristiche peculiari: esse, infatti, sono in grado di legare una gamma piuttosto ampia di (poli)peptidi immunogenici, vengono efficientemente internalizzate in cellule professionali presentatrici dell'antigene (APC) e, una volta internalizzate, sono in grado di migrare all'interno dei compartimenti cellulari e rilasciare l'antigene. Nelle cellule APC i peptidi trasportati dalle chaperonine possono venir assemblati in MHC di classe I per la presentazione sulla superficie cellulare contribuendo al processo di rigetto del tumore.

Le HSP possono essere classificate in tre grandi sottofamiglie a seconda del loro peso molecolare: le HSP di 90 kDa, di 70kDa e quelle di peso molecolare che va da 50 a 60 kDa. Un ulteriore suddivisione si basa sulla loro localizzazione nei compartimenti subcellulari come riassunto nella **tabella 2**<sup>[92]</sup>.

Family member	Location within cell	Major function	Peptide binding for immune recognition	Novel function unique properties
HSP110	Cytosolic	Chaperone	Yes	Binds full length proteins
GRP94/gp96*	ER lumen	Substrate folding and stabilization	Yes-strongly	Well characterized associated peptides
HSP90*	Cytosolic	Stabilizing non-native proteins	Yes-weakly	Large number of substrates
GRP78/Bip*	ER lumen	Molecular ratchet	Yes	Implicated in neurodegeneration
HSC70	Cytosolic, nuclear	Protein folding	Poor	Weakly stress inducible
HSP70*	Cytosolic, nuclear, mitochondrial (mtHSP70)	Molecular ratchet protein folding	Yes	Immunogenic for adaptative and innate response
HSP60*	ER lumen	Protein folding	No	Adjuvant properties
PDI-55kDa	ER	Disulfide bond formation and chaperone	No	Enzyme and chaperone

**Tab. 2 Le Heat shock proteins contrassegnate sono state identificate sulla membrana plasmatica.**

I loro compartimenti di pertinenza sono principalmente il lume del reticolo endoplasmico (RE), il citoplasma e le membrane mitocondriali, ma la presenza di questi chaperone molecolari è stata osservata in alcuni casi, come dimostrato in questo lavoro, anche sulla superficie cellulare<sup>[91]</sup>. Gli studi effettuati fino ad oggi limitano la presenza di queste proteine sulla membrana plasmatica ad alcuni tipi cellulari, come ad esempio timociti immaturi, linfociti e lymphoid-like cells, neuroni nel sistema nervoso in via di sviluppo, cellule pancreatiche esocrine di ratto e linee cellulari tumorali umane<sup>[93]</sup>.

L'espressione di HSP sulla superficie cellulare risulta ancora più anomala se si considera il fatto che esse non possiedono sistemi di ancoraggio alla membrana. Con queste premesse i primi studi, risalenti ad una decina di anni fa, che si proponevano di spiegare l'inusuale localizzazione di queste proteine erano mirati, in particolar modo, a dimostrare inequivocabilmente che ci fosse una reale espressione delle proteine in questione sulla membrana cellulare e che la loro presenza non fosse attribuibile ad un adsorbimento avventizio delle proteine stesse rilasciate da cellule morte nel sistema di coltura<sup>[94]</sup>.

Ed è stata proprio "l'inusualità" di questo dato che ci ha stimolato a proseguire su una nuova linea interpretativa e a verificare la possibilità che effettivamente queste proteine fossero presenti sulla membrana plasmatica dei modelli cellulari studiati, da un lato per validare le metodologie sviluppate, dall'altro per sfruttare il potenziale informativo fornito da un dato che, seppure anomalo, rimane comunque estremamente interessante.

In questo lavoro sono state analizzate in maniera più dettagliata le proteine che, tra quelle identificate, presentavano aspetti interessanti sia dal punto di vista funzionale (HSP90 e GRP78) che glicobiologico (gp96).

Per molte di queste chaperonine si è cercato di dare un'interpretazione all'inconsueta localizzazione.

GRP78 (78 kDa Glucose Regulated Protein) è una chaperonina con localizzazione tipica a livello del RE e il suo ruolo sarebbe quello di coadiuvare la maturazione strutturale delle catene polipeptidiche in via di formazione,

impedendo l'aggregazione di intermedi non correttamente ripiegati e, di fatto, impedendo l'esportazione di queste ultime dal RE<sup>[95]</sup>. La proteina GRP78 è normalmente espressa ad elevati livelli in cellule private di glucosio o che hanno subito uno shock da ipo-ossigenazione o, in maniera piuttosto interessante, in presenza di inibitori della glicosilazione<sup>[96]</sup>.

GRP94 o gp96 è stata in passato definita anche grp100, endoplasmic reticulum protein 99 (erp99) ed endoplasmina<sup>[97]</sup>. Grp94 è una delle più abbondanti proteine presenti nel RE. Essa è una proteina idrofobica e tende ad associarsi con le membrane del RE e del Golgi. Questa avidità nel legame con le strutture lipidiche ha portato a credere erroneamente che GRP94 fosse una proteina transmembrana. Studi recenti, invece, dimostrano che la quasi totalità della proteina sporge nel lume del RE. In condizioni di stress, GRP94 tende a ridistribuirsi nell'apparato di Golgi, diventa piuttosto abbondante nel nucleo ed è traslocata sulla superficie esterna della membrana plasmatica. L'espressione di GRP94 sulla membrana plasmatica è associata alla presenza di una forma tronca della proteina all'N- o a C- terminale che potrebbe facilitare la "fuga" dal RE. Considerando il coinvolgimento di gp96 sia nell'immunità innata che adattativa, la sua espressione selettiva sulla superficie cellulare potrebbe avere un rilevante ruolo immunologico. L'elevata affinità di questa proteina non solo per catene polipeptidiche ma anche per piccoli peptidi ed il suo naturale coinvolgimento nella maturazione degli MHC di classe I e II, ha permesso di sviluppare ipotesi più convincenti sulla sua presenza a livello della membrana. È noto infatti che essa è coinvolta in qualche modo nell'immunità innata ed adattativa e che anche in assenza di un peptide trasportato è in grado di attivare e stimolare macrofagi e cellule T a produrre citochine come IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , agendo come una "danger molecule"<sup>[98]</sup>. È possibile quindi che gp96 sulla superficie cellulare funzioni come segnale di attivazione di una risposta immunitaria.

Grp94 si associa con numerose proteine tra le quali alcune chinasi, filamenti di actina, la calmodulina, altre chaperonine del RE come ad esempio GRP78, la

calreticulina, la calnexina, la PDI e la HSP47 collagene specifica, formando dei complessi molecolari articolati non ancora del tutto caratterizzati. Essa è, inoltre, una glicoproteina che in condizioni normali presenta un N-glicano legato all'Asn-196 costituito da un core di 8 mannosidi e 2 N-acetil-glucosammine. Le catene laterali possono contenere anche galattosio ed N-acetilgalattosammina. Per GRP94 è stata osservata anche la presenza di O-glicani costituiti da un disaccaride neutro e tri- o tetrasaccaridi sialilati. La O-glicosilazione è un'importante modificazione regolatoria che in molti casi ha una reciproca relazione con la fosforilazione e che quindi può intervenire nella regolazione delle funzioni della proteina<sup>[99]</sup>.

Il pattern di glicosilazione di GRP94 tende, in conseguenza a stress cellulare, a subire cambiamenti che si riflettono in un aumento della resistenza della componente oligosaccaridica alla digestione da parte di endoglicosidasi. Questo comportamento è dovuto al rimaneggiamento delle catene laterali da parte dell'enzima, caratteristico del Golgi, N-acetil-glucosaminiltransferasi I. Tuttavia questi cambiamenti avvengono anche in alcuni stati patologici come la trasformazione neoplastica o il diabete. In situazioni simili si può assistere a fenomeni di iperglicosilazione di siti secondari sul C-terminale della proteina. Si può concludere quindi che variazioni nei livelli di glicosilazione della proteina possono regolare le funzioni ed il comportamento nell'ambiente reticolare dopo uno stress cellulare o in situazioni patologiche<sup>[99]</sup>.

Rimane ancora da stabilire se la traslocazione di gp96 sulla superficie cellulare è esclusiva di stati patologici, almeno per quel che concerne la cellula epatica, e se il suo alterato stato di glicosilazione sia in qualche modo coinvolto con questa nuova ed anomala localizzazione o con una variazione della funzionalità della proteina.

Caratteristica di tutte le proteine con localizzazione a livello del RE, come quelle precedentemente citate, è la presenza, nella porzione C-terminale, di una particolare sequenza amminoacidica KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) che ne garantisce la permanenza a livello del RE mediante il riconoscimento da parte di recettori specifici<sup>[100][101]</sup>.

Nonostante questa peculiarità, esistono diversi riscontri sperimentali che dimostrano la localizzazione di GRP78 e gp96 anche a livello della membrana plasmatica dove si assocerebbero con altre proteine, in alcuni casi non ancora identificate, per formare complessi di diverse dimensioni.

I meccanismi molecolari chiamati in causa per spiegare la “fuga” di proteine KDEL dal RE alla superficie della membrana plasmatica sono diversi. Ad esempio alcuni dati sembrerebbero attribuire questo evento ad una saturazione dei recettori per KDEL con conseguente perdita di alcune proteine che sarebbero in grado di migrare verso la membrana plasmatica. In altri casi il difetto nel sistema di ritenzione potrebbe essere dovuto alla presenza di forme tronche delle proteine o difettive del dominio di riconoscimento. Un'altra ipotesi prevede che l'associazione delle proteine KDEL con proteine che sono destinate ad essere esportate verso la membrana plasmatica possa bloccare stericamente il dominio KDEL, impedendone l'interazione con il rispettivo recettore e comportando la co-migrazione verso la membrana plasmatica. Queste osservazioni, per quanto interessanti, rappresentano comunque solo interpretazioni finalistiche di un comportamento che, alla luce dei risultati riportati in questo lavoro e di quelli in letteratura<sup>[100]</sup>, potrebbe essere molto più importante e di maggior significato biologico: non è un caso che tutti i dati più significativi e, al momento, più completi riguardano forme cellulari associate a trasformazioni neoplastiche.

Su HSP90, in letteratura, sono state fatte le considerazioni più interessanti. HSP90 presenta due forme per l'80% identiche denominate  $\alpha$  e  $\beta$  molto probabilmente originatesi da una duplicazione genica.

HSP90 si presenta come un dimero fosforilato che contiene 2-3 gruppi fosfato per monomero. La dimerizzazione è essenziale affinché la proteina mantenga l'integrità funzionale. Come molte altre chaperonine, HSP90 è una proteina estremamente idrofobica ma che presenta anche domini altamente carichi come ad esempio il dominio a “cerniera” tra il C- e l'N-terminale e quello presente al C-terminale. Queste caratteristiche conferiscono alla proteina una peculiare capacità adesiva. In accordo con la predizione di queste strutture,

studi iniziali hanno dimostrato che HSP90 presenta un'affinità preferenziale per le cariche positive, caratteristica incrementata dalla pesante fosforilazione che la proteina subisce.

HSP90 è probabilmente una delle proteine più adesive del citoplasma, una sorta di colla molecolare all'interno della cellula<sup>[99]</sup>. Oltre a chinasi e fosfatasi Hsp90 lega un'ampia gamma di partner, compresi vari recettori per ormoni nucleari, l'actina, la tubulina, la calmodulina, la calpaina e il proteosoma. Nel citoplasma hsp90 forma un complesso proteico di grandi dimensioni che viene definito "foldosoma" in associazione anche con altri membri della famiglia delle chaperonine.

Dati recenti attestano la localizzazione sulla superficie cellulare anche di HSP90, in particolare sulla membrana dei neuroni nelle fasi precoci dello sviluppo del sistema nervoso: si ipotizza che questa chaperonina sia coinvolta nella migrazione cellulare<sup>[102]</sup>. È stato proposto che, sulla superficie cellulare, HSP90 svolgesse un ruolo attivo, in questo caso in senso migratorio, partecipando a qualche meccanismo che porta la cellula a staccarsi dalla matrice extracellulare e dalle cellule vicine. Eustace e collaboratori<sup>[103]</sup> hanno dimostrato che esiste una stretta relazione tra HSP90 e MMP2 (MatrixMetalloproteasi 2), enzima coinvolto nel rimodellamento della matrice extracellulare. La chaperonina sarebbe indispensabile, spiega Eustace, sia per la maturazione di MMP2 che per il suo corretto funzionamento a livello della membrana. Il suo gruppo ha dimostrato, infatti, che l'inattivazione di HSP90 sulla superficie cellulare utilizzando il farmaco geldanamicina, coniugato a delle *beads* per impedirne l'ingresso nella cellula, porta ad una sensibile riduzione delle capacità invasive della cellula tumorale. È quindi possibile che una quantità o una attività anomala di HSP90 in questa sede possa risolversi in una alterata e sregolata attivazione di MMP2 che, in caso di neoplasie aggressive, potrebbe spingere la cellula tumorale ad acquisire un fenotipo metastatico.

Le analogie funzionali tra la localizzazione di HSP90 sulla membrana plasmatica, il suo coinvolgimento in fenomeni migratori e i dati riportati in questo lavoro, sono significative. È importante ricordare, infatti, che la trasformazione

neoplastica è certamente caratterizzata da un'alterazione della motilità cellulare, la quale appare generalmente incrementata rendendo conto, in questo modo, della elevata capacità metastatica di molti tumori.

In generale, per quanto riguarda tutte le chaperonine appartenenti al gruppo delle HSP, solo di recente si comincia ad attribuire un'importanza alla loro localizzazione a livello di membrana plasmatica. Sembra che il loro ruolo sulla superficie cellulare consisterebbe, nell'attivare specifiche funzioni di "signalling" indotte da un'interazione ligando-recettore. Ad esempio HSP espresse sulla superficie di cellule tumorali vengono riconosciute dai linfociti T tramite i recettori  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ,  $\delta$ <sup>[104]</sup>. Un comportamento analogo sarebbe attribuibile alla gp96 che pare interagire con il recettore TLR2/4 inducendo un'attivazione di chinasi attivate normalmente da mitogeni e/o da stress<sup>[105]</sup>.

Dal punto di vista di un approccio glicomico alla trasformazione neoplastica e facendo salvo il concetto ormai accettato e dimostrato della stretta associazione tra la trasformazione neoplastica e la modificazione dei pattern di glicosilazione appare piuttosto interessante l'osservazione secondo la quale alcune di queste proteine vengano attivate ad alti livelli in presenza di inibitori della glicosilazione. Le alterazioni della glicosilazione potrebbero essere, entro certi limiti, assimilati agli effetti prodotti dal trattamento con inibitori della glicosilazione. Non bisogna dimenticare, inoltre, che questi chaperone molecolari sono deputati al controllo e alla successiva eliminazione di proteine non correttamente ripiegate e/o glicosilate. Una loro alterata funzionalità potrebbe risolversi in una mancata eliminazione della proteina non funzionale con conseguente trasporto della stessa al compartimento di competenza. La presenza, quindi, di proteine aberrantemente glicosilate sulla membrana plasmatica potrebbe essere dovuta a meccanismi di eliminazione alterati a livello del RE e del Golgi. Certamente questa è semplicemente una considerazione ipotetica che, in ogni caso, potrebbe costituire una buona base di partenza per ulteriori e più approfonditi studi.

In definitiva i risultati relativi alla localizzazione a livello della membrana plasmatica di proteine appartenenti alla famiglia delle chaperonine costituiscono certamente un arricchimento delle conoscenze di base relative al proteoma della membrana plasmatica e aprono tutta una serie di ipotesi nell'ambito della possibile identificazione di nuovi target diagnostici e terapeutici, obiettivi sempre più emergenti nella ricerca sul cancro.

In questo lavoro si è cercato non solo di ottenere gli strumenti per facilitare la comprensione del proteoma di membrana ma anche porre le basi per lo studio e la caratterizzazione degli *N*-glicani associati a questo compartimento. Quest'ultimo aspetto sperimentale è piuttosto rilevante; la possibilità di sviluppare una glicoproteomica in senso stretto si è sempre scontrata con la sostanziale incompatibilità dei metodi disponibili in letteratura, che comportavano o la perdita della componente saccaridica o il sacrificio di quella proteica. Fintanto che l'approccio glicoproteomico era rivolto esclusivamente all'identificazione del complesso delle proteine espresse da una cellula, ciò non ha mai costituito un problema; quando invece si rende necessaria un'analisi di un compartimento esclusivo come quello della membrana plasmatica, dove la componente glicoproteica è poco rappresentata, il discorso è diverso ed è sperimentalmente più complesso. In tal senso, l'ottimizzazione degli approcci sperimentali di 2-DE che consentono la simultanea caratterizzazione della porzione oligosaccaridica e di quella proteica è auspicabile se non indispensabile. La difficoltà operativa connessa con lo sviluppo di una glicoproteomica in senso stretto ha richiesto un tempo di elaborazione progettuale e messa a punto sperimentale molto più lungo di quanto previsto. Ciò è particolarmente evidente se si considera anche il fatto che si è dovuto lavorare con un modello glicoproteico che non poneva problemi in termini di disponibilità, in senso quantitativo, di proteina. Ciononostante le difficoltà con cui ci siamo dovuti scontrare sono state notevoli ed hanno richiesto un lungo periodo di elaborazione. Il passaggio all'analisi glicoproteomica di campioni "reali" non è così automatica e priva di incognite. Tuttavia è legittimo

affermare che è proprio in quest'ottica che risiede l'importanza dei risultati ottenuti in questo lavoro, ossia nell'aver messo a punto un efficiente metodo per lo sviluppo di una completa glicomica della membrana plasmatica.

## 6. CONCLUSIONI

Una delle più interessanti strategie di sviluppo della ricerca sul cancro è la possibilità di individuare nuovi marcatori che consentano l'identificazione il più precoce possibile della trasformazione neoplastica e che possano venir utilizzati come target nei trattamenti terapeutici. Questo è particolarmente vero per forme tumorali quali l'HCC, che si presenta sintomatologicamente solo quando la malattia è oramai già in fase avanzata di sviluppo e la prognosi è infausta.

Nell'ultimo decennio è diventato sempre più evidente che la componente proteica della superficie cellulare svolge un ruolo di primo piano nel determinare la specificità informativa di un determinato fenotipo, sia esso fisiologico che patologico. In realtà ciò non dipende solo dalla proteina *per se*, ma soprattutto dalle sue modificazioni post-traduzionali, in particolare in termini di glicosilazione. Infatti, è proprio l'eterogeneità della glicosilazione che garantisce l'elevato grado di complessità strutturale e funzionale richiesto in un compartimento cellulare cruciale come la membrana plasmatica.

Sulla base di queste considerazioni appare ovvio che una modificazione fenotipica come quella della trasformazione neoplastica è legata anche ad una modificazione del pattern di glicosilazione.

E' proprio partendo da questa importante premessa che negli ultimi anni si è cominciato a parlare di glicomica e glicoproteomica, intese come approccio biotecnologico teso ad identificare le variazioni della componente glicoproteica associata ad un tipo cellulare, tissutale e/o ad una particolare situazione fisiopatologica. I notevoli progressi tecnologici che hanno consentito l'esplosione degli approcci di proteomica non sono stati accompagnati in maniera altrettanto rapida ed incisiva da quelli relativi alla glicomica, soprattutto per quanto riguarda le glicoproteine della membrana plasmatica. Le difficoltà

incontrate nello studio di tali macromolecole sono legate principalmente alle loro caratteristiche chimiche, alla loro limitata abbondanza e all'eterogeneità delle catene glicosidiche ad esse legate.

Scopo del presente lavoro di Tesi era quello di mettere a punto degli approcci di glicoproteomica differenziale per l'identificazione di nuovi marcatori associata all'HCC.

Gli obiettivi prefissati sono stati pienamente raggiunti. Infatti

- sono stati sviluppati dei protocolli sperimentali che consentono l'estrazione e la purificazione e il conseguente arricchimento della componente glicoproteica della membrana plasmatica;
- sono stati messe a punto delle strategie di deglicosilazione enzimatica in gel direttamente da mappe 2-DE che consentono contemporaneamente l'analisi della componente oligosaccaridica e di quella proteica.

I risultati ottenuti sono rilevanti non solo per gli aspetti conoscitivi, di per se importanti, ma anche per le potenziali prospettive di sviluppo. Infatti, la possibilità di avere una visione d'insieme delle modificazioni delle proteine di membrana nell'HCC permetterà l'identificazione di nuovi marker proteici e glicoproteici con l'opportunità di sviluppare nuovi approcci terapeutici per il trattamento dell'HCC.

L'approccio sperimentale utilizzate ha portato alla costante identificazione sulla membrana plasmatica dei modelli cellulari studiati una numero rilevante di proteine con nuzio ne di Chaperone.

Le chaperonine giocano un ruolo fondamentale non solo nel mantenimento dell'omeostasi cellulare ma anche nell'eziologia di numerose patologie ed è per questo motivo che in ambito clinico risultano particolarmente interessanti come target terapeutici.

L' interesse della comunità scientifica è rivolto in modo particolare alla possibilità di sfruttare la capacità di queste proteine di attivare una risposta immunitaria per lo sviluppo di vaccini antitumorali <sup>[106][107]</sup>. In quest'ottica, la localizzazione di molte di alcune proteine a livello della superficie cellulare

potrebbe aprire nuovi scenari sulle possibilità di utilizzo in campo diagnostico e terapeutico. Questa possibilità acquisisce ancor più valore se si considera che, fatta eccezione per alcuni casi, il ritrovamento di chaperonine sulla membrana plasmatica è limitato a cellule tumorali mentre non si rileva la loro presenza, come dimostrato anche in questo lavoro, sulle corrispondenti cellule normali.

Un'ultima considerazione deve essere obbligatoriamente fatta riguardo i modelli cellulari utilizzati. L'impossibilità di ottenere un modello cellulare epatico umano, che rispecchiasse totalmente le caratteristiche di un epatocita normale, ha limitato notevolmente questo tipo di ricerca. Il modello scelto come controllo normale, la linea cellulare CHANG liver, non si è rivelato essere del tutto "normale". Il fatto stesso di essere una linea cellulare immortalizzata rende ancora più sottile il confine che la separa dall'essere un tumore. Inoltre il carattere preliminare della ricerca, la messa a punto di metodologie estrattive, la relativa poca abbondanza delle proteine di membrana e la complessità intrinseca di questo compartimento cellulare hanno reso ancor più difficile il lavoro.

Resta comunque confermata la validità dei metodi sviluppati e la possibilità di applicazione di questi ultimi in altri ambiti di ricerca e su differenti modelli biologici.

# BIBLIOGRAFIA

1. Ono, M. and S. Hakomori, *Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness*. Glycoconj J, 2004. **20**(1): p. 71-8.
2. Gahmberg, C.G. and M. Tolvanen, *Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(8): p. 308-311.
3. Lis, H. and N. Sharon, *Protein glycosylation. Structural and functional aspects*. Eur J Biochem, 1993. **218**(1): p. 1-27.
4. Hakomori, S., *Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10231-10233.
5. Hurlley, S., R. Service, and P. Szuromi, *Cinderella's coach is ready*. Science, 2001. **291**: p. 5512.
6. Seow, T.K., et al., *Hepatocellular carcinoma: from bedside to proteomics*. Proteomics, 2001. **1**(10): p. 1249-1263.
7. R.B. Ray, R.S., K. Meyer, R. Ray, *Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C viral core protein*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(17): p. 10983-10986.
8. R.B. Ray, K. Meyer, and R. Ray, *Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein*. Virology, 1996. **226**(2): p. 176-182.
9. R.B. Ray, L.M.L., K. Meyer, R. Ray, *Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblast to tumorigenic phenotype*. Journal of Virology, 1996. **70**(7): p. 4438-4443.
10. Hirabayashi, J., *Glycomics, coming of age!* Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2000. **12**(63): p. 1-5.
11. Banin, E., *A Novel Linear Code nomenclature for complex carbohydrates*. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2002. **14**(77): p. 127-137.
12. Perkel, J., *Glycobiology goes to the ball*. The Scientist, 2002. **16**(9): p. 32.

- 13 Naaby-Hansen S, Waterfield MD, Cramer R. *Proteomics--post-genomic cartography to understand gene function*. Trends Pharmacol Sci. 2001 ;**22** (7):376-84.
14. Lau, A.T., Q.Y. He, and J.F. Chiu, *Proteomic technology and its biomedical applications*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2003. **35**(11): p. 965-75.
15. Hanash, S., *Disease proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 226-32.
- 16 Wilkins, M. R., Sanchez, J., Gooley, A., Appel, R. Unphrey-Smith, E. Hochstrasser, D. and Williams, K. Progress with proteome project: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotech. Gene. Eng. Rev. 1995 **13**, p.19-50.
- 17 Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem. 1969 Aug 25;244(16):4406-12
- 18 Panyim S, Chalkley R. The molecular weights of vertebrate histones exploiting a modified sodium dodecyl sulfate electrophoretic method. J Biol Chem. 1971 Dec 25;246(24):7557-60.
19. O'Farrel, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J. Biol. Chem, 1975. **250**: p. 4007-4021.
- 20 Klose, J., *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals*. Humangenetik, 1975. **26**(3): p. 231-43.
- 21 Klose, J. and Kobalz, U. Two-Dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for functional analysis of the Genome. Electrophoresis 1995 **16**, p.1034-1059.
- 22 Bjellqvist, B., Righetti, P., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R. Isoelectric-focusing in immobilized pH gradient. principle methodology and some applications. J. of p. 317-339 Biochem. Biophys. Methods 1982 **6**
- 23 Gorg, A., Postel, W., Gunther, S. The current state of Two-Dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients . Electrophoresis 1988. **9** p.531-546.

- 24 Righetti, P. Immobilized pH Gradients: Theory and Methodology 1990 Elsevier, Amsterdam.
- 25 Gianazza, E. Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modification of proteins. J. of Chromatogr. A 1995. **705** p.67-87
- 26 Bjellqvist, B., Huges, G., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. The focusing position of polipeptides in immobilized pH gradient can be predicted from their amino-acidi sequences. Electrophoresis 1993 **14**. p.1023-1031
- 27 Gianazza, E., Astrua-Testori, S., Righetti, P. Some more formulations for immobilized pH gradients. Electrophoresis 1985. **6** p. 113-117.
- 28 Molloy, M.P., *Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients*. Anal Biochem, 2000. **280**(1): p. 1-10.
- 29 Anderson, N.L., Anderson, N.G. High resolution Two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977. **74** p. 5421-5425.
- 30 Anderson, N.L., Anderson, N.G, Tollaksen, S. Proteins of human urine. I. Concentration and analysis by two-Dimensional electrophoresis. Clin. Chem. 1979 **25**. p. 1199-1210.
- 31 Ericsson, C., Franzén, B., Hirano, T., Auer, G. The protein composition of head, thorax and abdomen of adult male and female *Drosophila melanogaster*. in review.
- 32 Epstein,H., Shakes, D. *Caenorhabditis elegans*: modern biological analysis of an organism. Methods in Cell Biology 1995 **48**. p.4-27.
- 33 Gianazza, E. Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modification of proteins. J. of Chromatogr. A 1995. **705** p.67-87
- 34 Packer, N.H., et al., *Analyzing glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis*. Electrophoresis, 1998. **19**(6): p. 981-8.
- 35 Mechref, Y. and M.V. Novotny, *Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity*. Chem Rev, 2002. **102**(2): p. 321-69.

- 36 Ames, G., Nikaido, K. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Biochemistry*. 1976 **15** p.616-623.
- 37 Hochstrasser, D., Tissot, J. Clinical applications of high-resolution 2-D PAGE *Advances in electrophoresis* 1993. **6** p.270-375.
- 38 Toussi, A., Paquet, N., Huber, O., Frutiger, S., Tissot, J., Huges, G. et al. Polipeptide marker and disease patterns found while mapping proteins in ascitis. *J. of Chromatogr.* 1992 **582**. p. 87-92
- 39 Kim, J. et al. *Proteome analysis of human liver tumor tissue by two dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of disease-related proteins* *Electrophoresis* 2002, **23**, 4142–4156
- 40 Clare-Mills, E., Freedman, R. *Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. Factors affecting resolution of rat liver microsomal proteins.* *Biochim. Biophys. Acta.* 1983 **734** p. 160-167
- 41 Chang, H., Bock, E. *Pitfalls in the use of commercial non-ionic detergents for the solubilization of integral membrane proteins: sulphhydryl oxidizing contaminants and their elimination.* *Anal. Biochem.* 1980 **104** p.112-117
- 42 Pryde, J., Phillips, J. *Fractionation of membrane proteins by temperature-induce phase separation in Triton X-114.* *Biochem. Journal* 1986 **233** p. 525-533.
- 43 Towbin, H, Staehelin, T. and Gordon, G. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* *P.N.A.S USA.* **76** p.4350-4354
- 44 Eckerskorn, C. Blotting membrane as the interface between electrophoresis and protein chemistry, *Microcharacterization of Proteins* (Kellner, Lottspeich and Meyer eds.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p.75-89
- 45 Wirth, P. and Romano, A. *Staining methods in gel electrophoresis, including the use of multiple detection methods* *J. Chromatogr. A* **698**. p. 123-143.

- 46 Candiano, G., et al., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1327-33.
- 47 Shevchenko A., W.M., Vorm O., Mann M., *Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels*. Anal. Chem, 1996. **68**: p. 850-858.
- 48 Steinberg, T.H., et al., *Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots*. Proteomics, 2001. **1**(7): p. 841-55.
- 50 *The Melanie II 2-DE analysis software* [www.page: http://www.expasy.ch/melanie/melanie.top.html](http://www.expasy.ch/melanie/melanie.top.html).
- 51 Appel, R., Palgi, P., Wlather, D., Vargas, J., Sanchez, J, Pasquali, C, et al. *Melanie II: a third generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images-I. Features an user interface*. Electrophoresis 1997 **18**, 2724-2734.
- 52 Miller, R., Olson, A. and Thorgeirsson, S. *Computer analysis of two-dimensional gels: automatic matching*. Electrophoresis 1984, **5** ,p.297-303
- 53 Patterson, S.D *From electrophoretically separated protein to identification: Strategies for sequence and mass analysis*. Anal. Biochem. 1994 **221**, p. 1-15
- 54 Patterson, S.D. *Matrix-assisted laser desorption /ionization mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins in the 5-50pmol range*. Electrophoresis 1995 **16**, p.1104-1114
- 55 Mann, M. and Wilm, M. *Electrospray mass spectrometry for protein characterisation*. Trends Biochem.1995 **20**, p.219-223.
- 56 Stahl, D., Swiderek, K., Davis, M. and Lee, T. *Data-controlled automation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of peptid mixtures*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1995, **7**, p.532-540.
- 57 O'neil, R. *Enzymatic release of oligosaccharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis*. J. Chromatogr. A 1996, **720**, p. 201-215.

- 58 Gras, R., Muller, M., Gasteiger, E., Gay, S., Binz, P., Bienvenut, W. et al. Improving protein identification from peptide mass fingerprinting through a parameterized multi-level scoring algorithm and an optimized peak detection. *Electrophoresis* 1999, **20**, p. 3535-3550.
- 59 Jensen, O., Podtelejnikov, A. and Mann, M. *Identification of the component of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching*. *Anal. Chem.* **69**, 4741-4750.
- 60 Hirabayashi J, Kasai K. *Separation technologies for glycomics*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002, **771**(1-2):67-87.
- 61 Rudd, P.M., et al., *Oligosaccharide sequencing technology*. *Nature*, 1997. **388** (6638): p. 205-7.
- 62 Harvey, D. *Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry*. *Proteomics* 2001, **1**, p.311-328
- 63 Mechref, Y. Muzikar, J. Novotny, M. *Comprehensive assessment of N-glycans derived from a murine monoclonal antibody: A case for multimethodological approach*. *Electrophoresis* 2005, **26**, p.2034-2046
64. Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon, *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1473**(1): p. 4-8.
65. Varki, A., et al., *Essentials of Glycobiology*. 1999.
66. Michael P. Murrel, K.J.Y., Andre Levchenko, *The systems biology of glycosylation*. *ChemBioChem*, 2004. **5**: p. 1334-1347.
67. J. Rojo, J.C.M., S. Penadés., *Carbohydrate-Carbohydrate Interactions in Biological and Model System*. *Topics Curr. Chem.*, 2002. **218**: p. 45-92.
68. Gorelik, E., U. Galili, and A. Raz, *On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2001. **20**(3-4): p. 245-77.
- 69 Bertozzi, C.L.; Kiessling, L.L. *Chemical glycobiology*. *Science*, 2001, **291**, 2357-2364.

- 70 Dwek, M. V.; Lacey, H. A.; Leathem, A. J. C. *Breast cancer progression is associated with a reduction in the diversity of sialylated and neutral oligosaccharides*. *Clinica Chimica Acta* 1998, **271**, p.191-202.
- 71 Kobata, A., *A retrospective and prospective view of glycopathology*. *Glycoconj J*, 1998. **15**(4): p. 323-31.
- 72 Dennis, J.W., M. Granovsky, and C.E. Warren, *Protein glycosylation in development and disease*. *Bioessays*, 1999. **21**(5): p. 412-21.
- 73 Molloy, M.P., V. Santoni, and T. Rabilloud, *Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible?* *Electrophoresis*, 2000. **21**: p. 1054-1070.
- 74 Lehner, I., M. Niehof, and J. Borlak, *An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins*. *Electrophoresis*, 2003. **24**: p. 1795-1808.
- 75 Shin, B.K.e.a., *Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperon function*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(9): p. 7607-7616.
- 76 Wilchek M, Bayer EA\_ *Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotinsystem*. *Biomol Eng*. 1999, **31**;16(1-4):1-4
- 77 Diamandis EP, Christopoulos TK\_ *The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology*. *Clin Chem*. 1991;**37**(5):625-36.
- 78 Peirce, M., Wait, R., Begun, S. and Saklatvala, J. *Expression profiling of Lymphocyte Plasma membrane proteins*. *Molecular and Cellular Proteomics* **3**, p.56-65
- 79 Perdew GH, S.H., Selivonchick DP., *The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes*. *Anal Biochem*, 1983. **135**(2): p. 453-455.
- 80 Rabilloud, T., et al., *Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(3-4): p. 307-16.

- 81 Rabilloud, T., *Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis*. *Electrophoresis*, 1998. **19**(5): p. 758-60.
- 82 Herbert, B.R., et al., *Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent*. *Electrophoresis*, 1998. **19**(5): p. 845-51.
- 83 Huang, Y., Mechref, Y, Novotny, MV. *Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis*. *Anal Chem* 2001 **73**: p 6063-6069
- 84 Wilson NL, Schulz BL, Karlsson NG, Packer NH. *Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins*. *Journal of Proteome Research* 2002;**1**: p 521–529
- 85 Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Wormald, M., Jaques, A. and Parekh, R. *Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins*. *Biochemistry* 1993, **32**, p 679-693
- 86 Gentsch, M., Cui, L., Mengos, A. Chang, X.-b. Chen, J.-H. and J. R. Riordan *The PDZ-binding Chloride Channel ClC-3B Localizes to the Golgi and Associates with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-interacting PDZ Proteins* *J. Biol. Chem.* 2003; **278**(8):p 6440 - 6449.
- 87 Kuster, B., et al., *Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography*. *Anal Biochem*, 1997. **250**(1): p. 82-101.
- 89 Welch WJ. *Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1993 **29**;339(1289):327-33.

- 90 Ellis RJ. *The general concept of molecular chaperones*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1993 **29**;339(1289):257-61.
- 91 Georgopoulos C, Welch WJ. *Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones*. Annu Rev Cell Biol. 1993;**9**:601-34.
- 92 Gullo, C. A., Gerrard, T., *Heat shock proteins: to present or not, that is the question*. Immunology Letters 2004 **94** p. 1-10.
- 93 Belles, C., Kuhl, A., Nosheny, R. and Carding, S. *Plasma membrane expression of Heat Shock Protein 60 in vivo in response to infection*. Infection and Immunity 1999. **67**(8) p. 4191-4200.
- 94 Altmeyer, A., Maki, R. G., Feldweg, A. M., Heike, M., Protopopov, V., Masur, S. and Srivastava, P. *Tumor specific cell surface expression of the -KDEL containing, endoplasmic reticular Heat shock protein gp96*. Int. J. Cancer: 1996. **69** p.340-349.
- 95 Gheting, MJ., *Role and regulation of the ER chaperone Bip*. Cell and Developmental biology. 1999. **10** p.465-467.
- 96 Pouyssegur J, Shiu RP, Pastan I. *Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation*. Cell. 1977 **11**(4):941-7.
- 97 Robert, J., Menoret, A. and Cohen, N. *Cell surface expression of the endoplasmic reticula Heat Shock Protein gp96 phylogenetically conserved*.The Journal of Immunology 1999 **163** p. 4133-4139.
- 98 Linderoth NA, Popowicz A, Sastry S. *Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94)*. J Biol Chem. 2000 **275**(8):5472-7.
- 99 Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. and Gabor, N. *The 90kDa Melecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review*. Pharmacol. Therapy. 1998. **79**(2) p. 129-168.
- 100 Xiao, G. Chung, T.F., Pyun, H. Y., Fine, R.E. and Johnson, R. *KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells*. Molecular brain research 1999. **72**. p. 121-128.

- 101 Gomord V, Denmat LA, Fitchette-Laine AC, Satiat-Jeunemaitre B, Hawes C, Faye L. *The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER.* Plant J. 1997 **11**(2):313-25.
- 102 Sidera, K., et al., *Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system.* J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45379-88.
- 103 Eustace, B., Sakurai, T., Stewart, J., Yimlamai, D., Unger, C., Zehetmaier, C., Lain, B., Torella, C., Henning, S., Beste, G., Scroggins, B., Neckers, L., Ilang, L. and Jay, D. *Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 in cancer cell invasiveness.* Nature Cell Biology 2004 **6** (6) p.507-514.
- 104 Harada M., K.G., Nomoto K., *Heat shock proteins and the antitumor T cell response.* Biotherapy, 1998. **10**(3): p. 229-235.
- 105 Vabulas, R.M., et al., *The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway.* J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20847-53.
- 106 Lee, A. S. *The glucose regulated proteins: stress induction and clinical application.* Trends in biochemical science 2001 **26**(8) p.504-510.
- 107 Castelli, C., Rivoltini, L., Rini, F., Bellil, F., Testori, A., Maio, M., Mazzaferro, V., Coppa, J., Srivastava, P. and Parmiana, G. *Heat shock proteins: biological function and clinical application as personalized vaccines for human cancer.* 2004 **53** p. 227-233.

- ❖ Amedeo Vetere, Amelia Gamini, Sabrina Semeraro, Isabella Rustighi and Sergio Paoletti. "All-aqueous, regiospecific transglycosylation steps for the synthesis of LewisX antigen". *Biocatalysis: Chemistry and biology*, 2005, ed. A. Trincone. Research Signpost.
- ❖ Sabrina Semeraro, Amedeo Vetere, Luisa Alessio, Isabella Rustighi, Alessandro Vindigni, Marlen Lujardo Gonzales and Sergio Paoletti. " Profiling of Hepatocarcima cell surface protome reveals unusual presence of proteins with chaperone function". Submitted to *J. of Chromatography B*.
- ❖ Isabella Rustighi, Amelia Gamini, Cristiana Campa, Amedeo Vetere, Sabrina Semeraro, Alessandra Basso, Lucia Gardossi and Sergio Paoletti. "Efficient transglycolytic synthesis of N-acetyllactosaminecatalized by immobilized  $\beta$ -D galactosidase monitored by capillary electrophoresis". To be submitted.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Chromatography B

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: PROFILING OF HEPATOCARCINOMA CELL SURFACE PROTEOME REVEALS UNUSUAL PRESENCE OF PROTEINS WITH CHAPERONE FUNCTION

Article Type: IPSO 2005

Section/Category:

Keywords: proteomics, hepatocarcinoma, membrane protein, chaperone

Corresponding Author: Dr Amedeo Vetere, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Trieste

First Author: Sabrina Semeraro

Order of Authors: Sabrina Semeraro; Amedeo Vetere, PhD; Luisa Alessio; Isabella Rustighi; Alessandro Vindigni, PhD; Marlen Lujardo Gonzales; Sergio Paoletti

Manuscript Region of Origin:

**Abstract:** The plasma membrane is a sub-cellular compartment of substantial interest with regard to various aspects of disease, from molecular diagnosis to therapeutics. Cell surface proteins that are restricted in their expression to specific cancers or that undergo restricted tumour-specific modifications could be utilized for vaccine development or immunotherapy. Therefore comprehensive profiling of proteins expressed on the cell surface could provide a better understanding of membrane functions, in physiological and pathological conditions, and interactions with the intra- and/or extra cellular-environment. This is particularly true for the hepatocarcinoma for which there are limited data pertaining to global characterisation of cell surface proteome. We applied a strategy for profiling and identification of surface membrane proteins of a hepatocarcinoma cell model (HepG2) based on the selective tagging of protein involving selective

# Efficient transglycolytic synthesis of N-acetyllactosamine catalized by immobilized $\beta$ -D-galactosidase monitored by capillary electrophoresis.

## Authors:

Isabella Rustighi<sup>a</sup>, Amelia Gamini<sup>a</sup>, Cristiana Campa<sup>b</sup>, Amedeo Vetere<sup>a,\*</sup>, Sabrina Semeraro<sup>a</sup>,  
Alessandra Basso, Lucia Gardossi and Sergio Paoletti<sup>a</sup>

## Affiliations:

<sup>a</sup> *Department of Biochemistry, biophysics and Macromolecular Chemistry, University of Trieste, Italy*

<sup>b</sup> *Bracco Imaging Spa-CRM Trieste, Area Science Park, Trieste, Italy*

\* Corresponding author

Tel: +39 040 558 3692

Fax: +39 040 558 3691

E-mail address: [vetere@bbcm.univ.trieste.it](mailto:vetere@bbcm.univ.trieste.it)

## Abstract

Synthesis of *N*-acetyllactosamine (Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc, LacNAc), starting from *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside and *N*-acetylglucosamine as substrates, was efficiently achieved by anchoring  $\beta$ -D-galactosidase from *Bacillus circulanson* two different types of commercial polymers: Eupergit and Sepabeads. Kinetic studies revealed that the type of support heavily influences the selective galactose transfer of  $\beta$ -D-galactosidase. Differences in enzymatic activity have been highlighted monitoring the production of *N*-acetylglucosamine directly *via* capillary electrophoresis, after coupling the disaccharide to 2-aminobenzoic acid-chromophore for suitable UV-visible detection.

Keywords:  $\beta$ -D-galactosidase, immobilization, *N*-acetyllactosamine, 2-aminobenzoic acid, anthranilic acid, capillary electrophoresis.