

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
DIPARTIMENTO DI CITOMORFOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MORFOLOGICHE
Coordinatore: Prof. Alessandro Riva

TITOLO

Gene inducibile *vgf* e surrene

Prodotti derivati da proVGF, distribuzione differenziale,
possibile modulazione

Tutore
Prof. Gian-Luca Ferri

Tesi di Dottorato del
Dott. Filomena D'Amato

ANNI ACCADEMICI 2003-2006

INDICE

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE

1.1	Alla ricerca di “GENI DEI NEURONI”: la scoperta di <i>vgf</i>	6
1.2	Il GENE “ <i>vgf</i> ” e la sua struttura	9
1.3	Sequenza primaria del precursore proVGF	10
1.4	Espressione e localizzazione selettiva neuro-endocrina	14
1.5	Il precursore proVGF e i suoi prodotti	16
1.6	Trasporto, processazione e release	18
1.7	Verso la funzione: ipotesi di attività biologiche	19
1.8	Regolazione dei livelli di VGF mRNA e dei prodotti di VGF	21
1.9	Cenni di anatomia del SURRENE	24

2. SCOPO DELLA RICERCA

2.1	Regolazione, modulazione e release di VGF-peptidi da organi e tessuti: la necessità di approcci quantitativi	31
-----	---	----

3. MATERIALI E METODI

3.1	Produzione antisieri	34
3.2	Animali	39
3.3	Prelievi e trattamento campioni	42
3.4	Immunoistochimica	43
3.5	Microscopia ed acquisizione immagini	45

3.6 ELISA	46
3.7 Caratterizzazione di forme molecolari	53

4. RISULTATI

4.1 Localizzazione di VGF nel surrene	56
4.2 Caratterizzazione cellulare della VGF-immunoreattività	58
4.3 Concentrazioni tissutali di VGF	61
4.4 Eterogeneità molecolare di VGF-peptidi	63
4.5 Modulazione dell'accumulo tissutale di VGF-peptidi	65

5. DISCUSSIONE

5.1 Ipotesi strumentali e prospettive della ricerca	71
---	----

6. BIBLIOGRAFIA

6._ Bibliografia citata	79
-------------------------	----

SOMMARIO

Il gene “*vgf*” fu scoperto perché è uno dei prodotti più potentemente e selettivamente indotti da Nerve Growth Factor (NGF) in cellule di feocromocitoma di ratto (linea PC12: Levi et al., 1985), in coincidenza con il loro passaggio ad un fenotipo neuronale indotto dall’NGF stesso. Un unico trascritto primario è tradotto nel precursore proVGF (~90KDa), che è accumulato e trasportato in granuli secretori. Più volte è stata provata la processazione di questo neuropeptide in frammenti di basso peso molecolare, i quali sono poi liberati in seguito a stimoli di diversa natura (Possenti et al., 1989). La localizzazione di VGF e dei peptidi suoi derivati è altamente tessuto specifica ed è ristretta a sottopopolazioni neuronali del sistema nervoso centrale e periferico nonché a specifici gruppi di cellule endocrine (Van der Pol et al., 1989; Ferri et al., 1992).

Il fenotipo di topi knock-out per *vgf*, produce topi magri, ipermetabolici e iperattivi oltre a patire altre disfunzioni metaboliche meglio descritte in seguito (Hahm et al., 1999). Ciò indica come, qualsiasi siano i prodotti di questo gene, essi abbiano un ruolo nel controllo dell’omeostasi energetica. Più recenti studi hanno dimostrato che la somministrazione intracerebro-ventricolare di un frammento di VGF chiamato “TLQP 21”, attiva l’upregulation del tessuto bruno adiposo nonché l’aumento dei livelli sierici di adrenalina nei topi (Bartolomucci et al., 2006).

Questi fatti ci hanno spinti a studiare la presenza e la modulazione di VGF e dei suoi frammenti derivati nel surrene di specie animali di alto interesse

zootecnico (suino e bovino) e sperimentale (ratto) in cui la porzione codificante del gene “**vgf**” presenta una alta omologia di sequenza con l’umano.

Parallelamente abbiamo sviluppato un metodo quantitativo immuno-chimico, che per la prima volta ha consentito la **misurazione di VGF**, prima nei vari tessuti e nelle diverse specie studiate, nonché, tramite metodi di separazione di massa, di ipotizzare la presenza di **forme clivate** di VGF all’interno di questa ghiandola.

Quale primo esempio applicativo dei “nuovi ELISA” appena messi a punto, abbiamo misurato i livelli dei VGF-peptidi nel surrene di due gruppi di animali appositamente sacrificati in differenti condizioni di stress ambientale.

I risultati ottenuti e descritti nel presente studio, apportano importanti informazioni sulla localizzazione ed effettiva processazione di VGF nel surrene e forniscono il primo metodo quantitativo immuno-enzimatico per la misura del peptide in esame.

Il prossimo passo sarà la messa a punto di questo metodo quantitativo nei tessuti umani, non solo per le applicazioni ipotetiche che potrebbe trovare nel campo delle disfunzioni nutrizionali, ma, considerato il legame di recente trovato tra alcuni frammenti di VGF e disturbi neurodegenerativi quali l’Alzheimer o la SLA (Sclerosi laterale amiotrofica) (Carrette *et al.*, 2003; Pasinetti *et al.*,2006), questo metodo potrebbe ipoteticamente servire per usare VGF come biomarker nella diagnostica di queste malattie neurologiche.

1. INTRODUZIONE

1.1 Alla ricerca di “GENI DEI NEURONI”: la scoperta di *vgf*

La scoperta e la identificazione del gene “*vgf*” nasce in rapporto all’interesse focalizzatosi sui fattori di crescita neuronali, specie quelli detti “neurotrofine”, in seguito alla scoperta del Nerve Growth Factor (NGF) nel 1968. Le funzioni di questa ed altre molecole appartenenti alla stessa classe di fattori di crescita, quali il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) e la neurotrofina 4/5 (NT 4/5), sono collegate alla proliferazione cellulare, al differenziamento e/o sopravvivenza cellulare, così come sono capaci di modulare il fenotipo funzionale di vari tipi di neuroni nel sistema nervoso centrale e periferico anche nell’età adulta. Tra le altre funzioni comprovate delle neurotrofine non sfugge il rilevante effetto neuroprotettivo che esercitano su vari tipi neuronali, il che le rende potenzialmente interessanti in rapporto a quadri di malattia neurodegenerativa (come il morbo di Alzheimer, Parkinson o la Sclerosi Laterale Amiotrofica), così come nella regolazione di più selettive funzioni (esempio: regolazione della soglia del dolore). NGF, in particolare, risulta essenziale per la sopravvivenza, maturazione e funzionalità

di neuroni simpatici e sensitivi del sistema nervoso periferico (Levi-Montalcini et al., 1968).

Una delle linee cellulari più utilizzate per studiare le neurotrofine è storicamente quella derivata da un feocromocitoma di ratto ed identificata con la sigla "PC12". Tale linea è particolarmente sensibile a NGF. Tali cellule tumorali derivano da cellule della midollare del surrene e non richiedono NGF per sopravvivere: in assenza di NGF hanno piccole dimensioni ed aspetto epitelioido e crescono a confluenza duplicandosi in poco più di 48 ore. L'aggiunta di NGF al terreno di coltura induce in modo riproducibile il differenziamento delle cellule PC12 in un fenotipo del tutto diverso, di tipo neuronale con molteplici prolungamenti dendritici ed assonali, in parallelo all'aumento di espressione di una serie di geni, che vennero così considerati "specificamente neuronali", ovvero richiesti e potenzialmente essenziali per "fare un neurone". Rapidamente, divenne chiaro come i geni indotti in tali circostanze siano di due categorie principali, anche in rapporto al tempo richiesto per la loro risposta / induzione da NGF. Si distinsero quindi geni "immediate-early" ad induzione molto rapida e geni ad induzione precoce ma con cinetica ritardata, o "delayed-early". Al primo gruppo appartengono geni la cui risposta è indipendente dalla sintesi proteica e rispondono in pochissimo tempo a molteplici stimoli (Herschman et al., 1989). L'induzione del secondo gruppo scaturisce dall'accumulo dei prodotti dei geni "immediati", alcuni di questi rappresentano specifici marker per il fenotipo neuronale. VGF appartiene alla classe "delayed-early" e la sua espressione dipende in modo essenziale dalla sintesi proteica. Un incremento nei livelli del suo mRNA è evidente dopo

almeno 30-60 minuti successivi alla somministrazione di NGF e arriva a plateau dopo 5-8 ore (Levi *et al.*, 1985), ben distinguendosi quindi dalla risposta dei geni "immediate-early". Entrambe le classi di geni sono silenti e non trascritte in cellule in G₀, ma sono indotti ad alti livelli quando si aggiunge al mezzo un fattore di crescita. Altra differenza sostanziale tra le due classi di geni è che mentre l'attivazione del primo gruppo non produce necessariamente la risposta delle neurotrfine, l'induzione dei geni "delayed early" come *vgf* in specifici tipi cellulari, è neurotrofina specifica.

Peraltro, anche altri fattori o eventi sono capaci di stimolare una rapida risposta nelle PC12 con differenziazione neuronale e induzione di VGF, tra questi: basic fibroblast growth factor (bFGF) (Miyatake *et al.*, 1993), interleukin 6 (IL-6), c-AMP, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), epidermal growth factor (EGF), insulina, e depolarizzazione cellulare (Salton *et al.*, 1991, Possenti *et al.*, 1992, Hawley *et al.*, 1992). Tuttavia, questi stimoli sembrano produrre un incremento di VGF di 5-10 volte rispetto ai valori basali, quindi nettamente inferiore rispetto all'induzione da NGF con differenti effetti sulla trascrizione di VGF e sulla stabilità del suo mRNA.

1.2. Il Gene “*vgf*” e la sua struttura

Nell'uomo il gene “*vgf*” è presente in singola copia (Salton et al., 1991) ed è mappato sul cromosoma 7q22 (Canu et al., 1997), nel topo sul cromosoma 5 (Hahm et al., 1999). La regione codificante è composta da un solo esone, un introne è situato in posizione 5' (Salton et al., 1991; Hawley et al., 1992, Possenti et al., 1992) ma non risulta coinvolgere la porzione codificante. Per quanto la presente dissertazione si focalizzi su aspetti post-traduzionali, piuttosto che di regolazione e modulazione trascrizionale, segue qui un breve resoconto relativo al promotore di “*vgf*”, il quale contiene:

- ❖ una sequenza TATAA in posizione -32
- ❖ una regione palindroma di 14 pb in posizione -80 (CRE) sito di induzione attraverso c-AMP e legame del fattore di trascrizione CREB
- ❖ diversi siti di legame SPI e AP-2
- ❖ una regione palindroma di 13 paia di basi a -140 che contiene una sequenza CCAAT.
- ❖ due gruppi di piccole sequenze ripetute TTCA
- ❖ una regione silente a -400
- ❖ una sequenza ATTTA destabilizzante mRNA.

Sia la sequenza CCAAT che la regione palindroma da 14 paia di basi risultano importanti per l'induzione da NGF, infatti, come le neurotrofine in genere, esso induce la fosforilazione del fattore di trascrizione CREB in un sito chiave

(Ser133), attivando selettivamente la risposta di geni tardivi come *vgf* (Bonni *et al.* 1995). Inoltre un altro sito di legame G(S)G tra la sequenza TATAA e il sito di inizio della trascrizione sembra fondamentale per l'induzione da NGF ma non da c-AMP. Infine la sequenza destabilizzante potrebbe essere correlata con la riduzione di mRNA per VGF vista dopo lunga stimolazione da NGF (Baybis and Salton., 1992).

1.3. Sequenza primaria del precursore proVGF

Il sequenziamento del gene *vgf* ha rivelato che esso codifica per un prodotto primario del peso molecolare misurato in Western Blot di circa 90kDa (Possenti *et al.*, 1989). Il prodotto, detto "proVGF" (Fig. 1), è costituito da 617 amminoacidi nel ratto/topo (Salton *et al.* 1991) e 615 nell'uomo. Le sequenze delle due specie nelle quali è stato sequenziato in modo completo mostrano un'omologia dell'85%.

Sulla base della sua sequenza primaria, proVGF non risulta presentare analogie di sequenza con altri prodotti noti: ciò conferma la peculiarità del prodotto, che potrebbe quindi rappresentare il precursore di una nuova famiglia di peptidi.

Di seguito descriviamo alcune caratteristiche note del gene degne di nota:

- ❖ una sequenza leader di 22 amminoacidi con una regione idrofobica nella regione amminotermine, che promuove la traslocazione all'interno del reticolo endoplasmatico (REF).

❖ numerosi stretches contenenti due o più residui amminoacidici basici, essi rappresentano potenziali siti di clivaggio proteolitico ad opera di specifici enzimi di processazione quali le proteasi tripsino-simili.

❖ tra i suddetti siti, inoltre, uno (**Ala-Gly-Arg-Arg**, o **AGRR**) mostra una glicina immediatamente a monte di un sito di potenziale clivaggio: tale sequenza è suggestiva della possibile produzione di un peptide amidato al suo C-termino. Come noto, una larga parte dei peptidi ormonali e neuropeptidi bioattivi presenta amidazione al suo C-termino, tanto che la messa a punto di uno specifico approccio all'isolamento di peptidi amidati al C-termino (Tatemoto and Mutt, 1980) consentì nei primi anni 80 la scoperta di numerosi peptidi di grande importanza, quali NPY, PYY ed altri.

❖ alto contenuto di prolina (11%), una caratteristica in qualche modo accomunabile a quanto riscontrato in altre classi di proteine neuroendocrine quali le cromogranine, famiglia di polipeptidi acidi, altamente idrofilici.

❖ alto contenuto di acido aspartico (14%) e glutammico in un ristretta zona della molecola che conferiscono acidità al dominio.

Riportiamo di seguito anche l'intera sequenza primaria del neuro-peptide in oggetto, per rendere più visibile i potenziali siti di taglio (R, R-R o K-R) ivi presenti. La sequenza primaria di VGF contiene almeno dieci di questi probabili siti di clivaggio che risultano completamente conservati dal punto di vista filogenetico tra le sequenze di ratto, di topo, ed umana (Salton *et al.*, 1991, Possenti *et al.*, 1989, Van den Pol *et al.*, 1989).

Fig.1: VGF RAT sequence from: Salton SRJ; J Neurochem 1991; 57: 991-996 versus VGF HUMAN sequence from: (Waterstone)

RAT	MKTFTLPASV	LFCFLLLRG	LGAAPPGRSD	VYPPPLGSEH	NGQVAEDAVS	50
HUM	--ALR-S--A	--_----N--	-----PE	AQ----S---	KEP--G---P	49
RAT	RPKDDSVPEV	RAARNSEPQD	QGELFQGVDP	RALAAVLLQA	LDRPASPPAV	100
HUM	G---G-A---	-G-----	E-----	-----	-----_	98
RAT	PAGSQQGTPE	EAAEALLTES	VRSQTHSLPA	SEIQASAVAP	PRPQTQDNDP	150
HUM	-S-----PE-	-----T	-----	PESPEP-_-	-----PE-G-	147
RAT	EADDRSEELE	ALASLLQELR	DFSPSNAKRQ	QETAAAEETET	RTHTLTRVNL	200
HUM	--S-P-----	-----	----S----	-----	-----	197
RAT	ESPGPERVWR	ASWGEFQARV	PERAPLPPSV	PSQFQARMSE	NVPLPETHQF	250
HUM	-----	-----	-----PA	-----PD	SG-----K-	247
RAT	GEGVSSPKTH	LGETLTPLSK	AYQSLAPFP	KVRRLEGSFL	GGSEAGERLL	300
HUM	-----	---A-A----	---GVA----	-A--P-SAL-	-----	297
RAT	QOGLAQVEAG	RRQAEATRQA	AAQEERLADL	ASDLLLQYLL	QGGARQDLG	350
HUM	-----	-----	-----	-----	-----G--	347
RAT	GRGLQETQQE	RENER_EEEAE	QERRGGGEDE	VGEEDEEAAE	AEAEAEAAER	400
HUM	-----AAE-	--SA-E-----	-----E-_R	-----	-----	398
RAT	ARQNALLFAE	EEDGEAGAED	KRSQEEAPGH	RRKDAEGTEE	GGEEDDDEE	450
HUM	-----	-----	-----T--	---E-----	---E_-----	447
RAT	MDPQTIDSLI	ELSTKLHLPA	DDVVSIEEV	EEKRRKKNA	PPEPVPPRA	500
HUM	-----	-----	-----	-----	-----	497
RAT	APAPTHVRSP	QPPPPAP_A_RD	ELPDWNEVLP	PWDREEDEVF	PPGPYHPFPN	550
HUM	-----	-----APA--	-----	-----Y	-----	548
RAT	YI ^{RR} TLQPP	ASS ^{RRR} HFHH	ALPPARHHPD	LEAQA ^{RR} AE	EADAE ^{RR} LQ	600
HUM	-----	SAL----Y--	----S--Y-G	R-----	--E-----	599
RAT	EQEELNYIE	HVLLHRP	617			
HUM	-----	----R--	615			

Studi condotti sul cervello di ratto hanno, a tale proposito, dimostrato il ruolo di specifiche endoproteasi (PC1/3, PC2) in rapporto a proVGF, suggerendo che possano essere responsabili della processazione di questa proteina in frammenti di più piccolo peso molecolare (Trani *et al.*,2002). Anche questo dato suggerisce la processazione enzimatica di proVGF in uno o più frammenti, ed evidenzia l'importanza di un'attenta analisi della sequenza aminoacidica primaria, quale base per lo studio dei prodotti peptidici tissutali e/o liberati e circolanti.

Pur in assenza di analogie di sequenza, la proteina VGF è spesso associata alla famiglia delle cromogranine-secretogranine, una famiglia di polipeptidi generalmente acidi (Winkler and Fischer-Colbrie, 1992), per alcuni dei quali (cromogranina A) è dimostrato un ruolo diretto nella formazione di granuli secretori. VGF e le cromogranine hanno in comune, non solo la simile localizzazione selettiva in granuli secretori neuro-endocrini, ma anche una notevole processazione post-traduzionale con esito in peptidi che si sono man mano rivelati dotati di attività biologica regolatoria (Anh *et al.*,1987). Tra questi, la pancreostatina, parastatina, ed altri, i quali sembrerebbero coinvolti come modulatori metabolici e delle secrezioni endocrine (Gonzalez *et al.*,2003).

1.4 Espressione e localizzazione selettiva neuro-endocrina

L'immunolocalizzazione accertata fino ad oggi di VGF e dei suoi prodotti è altamente selettiva per neuroni del SNC e periferico e per cellule di origine neuroendocrina, specifica per organo, nonché per tipo cellulare (Van den Pol *et al.*, 1989; Salton *et al.*, 1991; Ferri *et al.*, 1992). Nel sistema nervoso centrale immunoreattività per VGF è stata riscontrata in varie aree della corteccia cerebrale, nel bulbo olfattivo, nel nucleo caudato e nell'ippocampo (Van den Pol *et al.*, 1994). Inoltre VGF è stato visto anche nelle cellule del Purkinje del cervelletto, nel nervo vago e all'interno di motoneuroni delle corna ventrali e dorsali del midollo spinale (Ferri *et al.*, 1992; Salton *et al.*, 2000). Per quanto concerne la regione ipotalamica è stata evidenziata una discreta densità di neuroni contenenti VGF nei nuclei paraventricolare, sopraottico ed arcuato, con elevata espressione anche nel nucleo soprachiasmatico e nella regione tuberomamillare soprattutto nella regione ventrale laterale (Erikson *et al.*, 1987; Inagaki *et al.*, 1990). Una certa quantità di assoni di passaggio sono osservati nella zona interna dell'eminenza mediana, in relazione al transito di pathways da alcuni nuclei ipotalamici (paraventricolare e sopraottico), notoriamente connessi al controllo del bilancio osmotico e diretti all'ipofisi posteriore. La localizzazione di numerose terminazioni nervose VGF-immunoreattive anche nella zona esterna all'eminenza mediana che secreta fattori di rilascio ipotalamici, ci consente di ipotizzare un coinvolgimento di VGF nella

regolazione ipotalamica dell'ipofisi. A sua volta anche l'ipofisi ha mostrato una ampia positività per il neuropeptide in esame, in questa ghiandola VGF è stata, infatti, riscontrata durante lo sviluppo del ratto (Snyder *et al.*, 2003), mentre nell'adulto appare ampiamente localizzata in cellule gonadotrope nel ratto femmina, con espressione anche in cellule lattotrope in rapporto ai vari momenti del ciclo estrale nella pecora (Ferri *et al.*, 1995; Brancia *et al.*, 2005).

L'uso di anticorpi sviluppati più di recente e diretti contro peptidi clivati derivati da pro-VGF, identificati nel cervello (Trani *et al.*, 2002) ha mostrato localizzazioni differenziali tra diverse popolazioni ormone-secernenti dell'ipofisi per frammenti diversi. Nel sistema nervoso periferico, immunoreattività per VGF è stata abbondantemente riscontrata in neuroni sensitivi primari dei gangli spinali e trigeminali, nella colonna intermedio laterale a livello toraco-lombare, nonché in neuroni simpatici dei gangli para- e pre-vertebrali ed altri dell'innervazione autonoma efferente (NEF-Laboratory, dati non pubblicati).

Per quanto riguarda la localizzazione in cellule endocrine, VGF è stata ritrovata in numerosi organi, sia in ghiandole endocrine che in organi contenenti sotto-popolazioni endocrine. Immunoreattività per VGF è presente in varie popolazioni endocrine del tubo digerente (Ferri *et al.*, 1992), sino ad oggi ben poco caratterizzate. Nelle isole pancreatiche immunoreattività per la porzione C-terminale di VGF è stata sino ad oggi dimostrata nel ratto, in cellule ad insulina ed in relative linee tumorali (Possenti *et al.*, 1999).

Infine VGF è stato localizzato nel surrene di ratto mediante l'uso di un anticorpo che intercetta i residui aminoacidici dal 443 al 588 di VGF (Ferri *et al.* 1992). Lo stesso anticorpo ha colorato anche la midollare di bovino, pecora,

cavallo e maiale, pur non avendo trovato successivamente in questa ghiandola, nessuna evidenza sperimentale sulla presenza di forme clivate di VGF.

1.5 Il precursore proVGF e i suoi prodotti

Come menzionato in precedenza, la proteina VGF presenta numerose coppie di aminoacidi basici e siti mono-basici, che rappresentano siti di potenziale clivaggio ad opera di convertasi specifiche. Nel corso degli ultimi anni numerosi studi hanno portato all'identificazione e all'isolamento di differenti frammenti di VGF in tessuti neuroendocrini. Strumento fondamentale per vagliare la presenza di frammenti piccoli derivati da pro-VGF è stata la produzione di specifici anticorpi diretti contro ristretti segmenti aminoacidici all'interno della sequenza primaria di proVGF. Tra questi, un anticorpo contro l'estremo C-terminale della proteina (sequenza di ratto/topo) ha rivelato la presenza oltre che di un polipeptide ad alto peso molecolare (90kDa), riconducibile all'intera proteina, la presenza di peptidi più piccoli (di circa 20kDa e 10kDa) in omogenati di cervello come in estratti di colture primarie di granuli cerebellari, tessuti endocrini (linee cellulari ipofisarie ed ipotalamiche) e linee cellulari pancreatiche (Possenti *et al.*, 1999, Trani *et al.*, 1995). Questa regione C-terminale di pro-VGF è caratterizzata dalla notevole conservazione tra le specie da cui il gene è stato sequenziato. In particolare, si osserva una singola sostituzione aminoacidica in posizione -3, dove nell'umano si trova una arginina (Arg₆₁₃), nel ratto e nel topo un residuo di istidina (His₆₁₅) (Salton *et al.*, 2000). Ancora, usando il suddetto anticorpo prodotto contro la porzione C-

terminale di VGF e con l'aiuto della spettrometria di massa, sono stati identificati, isolati e sequenziati a partire da estratti di cervello di ratto vari peptidi di basso peso molecolare. Almeno alcuni di tali peptidi risultano essere prodotti in seguito a clivaggio di un inusuale, specifico sito, alla sequenza: "rat proVGF Arg₅₅₃-Pro₅₅₄-Arg₅₅₅" (ed identica sequenza in proVGF umana, o di topo), dominio collocato in sede relativamente prossima al C-termino di proVGF, precisamente a circa 60 residui amino acidici (Trani *et al.*, 2002). Un peptide ottenibile per clivaggio al suddetto sito "Arg-Pro-Arg" fu isolato dal cervello di ratto, e denominato "**TLQP peptide21**" poiché inizia al suo N-termino con la sequenza "TLQP" (Thr-Leu-Gln-Pro), ed è composto in totale da 21 residui aminoacidici. Esso è risultato biologicamente attivo sulla muscolare dello stomaco di ratto determinandone la contrazione (Possenti *et al.*, 1999). Recentemente, il medesimo peptide iniettato intracerebroventricolarmente nel topo ha indotto l'aumento del dispendio energetico, associato ad aumento dei livelli di adrenalina sierica (Bartolomucci *et al.*, 2006).

Molteplici frammenti prossimi all'N-termino di proVGF che sono stati identificati nel liquor cerebrospinale umano (Stark *et al.*, 2001). Alcuni tra essi risultano sorprendentemente alterati o ridotti in pazienti affetti da morbo di Alzheimer (Carrette *et al.*, 2003). Quest'ultimo riscontro è di particolare rilievo perché suggerisce la possibilità che tra i numerosi prodotti di proVGF che man mano si identificano e quelli ancora non caratterizzati ve ne possano essere alcuni dal ruolo o attività biologica "alternativa".

In rapporto alla sequenza del gene umano, ormai vari anni or sono la ricerca di nuovi fattori liberatori di prolattina portò all'isolamento e sequenziamento

dall'ipofisi posteriore bovina di quello che fu denominato “peptide V”. La sequenza del “peptide V” risultava già allora altamente omologa a quella della porzione C-terminale di proVGF del ratto, con 28 aminoacidi identici su 30 (Liu *et al.*, 1994). A frustrazione degli Autori, detto peptide risultò del tutto privo di attività sulla liberazione di prolattina. Per converso, il suo isolamento in parallelo al successivo sequenziamento del gene *vGF* umano non solo indica come la sequenza bovina in tale porzione di proVGF sia identica a quella umana, ma identifica tale peptide come un naturale prodotto di clivaggio di VGF esistente e verosimilmente liberato *in vivo*.

1.6 Trasporto, processazione e release

La proteina VGF è contenuta nei compartimenti cellulari costituiti da granuli secretori definiti a “dense core” di grande e medio diametro, come dimostrato da tempo con l'ausilio di tecniche di arricchimento e purificazione di granuli (Possenti *et al.*, 1989) e microscopia elettronica (Ferri *et al.*, 1995). La sequenza leader trovata al suo estremo N-terminale, provvede alla traslocazione della proteina di nuova sintesi all'interno del reticolo endoplasmatico. In generale, dopo il passaggio nel Golgi, il normale default dei prodotti cellulari prevede che le differenti molecole vengano trasportate in un sistema post-Golgi, da cui potranno prendere strade diverse. Alcune andranno alle vescicole lisosomiali, altre saranno secrete attraverso la via costitutiva e altre ancora prenderanno parte alla formazione di

granuli di secrezione che si accumulano in prossimità della membrana citoplasmatica o nei neuroni presso le terminazioni.

ProVGF viene secreta attraverso la via regolata come dimostrato nelle linee cellulari PC12 e in colture primarie neuronali nei granuli del cervelletto (Trani *et al.*, 1993). La secrezione di VGF o meglio ancora, dei suoi frammenti di minor peso molecolare può avvenire in risposta a depolarizzazione della membrana cellulare indotta da alti livelli di potassio o in seguito ad aumento di ioni Ca^{++} liberi, come pure in risposta ad agonisti colinergici (Possenti *et al.*, 1989).

1.7 Verso la funzione: ipotesi di attività biologiche

Sulla base della struttura del gene, della sequenza polipeptidica, della distribuzione cellulare e tissutale, della sua localizzazione intracellulare e del suo rilascio, potrebbero essere proposti alcuni differenti modelli ipotetici, utili a delineare possibili ruoli del prodotto genico proVGF e/o dei peptidi che ne derivano.

La presenza di numerosi residui aminoacidici basici nella sequenza primaria, ipotetici siti di clivaggio, l'isolamento di un peptide di 30 amminoacidi corrispondente alla porzione C-terminale di VGF dall'ipofisi bovina (Liu *et al.*, 1994), ed il più recente riconoscimento di vari frammenti di proVGF in diversi tessuti presenti nel sistema nervoso centrale e periferico, come in quello neuro-endocrino (Ferri *et al.*, 1996; Trani *et al.*, 1995), convergono a suggerire che proVGF possa fungere da "precursore polifunzionale", i cui prodotti post-

traduzionali di piccolo peso molecolare, potrebbero svolgere attività biologiche di vario tipo. Per esempio, gli studi svolti recentemente su topi trattati con iniezioni intracerebroventricolari del peptide VGF derivato “**TLQP peptide 21**” hanno dimostrato che questo frammento di VGF attiva il consumo di energia contemporaneamente ad aumentare i livelli sierici di adrenalina (Bartolomucci *et al.*, 2006). Interessante a tale proposito è anche l'aumento dei livelli dell'mRNA di VGF riscontrato nel nucleo arcuato, in risposta al digiuno, con modulazioni in neuroni NPY e POMC (Hahm *et al.*, 1999; Hahm *et al.*, 2002). Tale regione, infatti, contiene specifici, differenti sistemi neuronali caratterizzati dal loro contenuto di neuropeptidi che incrementano l'assunzione di cibo (NPY, AGRP), ovvero che la riducono (alfa-MSH). Questi studi suggeriscono che VGF e i suoi prodotti possano essere fattori importanti nella modulazione del comportamento alimentare e/o delle sue conseguenze metaboliche, regolando assunzione del cibo, bilancio energetico e metabolismo. Infatti, topi knock out per il gene di VGF risultano magri, ipermetabolici, iperattivi e risultano avere ridotti livelli di Leptina anche dopo alimentazione (Hahm *et al.*, 1999). Inoltre, i medesimi topi sono resistenti ad obesità indotta da dieta ipercalorica come da trattamento con sostanze tossiche (tioglucosio) che in topi normali causa iperfagia ed obesità (Hahm *et al.*, 2002).

Studi recenti hanno inoltre rilevato la possibile importanza di VGF anche per quanto riguarda la funzione erettile dei ratti. Infatti l'iniezione di cinque peptidi derivati dalla **porzione C-terminale** del pro VGF nel nucleo paraventricolare di ratto, ha indotto erezione in maniera dose-dipendente facendo supporre che all'interno di questo nucleo i peptidi derivati da proVGF potrebbero influenzare la funzione sessuale attraverso l'attivazione di neuroni contenenti ossitocina (Succu

et al., 2003). In tale ipotesi, una volta secreti diversi peptidi derivati da VGF potrebbero attivare cellule limitrofe o lontane, tramite interazione con recettori di membrana e conseguente liberazione di secondi messaggeri e cascata del segnale intracellulare (Salton *et al.*, 2000).

In considerazione della localizzazione all'interno di vescicole del tipo "dense core", non si può escludere un ruolo di VGF o dei suoi frammenti, nella formazione stessa delle vescicole intracellulari, ovvero nell'induzione, processazione e/o liberazione di altri neuropeptidi o fattori contenuti negli stessi granuli (Salton *et al.*, 2000). Ad esempio, un altro peptide neuroendocrino denominato 7B2 (Mbikay M. *et al.*, 2001) è risultato cruciale sia per l'attivazione che per l'inibizione di proconvertasi PC2.

1.8 Regolazione dei livelli di VGF mRNA e dei prodotti di VGF

Abbiamo visto come immunoreattività per VGF e/o suoi frammenti siano ampiamente localizzati in diverse popolazioni neuronali a livello del sistema nervoso centrale e periferico. Inoltre, si è potuta dimostrare una sua modulazione in risposta a taluni stimoli e/o differenti condizioni fisiologiche.

Infatti studi fatti sul sistema nervoso centrale del ratto hanno rivelato che l'espressione di VGF aumenta con lo sviluppo dell'animale in numerose strutture del cervello come nuclei ipotalamici, amigdala, corteccia, specie in correlazione con fasi essenziali della sinaptogenesi nel sistema visivo (Lombardo *et al.*, 1995). L'espressione di VGF nell'ippocampo è indotta rapidamente in un modello di "long

term potentiation” (LTP: Hevroni *et al.*, 1998), dall’attività neuronale (Lombardo *et al.*, 1995; Snyder *et al.*, 1998) e da stimolazione correlata alla luce (Wisor *et al.*, 1997). Nell’adulto, l’espressione di VGF nell’ipotalamo è fortemente influenzata da variazioni ormonali correlate all’allattamento (Mahata *et al.*, 1993), oppure in conseguenza a lesioni neurotossiche delle vie colinergiche setto-ippocampali (Mahata *et al.*, 1993).

Di particolare interesse è l’aumento dei livelli di VGF mRNA nel nucleo arcuato in condizioni di digiuno prolungato, con modulazioni differenziali nelle due diverse popolazioni di neuroni contenenti neuropeptide Tiroxina (NPY) ed alpha-MSH (marcati per mRNA del relativo precursore pro-opiomelanocortina) (Hahm *et al.*, 1999; Hahm *et al.*, 2002). Anche i risultati di questi studi suggeriscono un ruolo di VGF nella modulazione del bilancio energetico, assunzione di cibo, dispendio energetico e metabolismo.

In qualche modo correlabile è il riscontro di una rapida induzione di VGF mRNA in neuroni del nucleo del tratto solitario e nel nucleo motore dorsale del vago, in risposta a stimoli nocivi sulla parete gastrica (Kanemasa *et al.*, 1995). Anche tale esperimento sembra identificare un coinvolgimento di VGF nell’adattamento a mutate circostanze metaboliche, omeostatiche o anche di difesa. Tali nuclei costituiscono infatti terminazione ed origine, rispettivamente, della componente periferica di sistemi afferenti ed efferenti coinvolti nella regolazione della secrezione e della motilità gastrica, nonché nella difesa della mucosa.

Quelli sopra citati sono esempi di modulazione dei livelli dell’mRNA di VGF, ma la modulazione di questo neuropeptide, per essere descritta con completezza

deve anche essere analizzata nelle fasi più tardive del controllo traduzionale e post-traduzionale. Infatti, in letteratura si descrive spesso la formazione di frammenti di VGF dal precursore. La presenza di numerosi residui aminoacidici basici nella sequenza primaria, ipotetici siti di clivaggio, l'isolamento di un peptide di 30 aminoacidi corrispondente alla porzione C-terminale di VGF dall'ipofisi bovina (Liu *et al.*, 1994) e il più recente riconoscimento di vari frammenti di proVGF in diversi tessuti presenti nel sistema nervoso centrale e periferico, come in quello neuro-endocrino (Ferri *et al.*, 1996) convergono a suggerire che proVGF possa fungere da "precursore polifunzionale", i cui prodotti post-traduzionali di piccolo peso molecolare, potrebbero svolgere attività biologiche di vario tipo. Nell'ipotesi che VGF sia processato, accumulato in granuli secretori e rilasciato in seguito a depolarizzazione (o altri stimoli), è stato utilizzato il metabolita fungino brefeldina A, quest'ultima, infatti, interrompe il trasporto vettoriale delle proteine verso la superficie cellulare. L'uso di quest'artificio in colture di granuli cerebellari, ha indotto un accumulo di VGF ad alto peso molecolare (non processato) nei pericari, associata a progressiva degranulazione di assoni e terminali, nei quali sono preferenzialmente trasportate le forme clivate in attesa di release (Trani *et al.*, 1995). Infine per quanto riguarda l'ipofisi del ratto, VGF peptidi C-terminali sono abbondanti nella femmina e assai poco rappresentati nel maschio. Una drastica degranulazione di VGF è stata riscontrata in dette cellule gonadotrope la mattina successiva al picco estrale, in parallelo ad incremento di mRNA. In entrambi i sessi VGF si accumula in cellule gonadotrope in risposta a gonadectomia (Ferri *et al.*, 1995). Ad ulteriore indicazione di un coinvolgimento di VGF nella regolazione delle

cellule gonadotrope, mRNA per LH ed FSH risultarono ridotti in topi knock-out per il gene “*vgf*” sia nei maschi, che nelle femmine.

1.9 Cenni di anatomia del SURRENE

Le due ghiandole surrenali, poste in regione addominale al lato della colonna vertebrale a contatto della parte superiore di ciascun rene. Hanno una forma piramidale, con la base posta inferiormente. Nell'adulto raggiungono le dimensioni di 3 cm in altezza, 4-5 cm in lunghezza e 0,5-1 cm in spessore. Hanno un peso di circa 9 grammi, nell'uomo. Il surrene sinistro anteriormente è in rapporto con la borsa omentale e attraverso di essa con la faccia posteriore dello stomaco, nel margine mediale è in rapporto con la faccia posteriore dello stomaco e con l'aorta; quello destro è in rapporto con la faccia viscerale del fegato, nel margine mediale è in rapporto con la faccia viscerale del fegato e con la vena cava inferiore. Entrambe le surrenali sono in rapporto con l'ultima vertebra toracica e la prima lombare e con il diaframma. Le singole ghiandole sono avvolte da una sottile capsula che a volte può essere fusa con la capsula renale o, a destra, epatica. In questa capsula si ramificano i vasi provenienti dalle tre arterie surrenaliche, prima di approfondarsi nel parenchima in una ampia e complessa rete sinusoidale.

La ghiandola è costituita da due parti distinte: la più esterna è quella corticale, di colore giallastro e dedicata alla produzione e liberazione di vari ormoni steroidi. La porzione più interna è detta midollare, ha colorito bruno-nerastro, e le sue

cellule producono catecolamine, nonché vari peptidi. Nel corso della gravidanza aumentano sia di volume che di peso, a causa di un maggiore sviluppo della parte corticale. La Foto 1A mostra una visione panoramica del surrene, di cui è riconoscibile la capsula (a destra), la regione corticale (al centro) e la midollare (a sinistra). Il parenchima della corticale è suddivisibile in tre regioni, dove i cordoni ghiandolari assumono forma differente: la regione più esterna prende il nome di zona glomerulare e i cordoni sono ripiegati a formare dei gomitoli. Questa zona è poco spessa e secerne ormoni mineralcorticoidi come l'aldosterone, dietro lo stimolo dell'angiotensina II e della concentrazione ematica di potassio, i cui effetti si esplicano sul tubulo renale. La Foto 1B mostra per l'appunto un ingrandimento della zona glomerulare. Al di sotto si trova la zona fascicolata, più ampia, formata da cordoni che discendono rettilinei e paralleli tra loro. Questi secernono ormoni glicocorticoidi, come il cortisolo, importante per il metabolismo dei carboidrati ma anche potente anti-infiammatorio naturale, riducendo in circolo il numero e la funzionalità linfocitaria, essenziale nell'insieme del cosiddetto "asse ipotalamo-ipofisi-surrene" nelle reazioni ed adattamento a circostanze di stress fisico. La Foto 1C mostra la zona fascicolata, compresa tra la glomerulare (in alto) e la reticolare (in basso). La zona più interna della corticale è detta reticolare, formata da cordoni ramificati, tortuosi e anastomizzanti tra loro. Le cellule di questa sottile regione sono in grado di secernere ormoni sessuali. Osservazioni più recenti portano a credere che non vi sia una distinzione così netta, da un punto di vista funzionale, tra zona fascicolata e reticolare e che entrambe siano in grado di produrre sia ormoni corticosteroidi che sessuali. Inoltre, entrambe possono contenere riserve di acido ascorbico (vitamina C). La Foto 1D mostra la zona reticolare, al centro, tra

la fascicolata (in alto) e la midollare del surrene (in basso). Le cellule della zona corticale sono poliedriche, ricche di organuli citoplasmatici e di vacuoli lipidici ma povere di granuli.

La midollare del surrene è la zona più interna avvolta quasi completamente dalla corticale, tranne che in corrispondenza dell'ilo dell'organo. Contiene grandi cellule poliedriche, dette feocromociti, che derivano dalla cresta neurale e sono ricche di granuli di secrezione. Tali granuli contengono catecolamine (adrenalina o noradrenalina) la cui catena biosintetica è descritta nella **Fig. 2** sotto riportata.

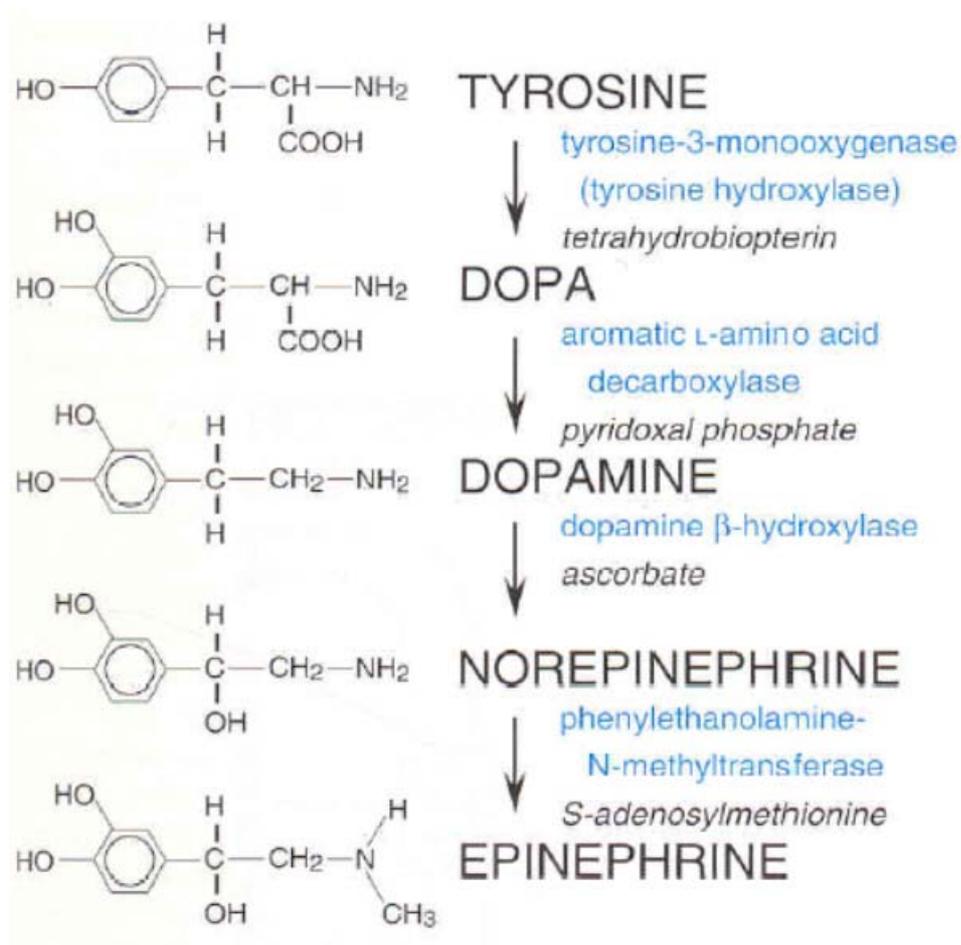


Fig. 2: Catena biosintetica delle catecholamine.

Le catecolamine vengono immesse in circolo per esplicare una azione sistemica sotto lo stimolo del sistema nervoso simpatico. I feocromociti sono derivati da precursori di cellule gangliari ortosimpatiche, che sottoposte all'afflusso di elevate concentrazioni di steroidi provenienti dalla corticale, hanno mantenuto un fenotipo epitelioido, nonché la capacità di sintetizzare e secernere adrenalina altrove assente nel sistema nervoso periferico. Queste cellule si presentano sia isolate che in piccoli gruppi, che in cordoni l'una addossata all'altra. Per quanto riguarda gli effetti degli ormoni della midollare del surrene, questi ultimi sono importanti per il mantenimento dell'omeostasi generale dell'organismo e per il controllo delle reazioni dell'organismo in situazioni di stress. La noradrenalina determina aumento della pressione sanguigna (arteriosa) mediante vasocostrizione periferica (effetto visibile: il pallore), mentre l'adrenalina induce tachicardia, iperventilazione polmonare, orripilazione, aumento della sudorazione, contrazione della muscolatura liscia dei visceri ed altri fenomeni.

La Foto 1 E mostra un ingrandimento della midollare. Le cellule possono assumere una tintorialità differente, da più scure a più chiare, a seconda del loro stato funzionale. I sinusoidi della zona corticale si continuano nella midollare, trasportandovi glicocorticoidi e altri precursori necessari per la sintesi ormonale.

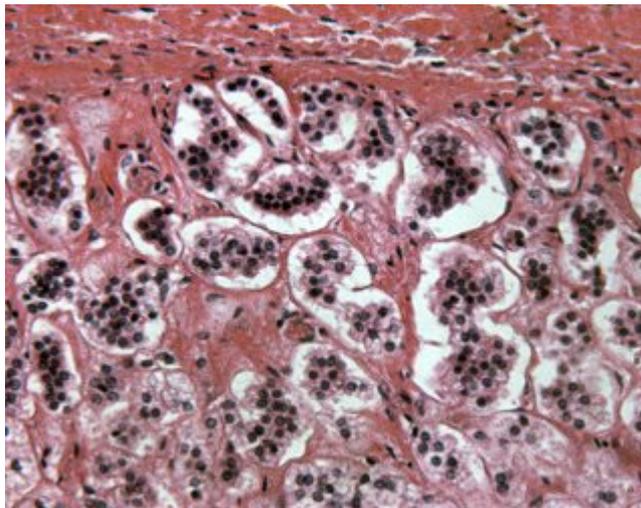
Questa particolare circolazione che porta i prodotti della corticale verso la midollare e poi all'esterno ha anche il compito di indurre il fenotipo adrenergico della midollare. Pur tuttavia, nella midollare è presente anche una seconda rete sinusoidale, che nasce da arteriole che perforano la corticale senza emanare capillari, prima di aver raggiunto la midollare. Questi vasi, verosimilmente apportano sangue con caratteristiche di maggiore ossigenazione.

Il surrene presenta una rete linfatica pericapsulare ed una midollare, che confluiscono verso i linfatici che escono dall'organo assieme alla vena surrenalica. Infine, mentre le lesioni ipofunzionanti della midollare del surrene possono non determinare una sintomatologia precisa, le patologie con difetto funzionale grave della corticale sono generalmente associate a quadri di significativa espressione e penetranza clinica.

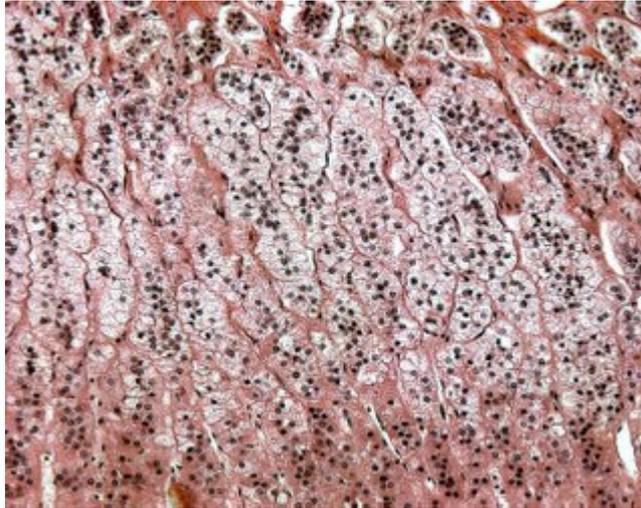
Foto1



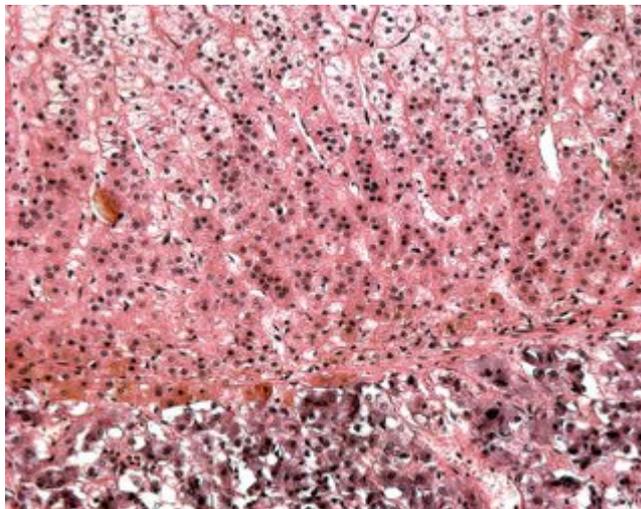
A: visione panoramica del surrene, di cui è riconoscibile sia la zona corticale (esterna) che quella midollare (interna).



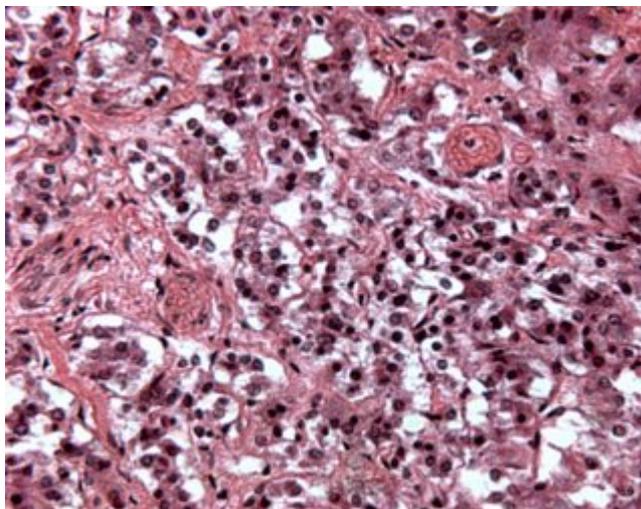
B: ingrandimento della zona glomerulare della corticale del surrene.



C: ingrandimento della zona fascicolata, compresa tra la glomerulare (in alto) e la reticolare (in basso).



D: zona reticolare, al centro, tra la fascicolata (in alto) e la midollare del surrene (in basso).



E: ingrandimento della midollare del surrene.

2 SCOPO DELLA RICERCA

2.1 Regolazione, modulazione e release di VGF-peptidi da organi e tessuti: la necessità di approcci quantitativi

Le evidenze sperimentali accumulate nel tempo sul coinvolgimento di VGF in processi di regolazione di omeostasi e metabolismo, e le molteplici localizzazioni di questo peptide in svariate sedi neuro-endocrine, ci hanno spinti ad investigare espressione, biosintesi e processazione di VGF e dei suoi peptidi derivati all'interno del surrene. Ciò in diverse specie animali, in particolare Bovino e Suino, anche in rapporto con le note similitudini di sequenza in tali specie con quella di proVGF umano (vedi parti precedenti). Ci siamo interessati al surrene, inoltre, perché il gene "*vgf*" medesimo fu scoperto proprio in cellule PC12 derivate da un tumore della midollare surrenale di ratto (feocromocitoma). Al contrario di quanto ci si potrebbe aspettare, fine localizzazione e possibile processazione differenziale "*in vivo*" di proVGF proprio in tale ghiandola sono state scarsamente indagate. Infatti, i pochi dati pubblicati sull'argomento descrivono livelli dell'mRNA di VGF nel surrene di ratto "abbondanti nelle prime fasi di vita neonatale, poi inferiori" (Salton *et al.*, 1991), ed appena rilevabili nel ratto adulto (Ferri *et al.*, 1992). Per quanto riguarda proVGF e suoi frammenti, analisi di western blot su estratti di cellule PC12 trattate con NGF mostrarono la presenza di piccoli frammenti (~10KDa), mentre

nelle stesse cellule non trattate con NGF non furono trovati frammenti simili, ma soltanto forme di ~70Kda, e risultati analoghi furono infine ottenuti dalla ghiandola "in vivo" (Trani *et al.*, 1995).

Del tutto recentemente, l'attenzione si è focalizzata su uno specifico frammento di proVGF denominato "**TLQP-21**": esso infatti, quando somministrato in sede intra-cerebro-ventricolare nel topo, stimolò significativamente in aumento il dispendio energetico, in rapporto ad un aumento da esso provocato dei livelli sierici di adrenalina (Bartolomucci *et al.*, 2006). Ben si comprende quindi il potenziale interesse di forme e frammenti di VGF-peptidi presenti specificamente nelle sottopopolazioni endocrine della midollare surrenale medesima.

Nell'insieme, quindi, il nostro obiettivo è stato quello di delineare la distribuzione intra-terssutale di VGF-peptidi nel surrene di varie specie, ed in parallelo di misurarne i livelli tissutali e delinearne le forme molecolari. Ciò, comprensibilmente, quale potenziale avvio a studi di modulazione da stimolo, nonché di release anche in circolo.

Per indirizzarci a rispondere a questi quesiti, abbiamo prima delineato quadri "di base" di localizzazione, anche differenziale, di VGF-peptidi con metodi immunoistochimici ed opportuni anticorpi regione-specifici contro proVGF (vedi in dettaglio più oltre). In parallelo, abbiamo avviato lo sviluppo di vari saggi immunochimici, con intendimenti quantitativi, per poter analizzare alcune differenti regioni di proVGF. In base a quanto sopra discusso della sequenza primaria di proVGF, abbiamo dato priorità a sequenze adiacenti putativi e/o dimostrati siti di clivaggio (o clivaggio-amidazione) del precursore proVGF, con l'obiettivo di poter saggiare specificamente prodotti di processazione post-traduzionale. In particolare,

abbiamo utilizzato anticorpi contro l'estremo C-terminale di proVGF, costruendo due saggi con gli anticorpi prodotti contro il decapeptide C-terminale, rispettivamente della sequenza di ratto e di quella umana. Inoltre, un saggio per i frammenti derivabili dal taglio nel sito "Arg₅₅₃Pro₅₅₄Arg₅₅₅", con attesa produzione di peptidi contenenti la sequenza "TLQP" presente subito a valle di questo presunto sito di taglio, infine un saggio con anticorpi prodotti contro il peptide sintetico **dYRSQEEAPGH** che corrisponde ai residui dal 422 al 430 (sequenza di ratto) in una zona ricca di siti di taglio. Su tali basi, abbiamo condotto un circoscritto studio pilota in condizioni di elevato "stress" ambientale, per ottenere qualche informazione preliminare in rapporto a possibili modulazioni di VGF-peptidi nel surrene medesimo.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Produzione antisieri

Abbiamo usato numerosi differenti anticorpi diretti contro epitopi di VGF, principalmente immunizzando conigli e guinea pigs, nonché in qualche caso ratti e galline. Tra i differenti immunogeni usati (**Tabella 1**), numerosi sono stati prodotti come peptidi di sintesi corrispondenti a specifiche e cruciali regioni della sequenza primaria di VGF, opportunamente coniugati all'estremo desiderato (C- o N-termino). In alternativa, porzioni di VGF sono state prodotte con tecniche di ingegneria genetica in batteri (*Escherichia coli*), in forma di proteine di fusione. A questo scopo, porzioni codificanti specifiche sequenze del gene "*vgf*" sono state fuse con beta-galattosidasi o GST, inserite in un plasmide precostituito con vettori di espressione e promotori specifici. Il plasmide è stato poi transfettato in batteri, trascritto e quindi tradotto nella proteina corrispondente: questa una volta prodotta in considerevoli quantità è stata estratta mediante sonicazione, purificata per centrifugazione, quindi utilizzata per immunizzare gli animali.

In particolare, nel presente studio, abbiamo utilizzato gli anticorpi sotto elencati nei quali le sequenze sintetiche o biosintetiche utilizzate per l'immunizzazione sono state tratte dalla sequenza primaria di specie differenti (umana e ratto). La posizione numerica degli aminoacidi corrispondenti al C- ed N-termino ed è quindi indicata con

riferimento alla relativa specie (vedi **Figura 3**).

- ❖ Peptide sintetico dY-**IEHVLLRRP** corrispondente alla sequenza **umana VGF₆₀₆₋₆₁₅** con l'aggiunta di un residuo Tirosina al suo estremo N-terminale. Esso fu coniugato con Tiroglobulina bovina tramite il residuo tirosina (d-Tirosina in quanto potenzialmente più resistente ad attività proteolitiche tessutali o plasmatiche), utilizzando parallelamente glutaraldeide e bis-diazo-tolidina, con ciò producendo due coniugati che furono miscelati prima di ogni iniezione. Tale coniugazione fu scelta per esporre meglio l'estremo C-terminale per la induzione di anticorpi per esso selettivi, nonché per l'efficacia empiricamente riscontrata dell'uso di tale doppia procedura di coniugazione. Si noti la suddetta sequenza peptidica non sia identica nella porzione codificante del gene *vGF* di ratto e di topo, per la sostituzione della terz'ultima Arginina (R) con una Istidina (H).
- ❖ Peptide sintetico dY-**IEHVLLHRP** corrispondente alla sequenza C-terminale del **ratto / topo** (anti-rat VGF₆₀₉₋₆₁₇). Anch'esso prodotto come il C-termino umano sopra descritto.
- ❖ Peptide dY-**QQGLAQVEA-NH₂**, corrispondente alla sequenza **human proVGF₂₉₈₋₃₀₆**, con l'aggiunta di un gruppo amidico al suo C-termino: esso corrisponde all'estremo C-terminale di uno o più potenziali VGF-peptidi derivanti da clivaggio seguito da amidazione al residuo 306 di Alanina (sequenza di ratto). Detto peptide sintetico fu coniugato con Tiroglobulina bovina (quale carrier) al suo estremo N-terminale, tramite il residuo Tirosinico ivi presente, come sopra descritto. Ciò sempre al

fine di meglio esporre l'estremo C-terminale per l'induzione di anticorpi selettivi.

- ❖ Peptide sintetico **TLQPPASSRR-C**, corrispondente alla sequenza di ratto **VGF₅₅₆₋₅₆₅** (estremo N-terminale di VGF peptidi dimostratisi presenti in vivo: Trani et al., 1995) con l'aggiunta di una Cisteina (C) al suo C-termino. Tramite quest'ultima, esso fu coniugato con "keyhole limpet haemocyanin" (KLH) quale carrier. Si noti come la sequenza peptidica suddetta sia largamente analoga nel gene umano, salvo alcune sostituzioni non vicinissime all'N-termino: la sequenza -Ala-Ser-Ser- (ASS: sottolineata qui sopra) è ivi sostituita con -Ser-Ala-Leu- (SAL).
- ❖ Peptide sintetico **dYRSQEEAPGH**: esso corrisponde ai residui dal 422 al 430 (sequenza di ratto) in una zona ricca di siti di taglio e fu coniugato come i precedenti con tireoglobulina bovina al suo N-termino, ancora nell'aspettativa di meglio indurre anticorpi contro il C-termino "clivato" come si desiderava.
- ❖ Peptide sintetico **LENYIEHVLL** corrispondente ad una sequenza prossima all'estremo C-terminale "libero" di proVGF, ed identica in ratto e uomo. Esso fu coniugato con tiroglobulina bovina all'estremità N-terminale (residuo Leu) tramite l'uso di glutaraldeide, ancora per indurre preferenzialmente anticorpi contro l'estremità C-terminale del peptide sintetico, ed auspicabilmente contro il corrispondente peptide "clivato" in vivo. Tali anticorpi furono intesi per uso primariamente nelle specie umana e bovina e in quelle specie in cui fossero risultati comunque "reattivi" anticorpi contro il C-termino del precursore proVGF nella sua

forma “umana”. Stante infatti il doppio residuo basico: “-Arg-Arg-” poco prima del C-termino di proVGF in tali specie, ci si chiedeva se potessero essere presenti prodotti processati anche in questo punto della sequenza.

- ❖ Proteina di fusione codificante per un dominio prossimo al C-termino di proVGF anche noto come AV₃. Essa include la sequenza: **rat VGF₄₄₃₋₅₈₈** che si continua al suo C-termino con β-galattosidasi.
- ❖ Proteina di fusione: **TLQPPASSRRRHFHHALPPAR-“GST”**. Essa include la sequenza di **rat VGF₅₅₆₋₅₇₆** “TLQP Peptide 21” e si continua al suo N-termino con la proteina Glutatione S-Transferasi (GST).

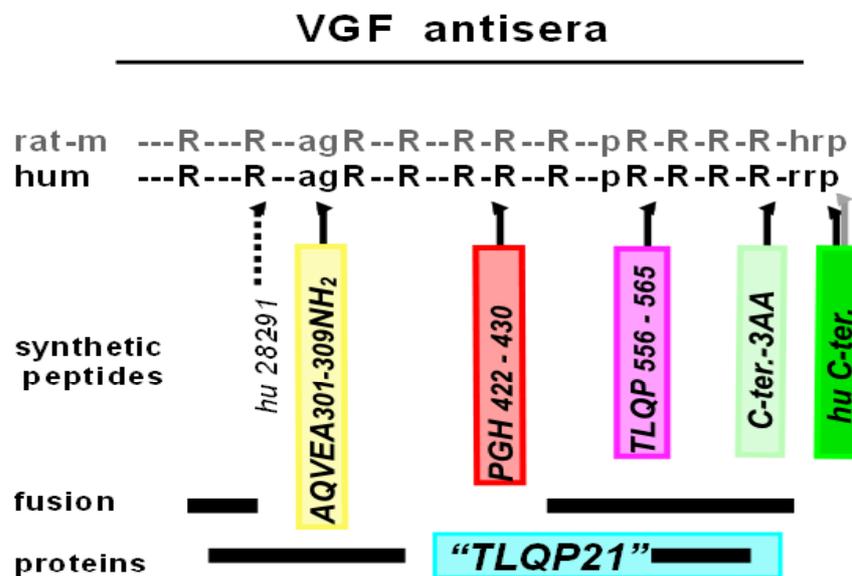


Figura 3: schema rappresentativo della posizione dei siti di ipotetico clivaggio di VGF rispetto alle sequenze scelte per la produzione di anticorpi.

Tabella 1

Anticorpi per VGF

antigene	donatore	produttore	diluizione
rat VGF ₅₅₆₋₅₆₅	Guinea-pig	NEF-Lab	1:800
rat VGF ₆₀₉₋₆₁₇	Rabbit	NEF-Lab	1:400
VGF ₄₂₂₋₄₃₀	Rabbit	NEF-Lab	1:800
VGF ₆₀₆₋₆₁₅	Rabbit	NEF-Lab	1:800
VGF ₃₀₁₋₃₀₉	Rabbit	NEF-Lab	1:800
VGF ₆₀₃₋₆₁₂	Rabbit	NEF-Lab	1:1000
VGF ₅₅₆₋₅₇₇	Guinea-pig	NEF-Lab	1:800

**ANTICORPI contro
enzimi della catena biosintetica
delle CATECOLAMINE**

antigene	donatore	produttore	diluizione
PNMT	sheep	Sigma	1:2000
DBH	mouse	Sigma	1:2000
TH	mouse	Sigma	1:800

3.2 Animali

Per il nostro studio abbiamo utilizzato suini maschi e femmine ($N > 25$) di età compresa fra otto e nove mesi (magroni) e bovini maschi e femmine di età compresa tra 10 e 12 mesi ($N > 20$). I campioni furono raccolti dalle catene di macellazione presso due mattatoi locali, entro 30-60 min dall'abbattimento, in rapporto alle normali procedure post-macellazione.

Occorre qui notare alcuni aspetti relativi alle usuali e consuetudinarie modalità di "preparazione" degli animali alla macellazione. Infatti, agli animali delle due specie menzionate è usualmente sottratto il cibo a partire da un qualche momento del giorno precedente l'abbattimento previsto: essi sono quindi pressochè sempre mantenuti "a digiuno" per un periodo variabile tra le 16 e le 24 ore circa. Inoltre, in dipendenza delle distanze tra sede di allevamento o mantenimento e sede di macellazione, gli animali sono trasportati presso la sede di macellazione con un tempo di trasporto variabile tra meno di un'ora e 2-3 ore, se si opera su base locale, ovvero anche di alcuni giorni, se la provenienza degli animali è da distanze maggiori o da altri Paesi.

Gli animali da noi studiati erano tutti di provenienza locale, con tempi di trasporto assai contenuti (vedasi oltre per "gruppi sperimentali"). In rapporto alle età di abbattimento usuali localmente, tutti i suini campionati erano prepuberi (magroni di circa 6-7 mesi). Per quanto riguarda i bovini, campioni furono raccolti esclusivamente da animali di età inferiore ai 12 mesi (età effettiva 11-12 mesi circa), anche in rapporto ad opportune misure di minimizzazione del rischio

igienico congrue al periodo in cui il presente lavoro fu in larga parte svolto. Per gli esperimenti su ratti furono utilizzati maschi e femmine Sprague Dawley, del peso di 200-350 grammi circa.

Gruppi sperimentali

Quale circostanza di “stress” relativamente controllato, anche a confronto con le usuali modalità di macellazione sopra descritte, si ricercarono gruppi di Suini che avessero occasione di restare in stabulazione presso la sede di macellazione per un periodo sufficientemente prolungato, come talvolta avviene. Si ebbe occasione di identificare una partita di suini sufficientemente ampia (oltre 100 capi, di provenienza entro un raggio di 60 km circa), che risultava pervenuta in sede di macellazione in orari non più compatibili con l’abbattimento in giornata. Tali suini rimasero quindi in stabulazione per l’intero fine settimana (oltre 2.5 giorni), e se ne poté organizzare l’abbattimento come prima partita della giornata: quindi in condizioni di “stress associato alla procedura di abbattimento” minimo possibile, specie per i primi animali avviati all’abbattimento. Agli effetti pratici, tali suini ebbero quindi modo di restare stanziali per vari giorni, e quindi anche di ristabilire le gerarchie di gruppo.

È qui opportuno notare come nell’occasione “sperimentale” suddetta fu possibile raccogliere campioni per la sola procedura di estrazione per analisi immunochimiche. Sfortunatamente, il rapido crescere di pressioni economiche e la conseguente ottimizzazione dei tempi trasporto-abbattimento ha reso virtualmente

impossibile accedere nuovamente a congrui gruppi di suini nelle condizioni di cui sopra: comprensibilmente, si intendeva infatti confermare le osservazioni, e completarle con analisi immunostochimiche ed eventualmente di valutazione dell'espressione / induzione genica di **v α gf** in surrene ed eventualmente in alcune altre sedi, tra cui l'ipofisi.

In fase di macellazione, campioni di surrene furono raccolti in differenti momenti man mano che le carcasse emergevano dalle fasi di macellazione industriale:

- ❖ **Gruppo A:** “stressati” (N = 7 animali), macellati come di media in normale catena di abbattimento, cioè con tempi di attesa più o meno lunghi (15-25 min circa). Per “catena di abbattimento” si intende un percorso obbligato dove i suini sono spinti, ove necessario tramite pungolatura, nella stessa corsia nella quale i primi animali (in fila singola) vengono tramortiti e subito exanguinati.
- ❖ **Gruppo B:** “minimo stress” (N = 7 animali), suini macellati all'inizio della macellazione, quindi con minimo tempo di attesa pre-stordimento ed exanguinazione (0-5 min al massimo), quindi sacrificati in limitate condizioni di stress.

3.3 Prelievi e trattamento campioni

Campioni per immunostochimica

Il prelievo delle intere ghiandole surrenali è stato effettuato dagli animali appena abbattuti. Da ciascun surrene sono state prelevate fettine di ~3mm immediatamente immerse in paraformaldeide al 40% (40 g/L, in 0.1 mol/l PO₄ buffer, pH 7.2, 0-4°C) per 3 ore, poi lavate in PBS contenente glucosio (7-10%, overnight). Ciascun campione fu quindi orientato (superficie di taglio verso il basso) in una vaschetta di alluminio (Ferri *et al.*, 1987) in apposita miscela di crio-inclusione (Cocco *et al.*, 2003), rapidamente congelata in Freon a temperatura di fusione (raffreddato con azoto liquido), infine conservate in azoto liquido fino al momento dell'uso. Criosezioni tagliate ad un settaggio di 4-5µm furono ottenute usando un criomicrotomo a lama fredda (Microm HM-560, Walldorf, Germany: Ferri *et al.*, 2002) e montate su vetrini precedentemente trattati con poli-*L*-lisina.

Campioni per ELISA

Per ogni ghiandola/organo da campionare (surrene, ipofisi, stomaco, pancreas etc.) è stato prelevato circa un grammo di tessuto subito sminuzzato, trasferito in provette contenenti PBS (10ml/grammo di tessuto) + PIC (5ul/ml Protease inhibitor cocktail – Sigma – ITALIA) in ghiaccio. Così diluiti i campioni

sono omogenati a freddo per 3-5 min. estratti per 15 min circa, centrifugati (13000 rpm, 10 min) e il sopranatante aliquotato e conservato a -30°C .

Un protocollo alternativo di estrazione è stato usato per i due gruppi di animali Gruppo A e Gruppo B, distinti per tempi di attesa nella catena di abbattimento. Circa un grammo di questi surreni è stato sminuzzato e trasferito in provette contenenti acqua bollente (bagnomaria in vigorosa ebollizione, 3-5 min.: ~10 ml/grammo di tessuto), bollito per 10-15min. e mantenuto a temperatura ambiente per ulteriori 10-15 min. (con occasionale mescolamento per inversione della provetta). I campioni sono poi centrifugati (13000 rpm, 10 min.) e il sopranatante è aliquotato in provette tipo Eppendorf e conservato a -20°C o temperatura inferiore.

3.4 Immunoistochimica

Le immunocolorazioni sono state eseguite utilizzando metodiche indirette.

I primi esperimenti si sono basati su colorazioni singole, per individuare la presenza dei vari peptidi VGF-immunoreattivi.

Protocollo standard:

Dopo trattamento con Triton X-100 (0.1% in H₂O, 1 ora; Merk, Germania), le sezioni sono lavate (PBS, 3x3 min.), quindi incubate overnight con uno degli anticorpi primari elencati nella **Tabella 1**, diluiti in PBS contenente: (a) siero normale della "specie da colorare" (suino, o bovino come adeguato), ~3%; (b) siero dell'animale donatore del secondario (asino), ~3%; NaN₃ (0.05% come conservante). Il giorno seguente, dopo lavaggio (PBS, 3x3 min.), le sezioni sono

incubate con appropriato anticorpo secondario coniugato con fluorocromo. In seguito quindi a lavaggio finale (PBS, 3 x 3 min.), il coprioggetto è montato con PBS-glicerolo (~60%) contenente NaN_3 (0.05%).

Per le immunocolorazioni singole si è preferito in genere utilizzare anticorpi secondari marcati con il fluorocromo Cianina 3.18 (Cy3: emette in giallo/rosso) per l'apparente maggiore sensibilità di tale sistema di rivelazione.

Immunocolorazioni multiple, sia doppie che triple, sono state inoltre utilizzate per studiare la colocalizzazione tra prodotti di VGF e le cellule della midollare. In particolare, abbiamo utilizzato miscele che includono uno/due anticorpo/i anti-VGF, ed uno o due anticorpi contro altrettanti enzimi della catena di sintesi delle catecolamine, prodotti in specie differenti (vedi **Tabella 1**).

Per preparare doppie e triple immunocolorazioni è stato seguito il protocollo appena descritto avendo però cura di incubare assieme primari derivanti da diverse specie per poterli in seguito visualizzare mediante secondari coniugati con differenti fluorocromi (Cianina 2 per il verde, Cianina 3 per il giallo/rosso, AMCA per il blu).

Per confermare l'attendibilità della colorazione ottenuta sono stati effettuati i seguenti controlli: per evitare fenomeni di crossreattività abbiamo (a) sostituito ciascun primario con il corrispondente siero normale non immune, o pre-immune ove disponibile, (b) l'incubato ciascun primario, singolarmente, seguito dai secondari inappropriati (anti immunoglobuline delle altre specie donatrici di anticorpi primari usati in parallelo). Specifici controlli di assorbimento (c) sono stati condotti pre-incubando ciascun antisiero anti-VGF con il suo corrispondente antigene sintetico, ovvero con il relativo coniugato, in una gamma di concentrazioni

(sino ad un massimo di circa 50 nmol/ml, a partire da concentrazioni circa 10^3 - 10^4 volte inferiori). In tal modo, si ricercava la completa soppressione della marcatura, ma anche il “ritorno” della immunocolorazione stessa ad un punto appropriato della serie scalare della diluizione dell’antigene, in presenza di costante concentrazione dell’anticorpo. Controlli similari (d) sono stati effettuati con le proteine di fusione, nonché con la sola GST (nonché con Tireoglobulina e KLH, ove appropriato) quale contro-controllo, per i relativi antisieri.

3.5 Microscopia ed acquisizione immagini

I preparati sono stati osservati e fotografati usando un microscopio Olympus BX60, per luce trasmessa a fluorescenza completo di un sistema fotografico PM30 (Olympus, Milano, Italia), nonché di una fotocamera digitale Fuji S2 PRO (Fujifilm, Milano, Italia) interfacciata ad un PC tramite il Software di aggiustamento cromatico Silverfast DC Pro (Lasersoft, Germania). Al microscopio è connesso un sistema prototipo che consente l'eccitazione multipla di differenti fluorocromi (Ferri *et al.*,1995).

3.6 ELISA

Trattandosi dello sviluppo e messa a punto di saggi completamente nuovi, abbiamo testato una gamma di procedure e variazioni tecniche, allo scopo di indirizzarci ad un'ottimizzazione delle condizioni d'uso, ed anche per verificarne l'applicabilità a differenti contesti. Tra i punti strumentali a tale messa a punto:

- la possibilità di indirizzarci nella presente fase a saggi con piastre "antigen-coated": ciò per poter ipoteticamente rilevare tutte le forme peptidiche contenenti l'estremo di interesse;
- l'adesione e reattività dell'antigene peptidico libero: cioè il medesimo peptide che fu invece coniugato per le immunizzazioni; o in alternativa (in alcuni casi soltanto) l'uso del medesimo antigene coniugato con altro e diverso carrier: ciò nell'ipotesi di aumentarne la disponibilità alle molecole di anticorpo, ovvero di risolvere ove necessario due diversi potenziali problemi. Da un lato, l'eventualmente scarso legame del peptide libero alla "plastica" con gruppi attivati, dall'altro l'eventuale "bloccaggio" sterico del peptide libero adeso alla plastica dal medesimo lato che l'anticorpo riconosce;
- prove sistematiche di uso di differenti soluzioni tampone;
- prove sistematiche di verifica degli anticorpi secondari, soprattutto in considerazione delle differenti specie studiate (ratto, ovino, suino, bovino) e delle elevate sensibilità dei metodi: in tali condizioni, infatti, anche un basso grado di cross-reattività degli anticorpi secondari usati erano potenzialmente in grado di risultare in interferenze di grado elevato. Si noti al riguardo come i migliori anticorpi

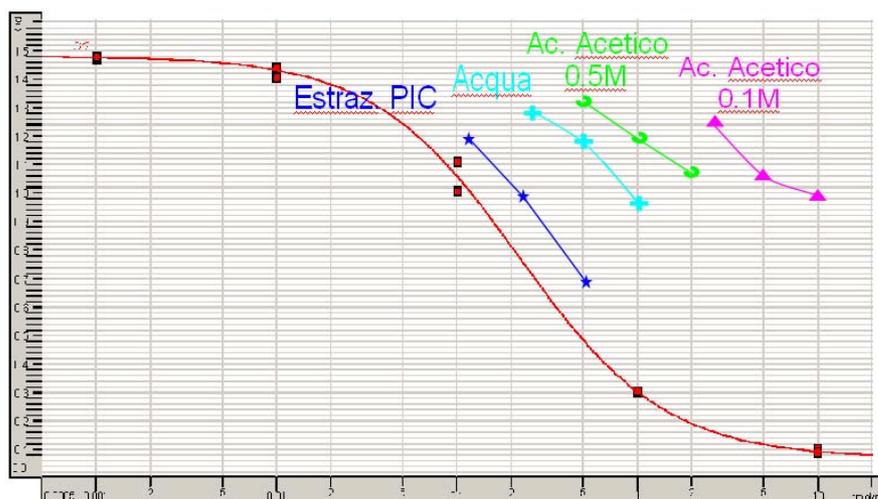
secondari commercialmente disponibili (Jackson ImmunoResearch Laboratories: anche in diretta gentile cooperazione con il Dr. W.G. Stegeman) sono purificati per affinità ed estensivamente trattati per immunoassorbimento, ma garantiscono gradi di cross-reattività inter-specifica “minore dell’uno per cento”. Come mostreremo, tale grado di cross-reattività è ampiamente sufficiente a rendere inapplicabili immunosaggi in specifiche circostanze;

- prove sistematiche di differenti bloccanti dei siti di adesione alla plastica: ad esempio proteine di vario tipo: sieralbumina bovina, gelatina di pesce, caseina, tutte in vario grado descritte in letteratura quali bloccanti efficaci. Inoltre: siero di specie donatrici dei secondi anticorpi, variamente trattati;

- prove di allestimento “su scala”, con conservazione di reagenti in aliquots e di piastre “antigen coated” a bassa temperatura: sia per aumentare l’efficienza e contenere la “labour intensiveness” dei metodi, sia per migliorarne la riproducibilità;

- prove di estrazione dei peptidi da misurare fatte mediante l’uso di diversi tamponi e diversi tipi di inibitori delle proteasi usati in diverse concentrazioni e relativi test di parallelismo di questi ultimi alle curve dei saggi (vedi **Graf. 1**).

I quantitativi maggiori dei livelli di VGF, e la proporzionalità tra le diverse diluizioni alle quali abbiamo testato lo stesso tessuto ci hanno indirizzati ad usare per estrarre i nostri campioni il cocktail di inibitori proteici della Sigma e basse temperature; sebbene, anche l’estrazione in acqua e l’immediata bollitura dei campioni, abbia reso leggibili i tessuti in esame.



Graf. 1: Prove di parallelismo per metodi di estrazione in surrene suino estratto con PIC, acqua, acido acetico 0.5 o 0.1M (saggio per il C-ter di ratto).

PROTOCOLLO ELISA standard:

Il protocollo finale ad oggi ottimizzato e generalmente in uso per l'allestimento dei diversi saggi può così essere schematizzato:

COATING DELLE PIASTRE:

- ❖ piastre multiwell a 96 pozzetti trattate per massimizzare l'adesione di molteplici molecole, grazie alla presenza di numerosi siti idrofili ed idrofobici (Maxisorp, NUNC, ITALIA). Infatti, altre piastre testate (Bibi Sterilin, ITALIA) si sono dimostrate assai meno efficienti nel legare gli antigeni d'interesse;

- ❖ incubazione con antigene o con suo coniugato: peptide o relativo coniugato (con proteina carrier diversa da quella usata per le immunizzazioni), in tampone carbonato/bicarbonato, overnight a 4°C, oppure 4 ore, a 37°C (NOTA: da ottimizzare per il singolo saggio / antigene / anticorpo);

- ❖ lavaggio piastre, 3 x 1 min, PBS + 0.05% Tween 20

- ❖ bloccaggio con BSA 3% o siero normale di asino al 9% per 4 ore a temperatura ambiente;
- ❖ lavaggio piastre 3x1 min, PBS + 0.05% Tween 20
- ❖ svuotato le piastre con cura, avvolte in fogli di alluminio, conservate a – 30°C per la conservazione (non oltre 2 mesi circa);

ANTIGENI PER LA FASE DEL COATING:

- 1) peptide sintetico “TLQPPASSRR-C-NH₂” (AFFINITI-BIOMOL) per il saggio contro la medesima sequenza di VGF contenuta nel ratto (20pmol/ml);
- 2) peptide sintetico “dYIEHVLLRRP” costruito contro il C-termino della sequenza umana di VGF (5pmol/ml);
- 3) peptide sintetico “dYIEHVLLHRP” costruito per individuare il C-termino della sequenza di ratto di VGF (5pmol/ml);
- 4) Il coniugato “dYRSQEEAPGH – KLH “ per il saggio contro la sequenza “PGH” del VGF di ratto (1pmol/ml);

ALLESTIMENTO SAGGIO:

- ❖ rimuovere piastre dal congelatore, lasciar equilibrare a temperatura ambiente (~5-10 min);
- ❖ incubazione con anticorpo primario: abbiamo testato diversi tempi di incubazione e diverse concentrazioni per ogni singolo anticorpo primario, settando così per i nostri esperimenti un tempo di incubazione a 4 ore a temperatura ambiente in agitazione continua e concentrazioni variabili per ogni primario diluito in siero normale di asino al 9%. Assieme all'anticorpo primario nei pozzetti abbiamo co-incubato i campioni da testare così da creare competizione tra il

campione e il peptide attaccato alle pareti per il legame all'anticorpo primario. In ogni piastra è stata allestita sempre una curva STD (riportate nei grafici A, B, C e D sottostanti) e i rispettivi bianchi, per consentire una corretta quantizzazione del VGF contenuto nei campioni;

- ❖ lavaggio piastre 3x1 min. con PBS + 0.05% Tween 20;

- ❖ incubazione con il secondario biotinato diluito in siero normale di asino al 9% (specie del donatore di tutti i secondari usati) per 2 ore a temperatura ambiente, in agitazione. Per ogni saggio abbiamo dovuto ottimizzare la concentrazione del secondario affinché fosse diminuito il legame aspecifico ai pozzetti ma abbastanza elevato il segnale da misurare;

- ❖ lavaggio piastre 3x1 min. con PBS + 0.05% Tween 20;

- ❖ incubazione con streptoavidina-perossidasi, 30 min, a temperatura ambiente, in agitazione;

- ❖ lavaggio piastre 3x1 min. con PBS +0.05% Tween 20;

RIVELAZIONE:

- ❖ assorbanza: tetra-metil-benzidina (TMB: Sigma, ITALIA); indi bloccaggio: HCl 1 mol/l; lettura a 450 nm entro 30 min;

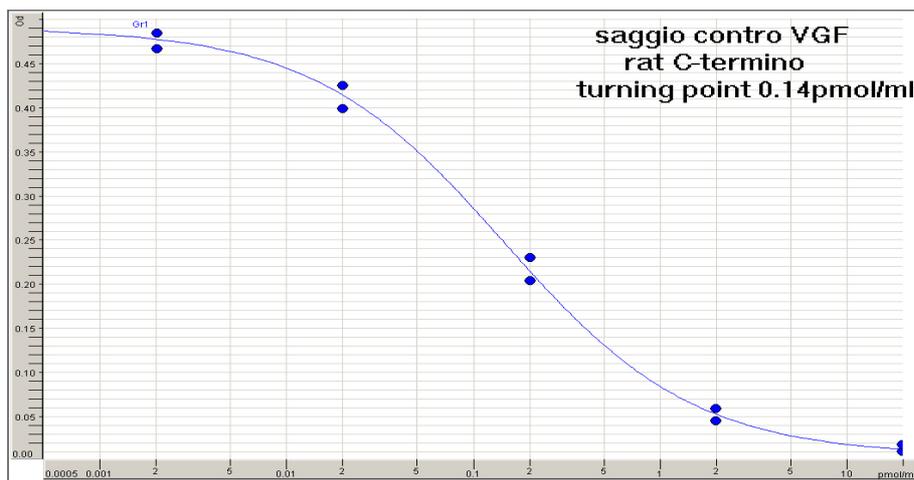
- ❖ luminescenza: substrato "Super Signal ELISA Femto Maximum Sensitivity" (Pierce, ITALIA), lettura immediata;

L'assorbanza a 450nm/luminescenza sono misurate con un lettore multifunzionale (plate chameleon multi label detection platform HIDEX Finland).

Grafico 2



Grafico 3



Siamo così riusciti a mettere a punto fino ad oggi quattro diversi saggi, contro le seguenti diverse porzioni o forme di VGF-peptidi:

Il C-termino della sequenza umana e di ratto, contro la sequenza “TLQP” e quella “PGH”. I quattro saggi hanno diversa sensibilità, come si evince dalle curve standard riportate nei Grafici 2, 3, 4, e 5; e legano forme grandi e piccole di VGF.

Grafico 4

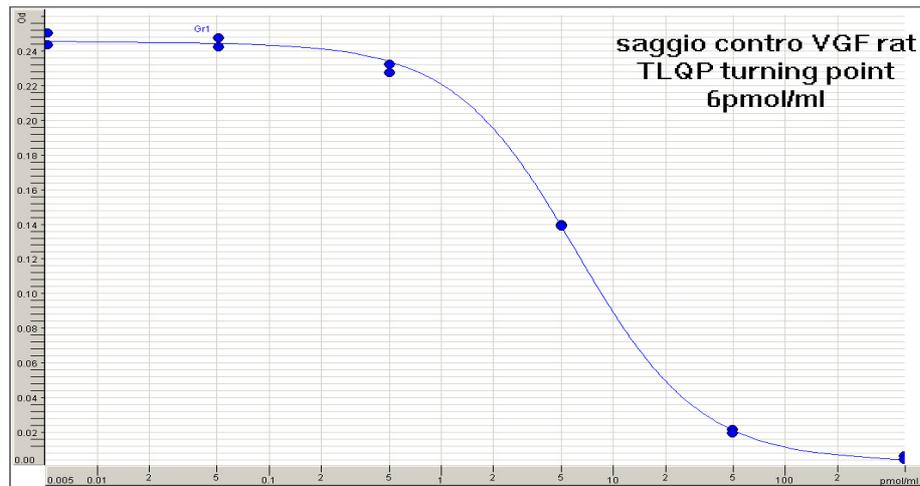
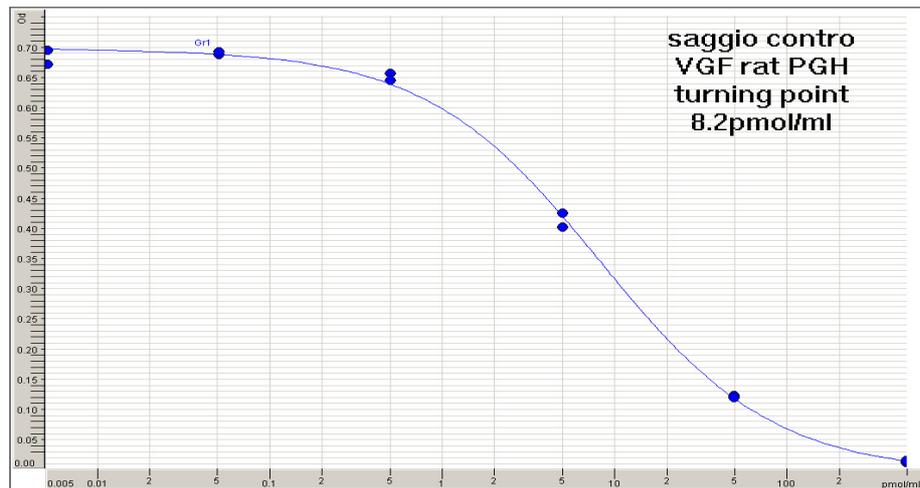


Grafico 5



La variabilità inter e intra saggio non supera il 10%.

Allo scopo di testare la cross-reattività degli anticorpi usati nei saggi per peptidi simili (più lunghi o più corti del nostro Standard), ogni saggio è stato caratterizzato usando diversi peptidi per controllo positivo e per controllo negativo.

La resa dei singoli saggi è stata controllata calcolando la percentuale di recupero dei peptidi aggiunti all'estratto prima della processazione di questi ultimi.

3.7 Caratterizzazione di forme molecolari

Per separare in base al peso molecolare gli estratti da testare in ELISA abbiamo allestito una colonna cromatografia con Sephadex G-50 (SIGMA, ITALIA) e montato una pompa a pressione (5imp/min) il tutto a 4°C. La colonna è equilibrata con tampone ammonio bicarbonato 50mM e i campioni caricati vengono poi fatti correre con lo stesso tampone.

Abbiamo quindi calcolato il volume vuoto (V_0) eluendo il blu destano e costruito una curva standard (**Grafico 6**) facendo correre i seguenti markers molecolari: 66KDa (albumina bovina), 29KDa (anidrasi carbonica), 12.4KDa (citocromo C), 6.5KDa (aprotinina) (SIGMA, ITALIA).

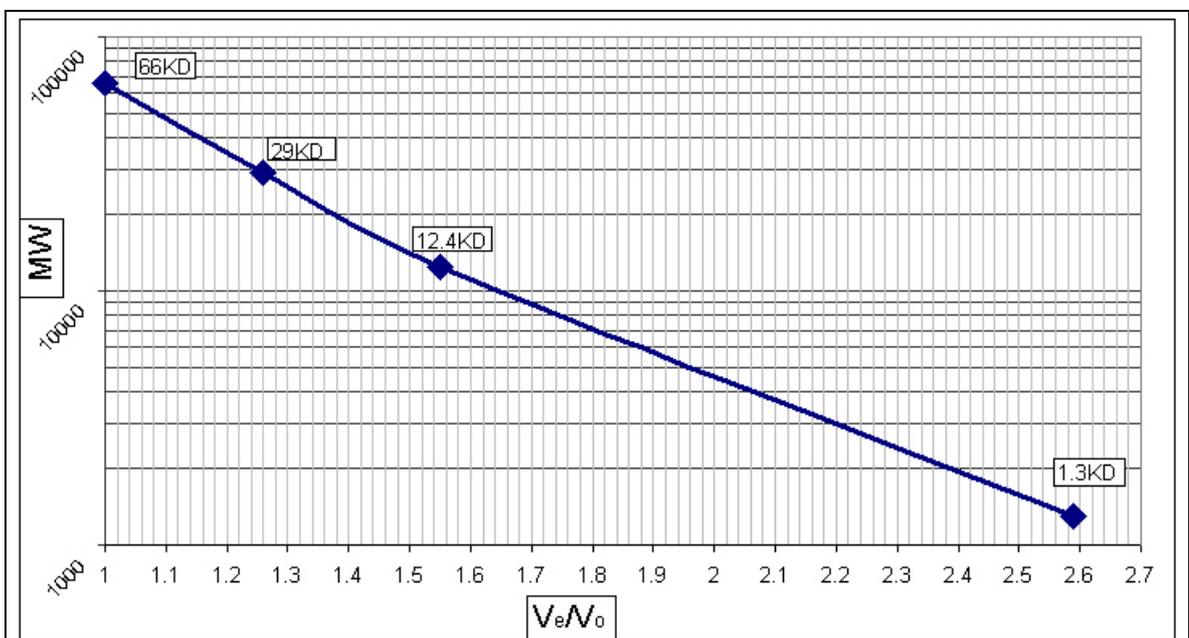


Grafico 6: curva Standard della Gel-cromatografia (Sephadex G-50).

I campioni caricati sulla colonna cromatografica, sono raccolti in frazioni da

3 ml. Per settare inizio e fine corsa di ogni singolo campione abbiamo di volta in volta misurato il volume vuoto (volume necessario ad eluire il primo picco di proteine misurato con assorbanza a 280nm) e le frazioni contenenti i sali del campione tramite voltmetro. Le frazioni vengono poi concentrate (eppendorf concentrator 5301) fino ad un volume di 200-300ul e conservate a -20°C prima di essere testate in ELISA.

A riprova del corretto funzionamento della gel cromatografia da noi approntata, abbiamo eluito in HPLC alcuni peptidi sintetici corrispondenti ai frammenti di VGF che con la cromatografia volevamo separare.

Nello specifico, abbiamo provato a separare i seguenti frammenti:

- Rat TLQP-8

TLQPPASS

Thr-Leu-Gln-Pro-Pro-Ala-Ser-Ser

- Rat TLQP-11

TLQPPASSRRR

Thr-Leu-Gln-Pro-Pro-Ala-Ser-Ser-Arg-Arg-Arg

- Rat TLQP-21

TLQPPASSRRRHFHHALPPAR

Thr-Leu-Gln-Pro-Pro-Ala-Ser-Ser-Arg-Arg-Arg-His-Phe-His-His-Ala-Leu-Pro-Pro-Ala-Arg

- Rat TLQP-30

TLQPPASSRRRHFHHALPPARHHPDLEAQA

Thr-Leu-Gln-Pro-Pro-Ala-Ser-Ser-Arg-Arg-Arg-His-Phe-His-His-Ala-Leu-Pro-Pro-Ala-Arg-His-His-Pro-Asp-Leu-Glu-Ala-Gln-Ala

- Rat TLQP-62

TLQPPASSRRRHFHHALPPARHHPDLEAQARRAQEEADAEERRLQEQEELENYIEH
VLLHRP

Thr-Leu-Gln-Pro-Pro-Ala-Ser-Ser-Arg-Arg-Arg-His-**Phe**-His-His-Ala-Leu-Pro-Pro-Ala-
Arg-His-His-Pro-Asp-Leu-Glu-Ala-Gln-Ala-Arg-Arg-Ala-Gln-Glu-Glu-Ala-Asp-Ala-Glu-
Glu-Arg-Arg-Leu-Gln-Glu-Gln-Glu-Glu-Leu-Glu-Asn-Tyr-Ile-Glu-His-Val-Leu-Leu-His-
Arg-Pro

- Human TLQP-21

TLQPPSALRRRHYHHALPPSR

Thr-Leu-Gln-Pro-Pro-Ser-Ala-Leu-Arg-Arg-Arg-His-**Tyr**-His-His-Ala-Leu-Pro-Pro-Ser-
Arg

- Human TLQP-24

TLQPPSALRRRHYHHALPPSRHYPG

Thr-Leu-Gln-Pro-Pro-Ser-Ala-Leu-Arg-Arg-Arg-His-**Tyr**-His-His-Ala-Leu-Pro-Pro-Ser-
Arg-His-**Tyr**-Pro-Gly

le frazioni corrispondenti ai picchi di ritenzione eluiti con l'HPLC sono state poi
saggiate e hanno dato esito positivo nel saggio contro il "TLQP".

4 RISULTATI

4.1 Localizzazione di VGF nel surrene

Un primo gruppo di esperimenti è stato fatto allo scopo di individuare la localizzazione e la distribuzione dei prodotti genici di “*vgf*” utilizzando differenti antisieri nel surrene di suino e bovino. I vari anticorpi usati hanno mostrato varia positività all’interno della zona midollare del surrene. Questi ultimi hanno sempre colorato la regione citoplasmatica delle cellule neuroendocrine e mai i nuclei dei feocromociti.

l’immunoreattività trovata per le diverse porzioni di VGF studiate è risultata diversa da anticorpo ad anticorpo: alcuni, come l’anti **VGF₄₂₂₋₄₃₀** hanno apparentemente colorato l’intera popolazione midollare in modo brillante e pressochè uniforme (**Foto 2B**), altri hanno mostrato una immunoreattività più selettiva per una sottopopolazione di cellule della ghiandola surrenalica, come l’antisiero prodotto contro la porzione C-terminale di VGF umano (anti **VGF₆₀₆₋₆₁₅**) che ha prodotto una colorazione granulare di media intensità in un discreto numero di cellule della midollare (**Foto 2A**), una paragonabile intensità di segnale è stata riscontrata con l’anti “**TLQP**” e con l’anticorpo prodotto contro il peptide “**TLQP 21**”.

Sorprendentemente, l’anti **VGF₅₅₆₋₅₆₅** (anti “**TLQP**”) e l’anti **VGF₆₀₃₋₆₁₂** (anche chiamato anti C-termino-3aa e prodotto contro un peptide che è uguale al C-termino di VGF, ma manca degli ultimi tre aminoacidi), hanno mostrato quadri di

colorazione tra loro complementari, nelle **Foto 2D** e **2E** rispettivamente si nota infatti una localizzazione specifica e selettiva o per l'anti "TLQP" o per l'anti "**VGF₆₀₃₋₆₁₂**" nella midollare del surrene, questo stesso risultato è stato ottenuto sia in tessuti di suino che di bovino. Ancora a proposito di questi ultimi due anticorpi, c'è da ricordare che sono stati appositamente prodotti per saggiare due siti di clivaggio molto particolari, il primo si trova a monte della sequenza "TLQP" che è stata più volte dimostrato dare luogo a prodotti di clivaggio con specifica attività biologica e il secondo si trova a tre aminoacidi dall'estremo C-terminale di VGF.

L'uso dell'anti **VGF₅₅₆₋₅₇₇** altrimenti chiamato peptide "**TLQP 21**", ha prodotto colorazioni molto simili all'anti "**TLQP**", come evidente nelle **Foto 2F** e **2G**. In queste due immagini mostrano sezioni seriate, colorate rispettivamente con l'anti "**TLQP 21**" e con l'anti "**TLQP**", i quali mostrano quadri del tutto sovrapponibili, distinguibili solo per intensità di colorazione, infatti, l'anti **VGF₅₅₆₋₅₆₅** sembra decorare con maggiore completezza le stesse cellule della midollare positive per l'anti "**TLQP peptide 21**" che pur colorandole tutte, fornisce loro un aspetto granulare e meno regolare.

Un particolare interesse era evocato dalla presenza di un sito di prevedibile clivaggio-amidazione (sequenza: -Gly-Arg-Arg-, nella sede: human **VGF₃₀₇₋₃₀₉**, rat **VGF₃₁₀₋₃₁₂**). In vista della possibile presenza di amidazione C-terminale in peptidi ormonali e neuropeptidi bioattivi, è stato prodotto un anticorpo specificamente contro il peptide amidato (human **VGF₂₉₈₋₃₀₆**, rat/mouse **VGF₂₉₅₋₃₀₉**). Questo anticorpo ha mostrato, infatti, una colorazione molto selettiva, riuscendo ad evidenziare solo rare cellule della midollare del surrene in tutte le specie usate (**Foto 2C**).

I risultati ottenuti con tutti gli anti VGF usati e appena descritti sono sostanzialmente simili nelle due specie testate, per cui non si provvede ad una descrizione separata.

4.2 Caratterizzazione cellulare della VGF-immunoreattività

Per caratterizzare le localizzazioni dei prodotti di VGF all'interno delle sottopopolazioni cellulari della zona midollare del surrene, abbiamo approntato doppie e triple colorazioni usando contemporaneamente anticorpi contro VGF e contro gli enzimi della sintesi delle catecholamine (TH Tiroxina idrossilasi, DBH Dopamine β idrossilasi e PNMT feniletanolamina-N-metiltransferasi).

E' stato così possibile osservare distribuzioni differenti all'interno della midollare del surrene per i diversi anticorpi anti VGF usati in separati gruppi cellulari, cioè, in cellule che risultano positive per il PNMT (cellule ad adrenalina) abbiamo trovato discreta positività per il **C-termino** e per l'anti **VGF₅₅₆₋₅₆₅**, ma nessuna di queste cellule positive per il PNMT si è mai colorata per il **VGF₆₀₃₋₆₁₂** (anti C-ter -3aa) (vedi **Foto 3 A, B, C, D**).

Al contrario del gruppo appena descritto, virtualmente tutte le cellule negative per la PNMT ma positive per la DBH (cellule a noradrenalina) si colorano per l'anti **C-termino-3aa**, ma non si colorano, se non per meno del 5%, ne con l'anti VGF **C-termino** umano, ne con l'anti **VGF₅₅₆₋₅₆₅**(vedi **Foto 3 E, F, G, H**).

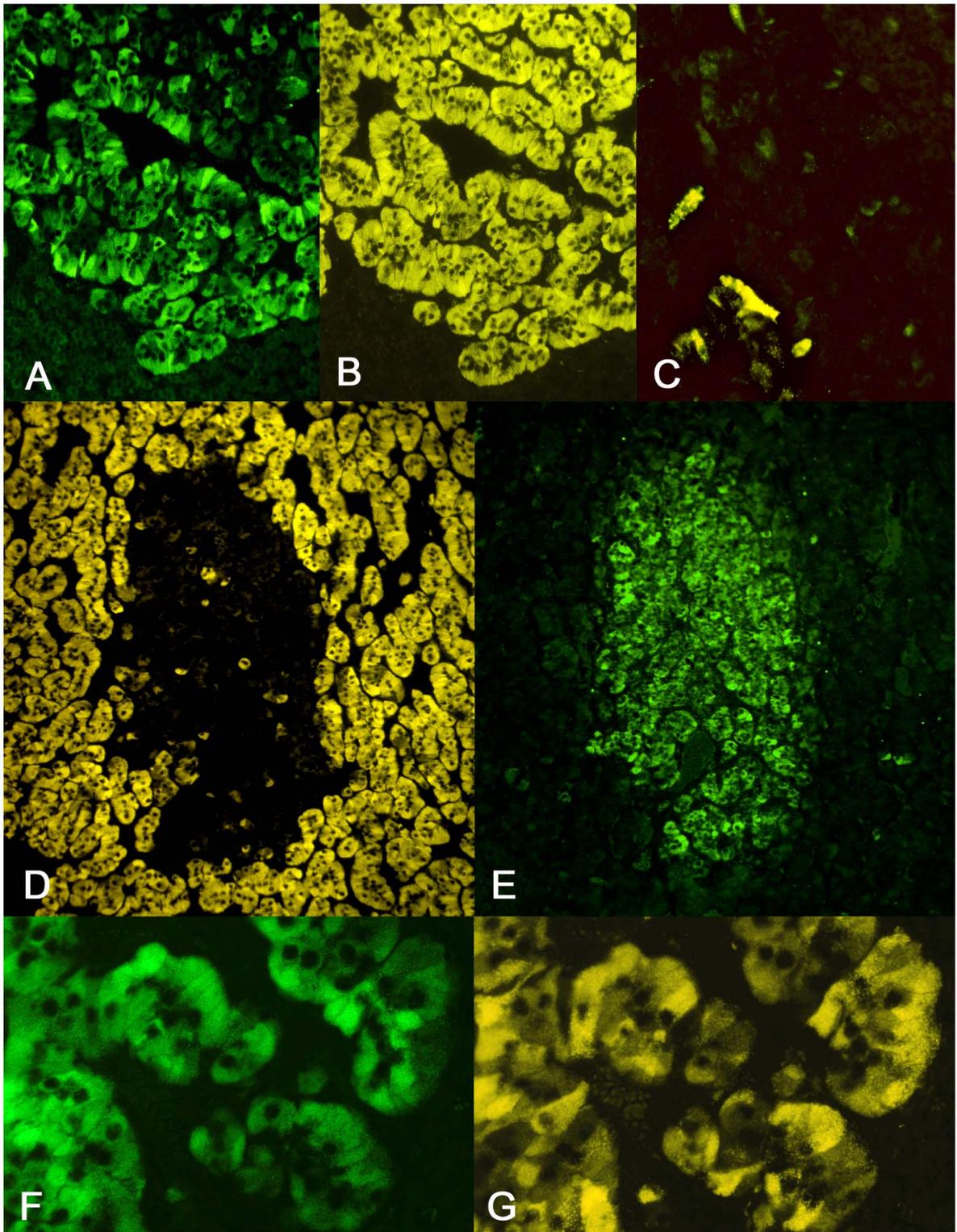


Foto 2 - Immunocolorazione di differenti VGF-peptidi (surrene suino): è evidente la diversa distribuzione di vari VGF-peptidi, con quadri complementari (A-E). Alcuni VGF-peptidi, per quanto co-localizzati, appaiono finemente modulati in modo variabile anche tra cellule adiacenti (F-G).

A: anti-human VGF C-termino; B: anti "PGH" (rat VGF₄₂₂₋₄₃₀)-peptide;
 C: anti-"peptide amidato" (human VGF_{296-306-NH2}); D ed F: anti TLQP-peptide;
 E: anti human VGF₆₀₃₋₆₁₂ (pre-C-termino); G: anti peptide "TLQP 21-GST".

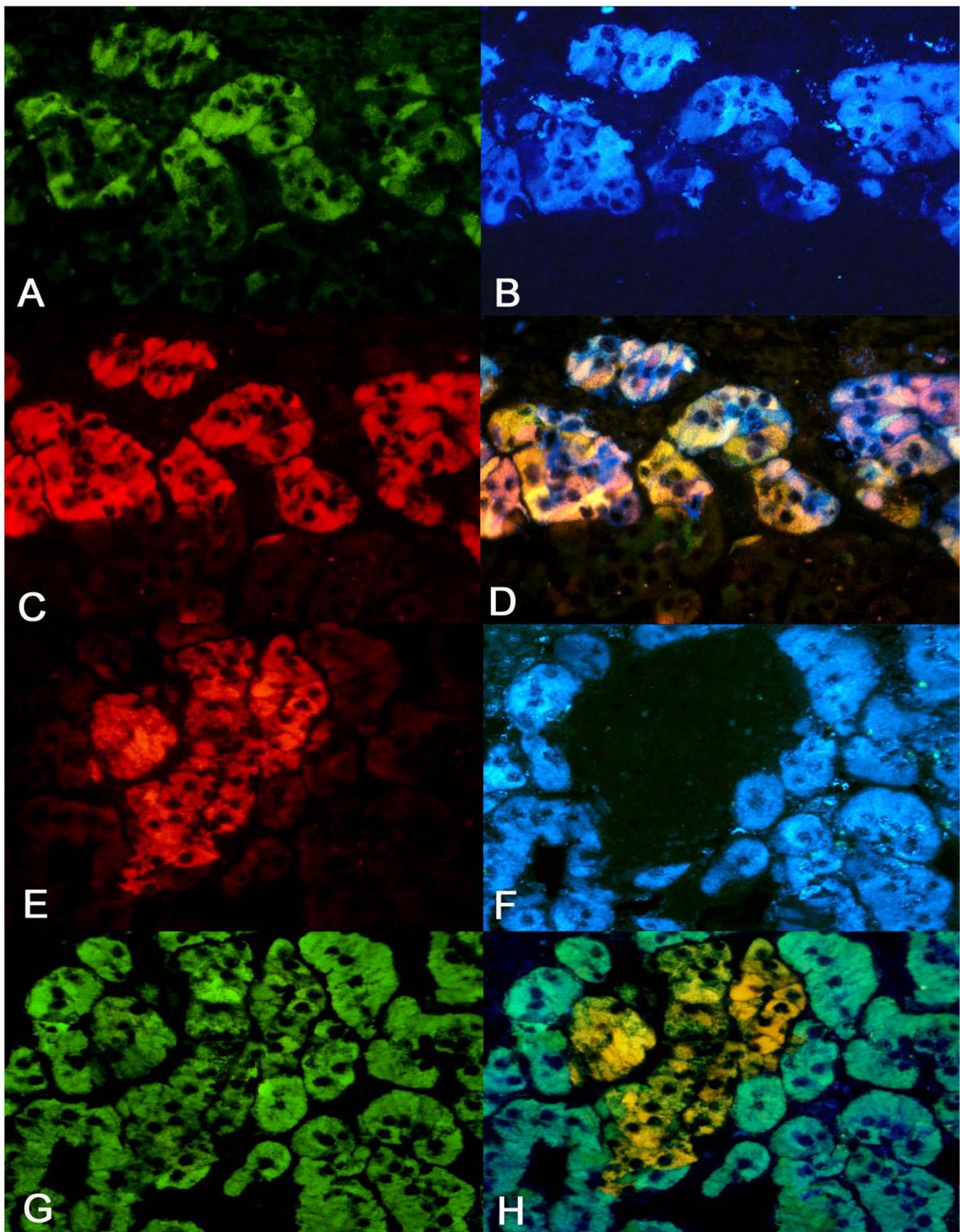


Foto 3 - Caratterizzazione dei tipi cellulari contenenti VGF-peptidi. Tra i VGF-peptidi studiati, vari sono quelli che mostrarono quadri “complementari”, tra cellule rispettivamente Adrenergiche e nor-Adrenergiche della midollare.
 A: anti-human VGF C-termino; B ed F: anti-PNMT (cellule Adrenergiche);
 C: anti-TLQP-peptide; D: sovrapposizione delle marcature “A+B+C”, vario grado di co-localizzazione; E: anti-human pre-C-termino (VGF₆₀₃₋₆₁₂); G: anti-DBH (cellule nor-Adrenergiche); H: “E+F+G”, cellule nor-Adrenergiche (DBH+, PNMT-) in giallo.

4.3 Concentrazioni tissutali di VGF

Per ragioni di brevità e chiarezza, tutto quanto la progressiva messa a punto dei diversi saggi immunochimici, e quindi tutti i problemi man mano riscontrati e gli approcci sistematicamente applicati a risolverli, sono molto sinteticamente riassunti e descritti nella sezione MATERIALI E METODI. Ci si confina qui strettamente alla descrizione dei risultati ottenuti.

Le concentrazioni tissutali dei diversi VGF peptidi misurati sono riportate nella **Tabella 2** che qui segue: tali concentrazioni sono espresse per unità di peso fresco originario di tessuto, allo scopo di consentire un qualche confronto tra diversi peptidi misurati nei campioni.

Specie	tessuto	Saggio per C- termino h/r	Saggio per "TLQP"	Saggio per "PGH"
bovino	surrene	600±40	40±10	60±10
	ipofisi	1300±80	30±8	140±20
	Pancreas	500±70	120±20	90±10
suino	surrene	450±60	90±10	100±20
	ipofisi	1100±80	220±40	200±50
	Stomaco	50±10	130±18	80±10
	Pancreas	200±60	120±15	55±5
ratto	surrene	9±2	45±12	35±7
	ipofisi	80±20	6±2	17±4
	Stomaco	2±0.5	50±8	30±8
	Pancreas	3±0.6	130±12	70±20
	ipotalamo	90±5	120±10	15±6

Tabella 2: i valori sono riportati in pmoli/grammo di tessuto come media ± SEM (n= 8-16).

Dalla **Tabella 2** si evince che i livelli di VGF precursore o dei suoi peptidi derivati sono più alti nelle ipofisi delle diverse specie, rispetto agli altri tessuti testati, ma, anche se in quantità comparativamente basse, VGF è risultato presente e misurabile in tutte le sedi neuro-endocrine scriniate. Minori concentrazioni furono riscontrate in altri tessuti testati (pancreas, stomaco).

Per quanto concerne le differenze tra idiversi peptidi studiati, abbiamo quindi riscontrato maggiore abbondanza di peptidi correlati al **C-termino**, rispetto ai peptidi misurabili col saggio anti “**TLQP**” (**VGF₅₅₆₋₅₆₅**).

Questo riscontro in qualche modo partecipa a confermare che l’anticorpo usato per il saggio anti “TLQP peptidi” riconosce selettivamente frammenti di VGF clivati nel residuo di Treonina₅₅₆ a confronto con sequenze TLQP “embedded “, cioè estese all’estremo N-terminale.

Ancora minori livelli di immunoreattività sono state misurate con il saggio contro **VGF₄₂₂₋₄₃₀** (anche chiamato saggio contro “PGH-peptidi”). Come si ricorderà, tale anticorpo è stato prodotto contro una sequenza immediatamente a monte di un sito di clivaggio, di cui i presenti risultati suggeriscono l’effettivo utilizzo *in vivo* per la biosintesi di VGF peptidi correlabili a questa regione.

4.4 Eterogeneità molecolare di VGF-peptidi

Per indagare sulle diverse forme molecolari di VGF presenti nei tessuti, abbiamo separato in base al peso molecolare le proteine presenti nei nostri campioni con Sephadex G50 e testato le singole frazioni con i saggi immunologici approntati.

Come si evince dal **Grafico 7** i surreni testati per il C-termino di VGF contengono un cospicuo quantitativo di una forma di elevato peso molecolare, presumibilmente corrispondente a proVGF (70-90KDa). Contemporaneamente è stata trovata una forma più piccola di 8-10KDa, riscontrata in entrambe le specie testate, che potrebbe rappresentare il frammento di VGF dalla regione "TLQP" fino al C

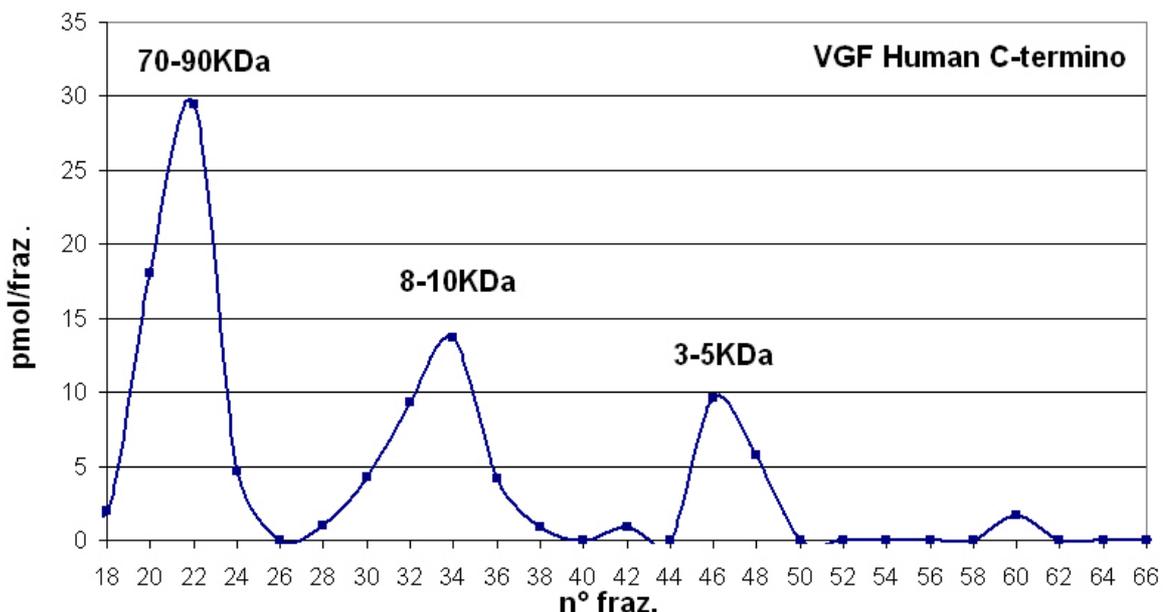


Grafico 7: frazioni cromatografiche testate nel saggio ELISA contro l'Human C-termino di VGF nel surrene di suino in normale catene di abbattimento.

termino di proVGF. L'ipotesi che sia presente un tale frammento, altrove nominato "VGF 10" (vedi **Fig. 4**) o anche "TLQP 62" (Possenti *et al.*, 1999; Trani *et al.*, 2002), è avallata dal riscontro anche nel saggio per "TLQP peptidi" (vedi **Grafico 8**) di una forma dello stesso apparente peso molecolare.

Ancora per quanto riguarda VGF peptidi misurabili con il saggio per il C-termino umano, si riscontra aggiuntivamente un picco dall'apparente peso molecolare di 3-5 KDa. La quantità misurabile di quest'ultimo peptide è risultata variabile da campione a campione tra quelli da noi saggiati (dati non riportati), senza che si potesse ad oggi identificare una qualche correlazione con parametri relativi ad età sesso o specie. Quest'ultimo potrebbe essere, in effetti, il "peptide V" già sequenziato da ipofisi bovina.

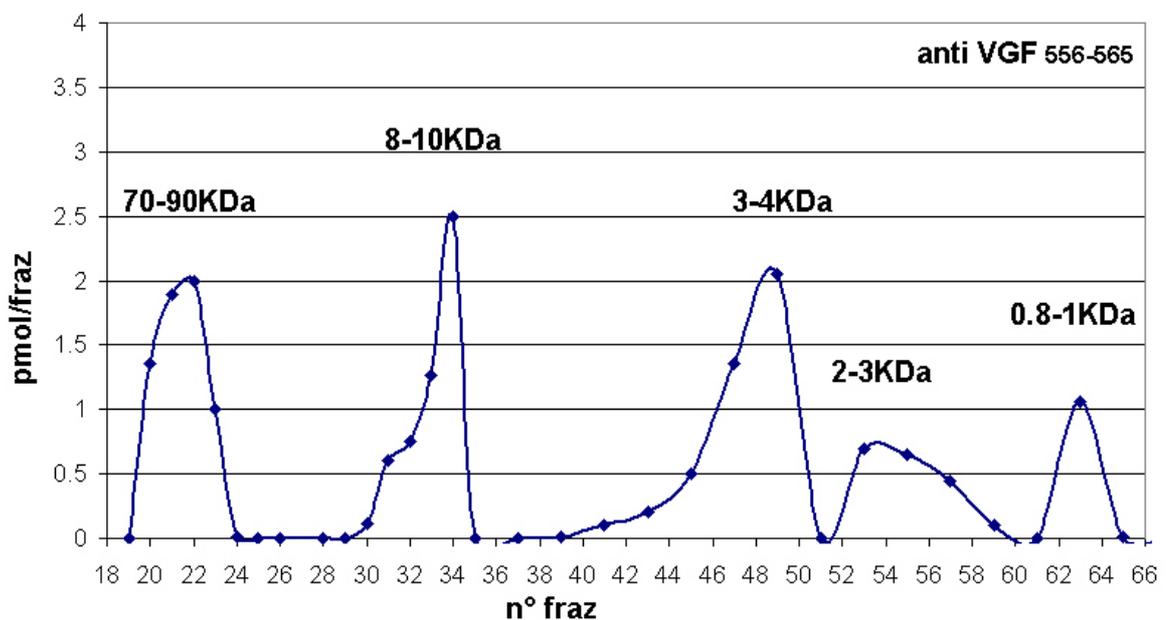


Grafico 8: frazioni cromatografiche testate nel saggio ELISA per i peptidi derivati dal "TLQP" nel surrene di suino in normale catena di abbattimento.

Questi ultimi risultati, quindi, indicherebbero che nel surrene bovino e suino proVGF vada incontro ad una processazione con esito in almeno una, potenzialmente o variabilmente due, forme di basso peso molecolare. Tali riscontri si riferirono sia al surrene di suino, che a quello di bovino.

Per quanto riguarda “**TLQP-peptidi**” (**Grafico 8**), il picco riscontrato in corrispondenza di forme ad elevato peso molecolare compatibili con proVGF è verosimilmente da riferirsi al limitato grado di cross-reattività che l’anticorpo presenta per forme estese a monte della sequenza “**TLQP**” (Brancia et al., 2004). Delle altre forme riscontrate, un frammento di 8-10KDa circa e due forme distinte, entrambe minori di 5KDa, potrebbero corrispondere rispettivamente: al frammento “**TLQP-62**” sino al C-termino di proVGF incluso; ad un frammento di VGF che inizia dal residuo “Thr₅₅₆” e prosegue per 21 residui aminoacidici ed anche chiamato “**TLQP-21**”; infine ad uno o più frammenti di varia estensione verso il C-termino di proVGF.

4.5 Modulazione dell’accumulo tissutale di VGF-peptidi

Il passo successivo a quello della misura “di base” è stato applicare i metodi quantitativi descritti in un modello sperimentale diretto a valutare cambiamenti dei livelli di VGF-peptidi in rapporto all’aumento dell’attività della ghiandola surrenalica. Come sopra descritto, abbiamo organizzato il sacrificio di due gruppi di suini in diverse condizioni ambientali o di stress: il primo gruppo di animali (**Gruppo B**), è stato sacrificato riducendo al minimo il tempo di attesa nella catena di

abbattimento, il secondo gruppo (**Gruppo A**) è stato abbattuto dopo prolungata permanenza nella normale catena di abbattimento, come avvenuto per tutti i campioni precedentemente raccolti e usati per gli esperimenti di immunoistochimica. Saggiando in ELISA i campioni “*in toto*” raccolti come è stato descritto sopra, abbiamo ottenuto una sostanziale diminuzione dei valori di VGF nel gruppo “non stressato” con il saggio contro “TLQP peptidi” del 50% e del 400% per il saggio contro il C-termino, mentre per il saggio contro “PGH peptidi” non abbiamo riscontrato cambiamenti significativi dei livelli di VGF (**Tabella 3**).

Saggio	Surrene suini Gruppo B		Surrene suini Gruppo A	
	media, pmol/g	Dev. STD	media pmol/g	Dev. STD
“H. C-termino”	87	22	475	98
“TLQP”	65	21	142	45
“PGH”	48	27	28	8

Tabella 3: i dati sono riportati in pmoli/grammo di tessuto come la media \pm Dev. SDT (n=7 per entrambe i gruppi)

Le quantità delle diverse forme di VGF intercettate nei suini con i tre diversi anticorpi utilizzati per l'ELISA, sembrano paragonabili nel Gruppo B, cioè negli animali in cui lo stress è stato ridotto al minimo, al contrario, i livelli di VGF misurati con il saggio per il C-termino e con il saggio per il “TLQP” risultano notevolmente aumentati.

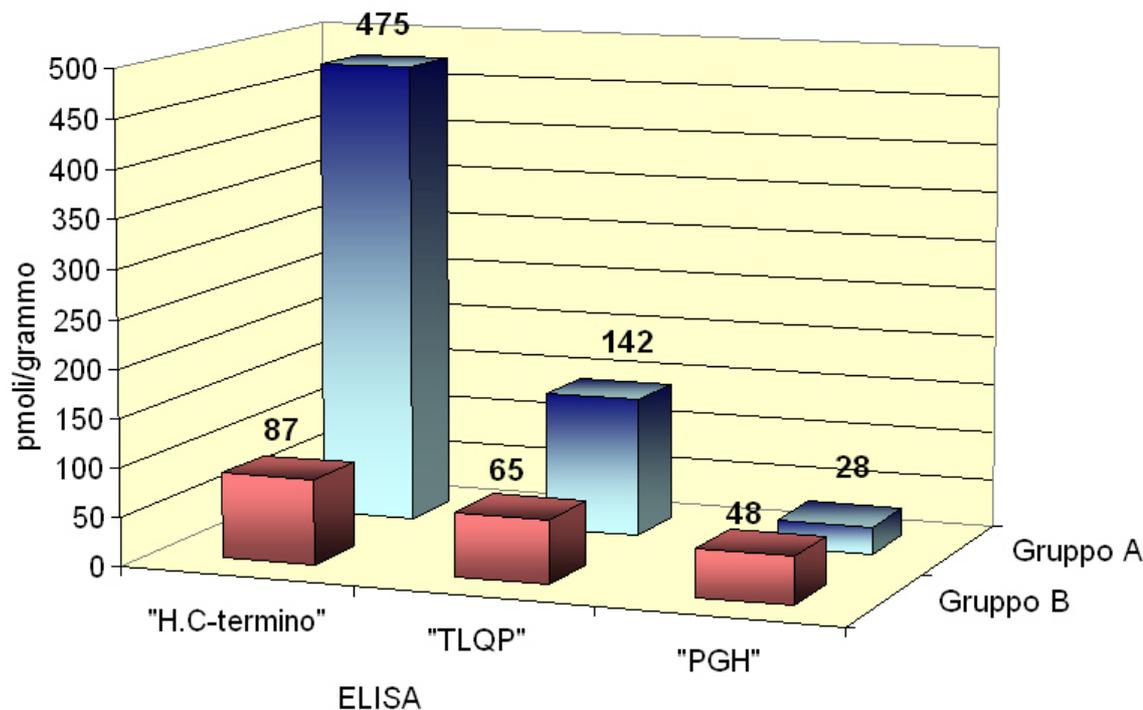


Grafico 9: quantità di VGF calcolata nel saggio contro il **C-termino**, **"TLQP peptidi"** e **"PGH peptidi"** nel surrene di suino. **Gruppo A:** suini sacrificati dopo tempi variabili di attesa nella catena di macellazione. **Gruppo B:** suini macellati per primi (tempi di attesa ridotti al minimo).

Per meglio interpretare la differenza dei valori di VGF ottenuta tra i campioni "stressati" e quelli "non stressati", abbiamo separato in Sephadex G50 e saggiato in ELISA anche campioni del **Gruppo B** che, come specificato nei metodi, differisce dai campioni definiti "stressati" (o **Gruppo A**) perché, trasportati due giorni prima nel mattatoio hanno avuto il tempo di ricomporre le gerarchie del gruppo, hanno smaltito il trauma del trasporto e per loro si è ridotto al minimo il tempo di attesa trascorso nella catena di abbattimento.

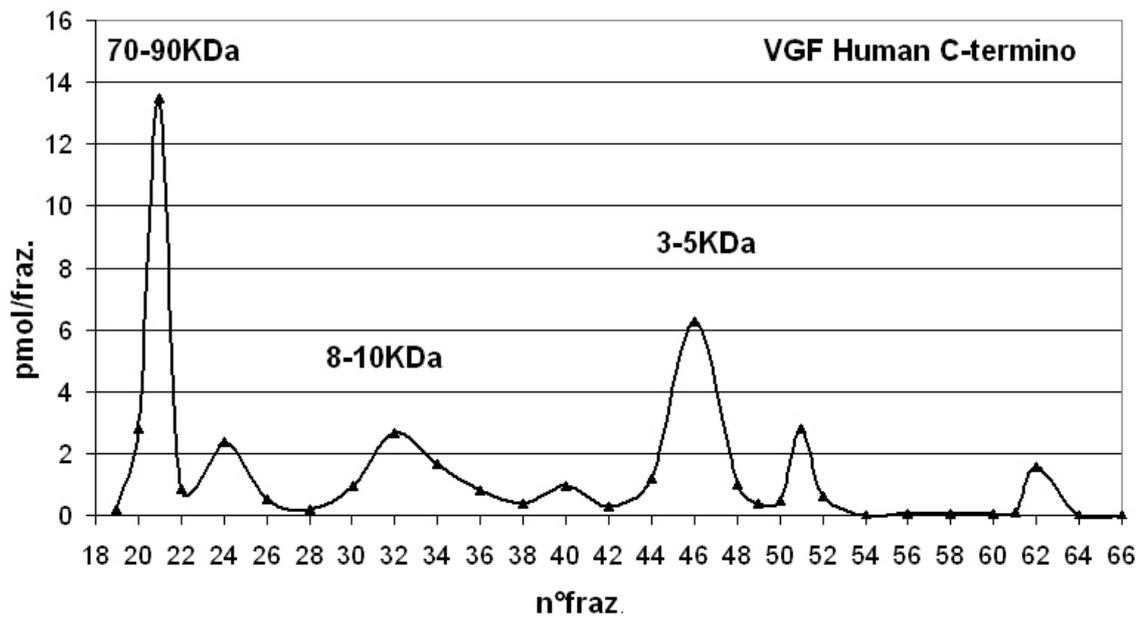


Grafico 10: frazioni cromatografiche di surrene suino, in condizioni minime di stress (**Gruppo B**) testate con l'ELISA per il C-termino della sequenza umana VGF.

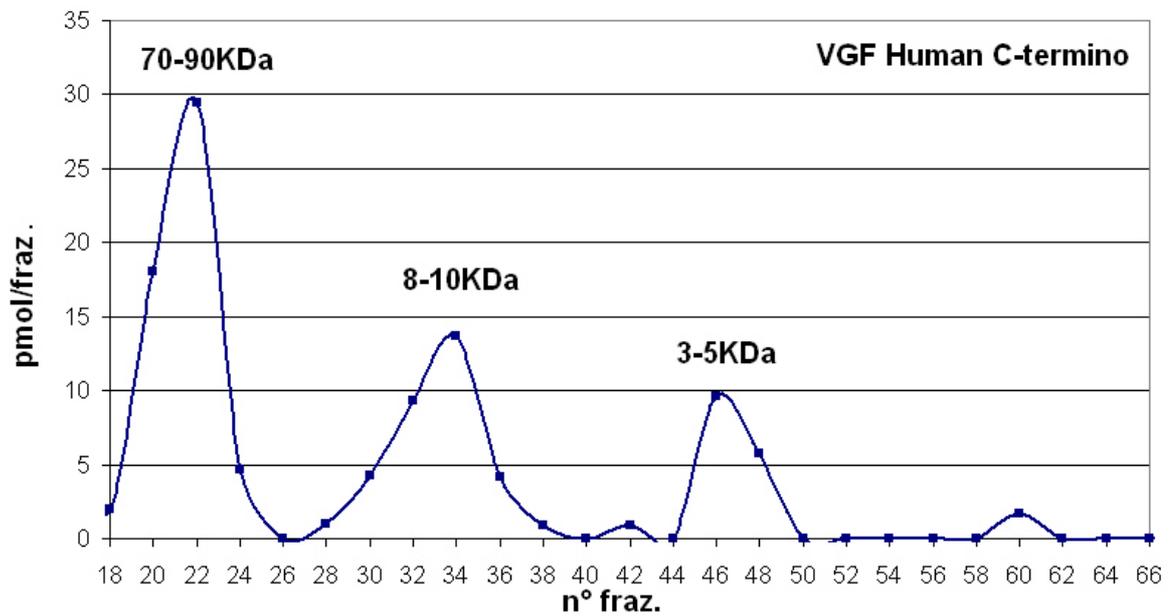


Grafico 7: saggio ELISA contro human C-termino di VGF nel surrene di suino in normale catene di abbattimento (**Gruppo A**). Riportato per confronto.

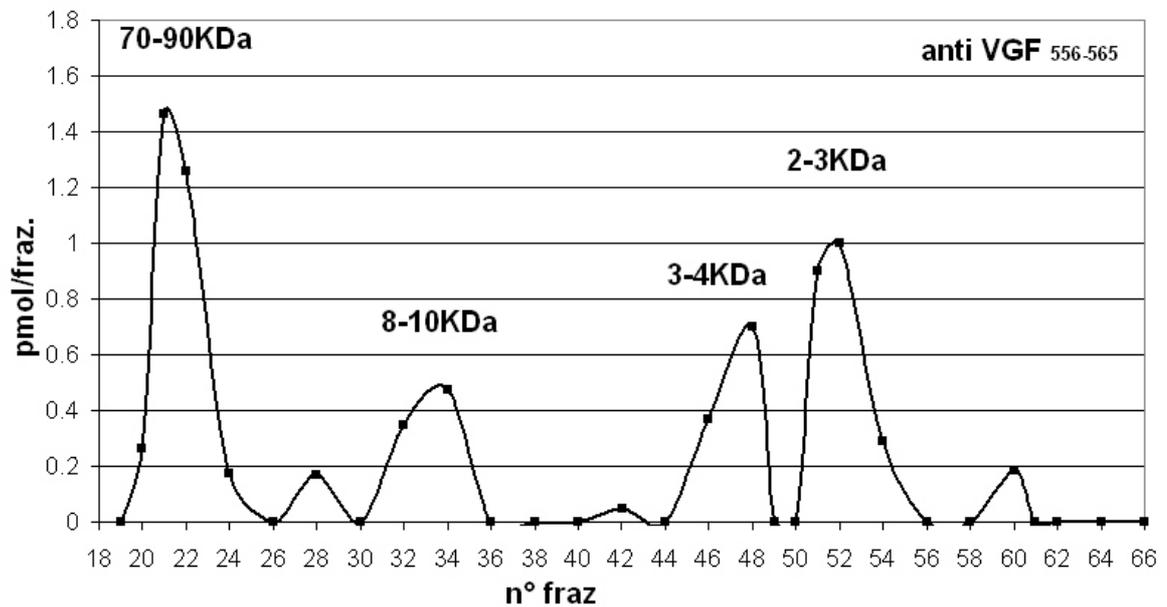


Grafico 11: frazioni cromatografiche di surrene suino, in condizioni limitate di stress (**Gruppo B**), testate nel saggio per i peptidi “TLQP” derivati dalla ipotetica processazione di VGF.

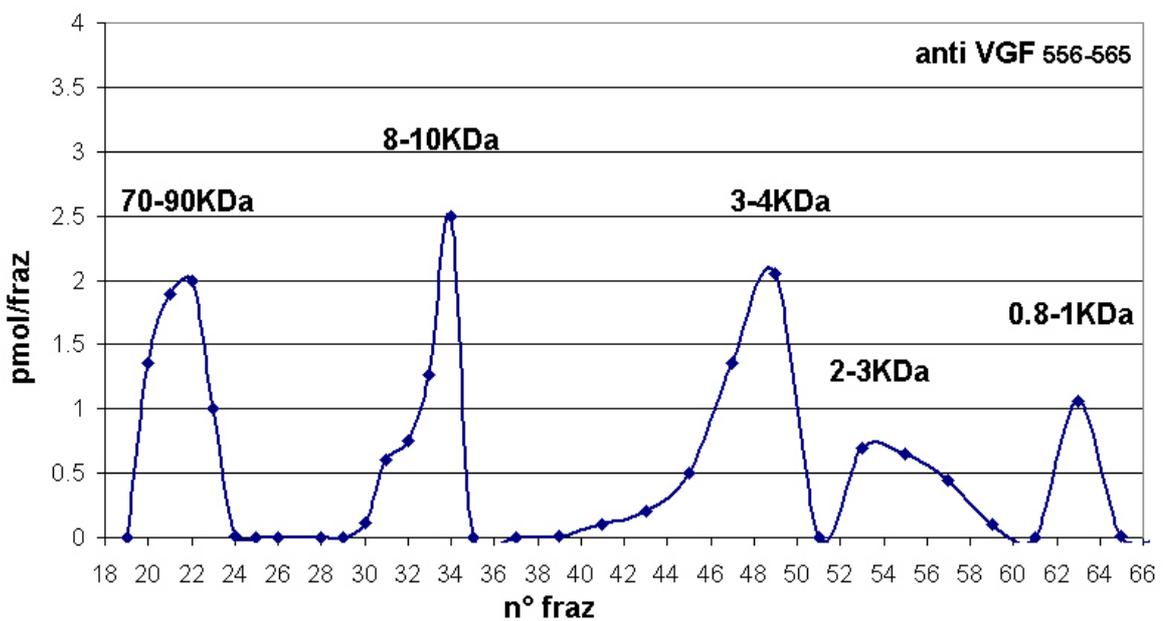


Grafico 8: saggio ELISA per i peptidi derivati dal “TLQP” nel surrene di suino in normale catena di abbattimento (**Gruppo A**). Riportato per confronto.

I risultati delle cromatografie degli animali dei due gruppi suddetti indicano per il **C-termino** evidenti differenze nel senso indicato dalle concentrazioni in toto. Di particolare interesse è una possibile variazione tra i due gruppi di animali, anche per quanto riguarda i quantitativi riscontrati delle forme clivate. Infatti gli animali abbattuti per primi, nei quali è stato ridotto il livello di stress, apparentemente contengono livelli inferiori di frammenti di basso peso molecolare (vedi **Graf 10** e **Graf 7**).

Per quanto riguarda il saggio contro **VGF₅₅₆₋₅₆₅**, anche chiamato saggio per “**TLQP-peptidi**”, sembra ancora più evidente l’aumento della quantità delle forme piccole di VGF negli animali del **Gruppo A** rispetto ai quantitativi riscontrati negli animali uccisi per primi o anche chiamati **Gruppo B**. Oltre all’aumento delle quantità delle forme clivate (vedi **Graf 11** e **8**), è ancora evidente, anche in questa cromatografia, un picco, di bassa entità nelle frazioni contenenti peptidi dal peso molecolare alto, paragonabili a pro-VGF (~70KDa).

5 DISCUSSIONE

5.1 Ipotesi strumentali e prospettive della ricerca

Precedenti studi svolti su colture primarie di granuli cerebellari e in estratti pancreatici di ratto, mediante l'uso dell'anticorpo anti C-termino di VGF, hanno dimostrato la produzione di piccoli peptidi derivati da VGF precursore. Con analisi di Western Blot sono stati trovati, infatti, accanto al precursore (70-90KDa) anche peptidi di 20, 18, 10 e 6KDa (Possenti *et al.*, 1999; Trani *et al.*, 1995; Levi *et al.*, 2004), mentre, nel surrene di ratto, di bovino e di suino erano state trovate apparentemente, solo forme di alto peso molecolare di VGF (Ferri *et al.* 1992).

Non meno importante è l'oramai accertato ruolo di VGF nella regolazione del bilancio energetico sulla base di studi svolti su topi knock out per il gene di VGF (Hahm *et al.*, 1999). Tutte queste evidenze sperimentali ci hanno spinto ad avviare il presente studio sul ratto e su animali interessanti anche dal punto di vista zootencico, cioè il bovino e il suino, mediante la preparazione e l'uso di diversi anticorpi diretti contro regioni differenti di VGF e la messa a punto di metodi quantitativi quali l'ELISA, allo scopo di definire la processazione subita da VGF precursore nelle diverse sedi di sua solita localizzazione e di misurare ipotetiche differenze nei livelli tissutali ed ematici di VGF. I risultati esposti nel presente studio dimostrano che l'espressione di VGF precursore e/o dei prodotti di clivaggio da esso derivati risulta ben rappresentata nella zona midollare del surrene sia di bovino che di suino. La chiara e netta positività ottenuta con i numerosi anticorpi

diretti contro differenti porzioni di VGF da noi prodotti e usati, ha anche fornito un quadro differenziale della presenza di diversi frammenti di VGF in cellule adrenergiche e noradrenergiche. Nello specifico, come è chiaramente desumibile dai riscontri immunostochimici, risultano due quadri di localizzazione netti e largamente differenziali per molti dei peptidi di VGF testati con diversi anticorpi, mentre altre porzioni di proVGF sarebbero diffusamente presenti nell'intera midollare, come i peptidi individuati dall'anti "PGH". In particolare, cellule ad adrenalina mostrano la presenza sia del verosimile precursore, sia di forme clivate comprendenti il segmento "TLQP", mentre le cellule a noradrenalina non conterrebbero le suddette forme di VGF-peptidi, ma appaiono brillantemente immunocolorate per forme che sono state private del tripeptide C-terminale. In primo luogo, tali riscontri appaiono indicare l'effettiva e contemporanea presenza di frammenti differenti di proVGF nei due tipi cellulari della midollare. Perciò VGF subisce anche nel surrene, come in altre sedi neuro-endocrine, una serie di processazioni post-traduzionali che differiscono per tipo cellulare. Si potrebbe quindi ipotizzare che la processazione di VGF risponda a stimoli paracrini che arrivando solo a gruppi distinti di cellule, lascino le altre cellule prive di tale input regolativo a seguire un differente "default". Infatti ricordiamo che la sequenza primaria di VGF contiene almeno dieci probabili siti di clivaggio ampiamente conservati nella sequenza di topo, ratto ed umana (Salton *et al.*, 1991, Possenti *et al.*, 1989, Van den Pol *et al.*, 1989) e che ad ogni sito di clivaggio potrebbe corrispondere un ipotetico frammento di VGF con una sua ipotetica funzione.

I risultati ottenuti con ELISA mediante l'uso dell'anti C-termino della sequenza umana confermano un'elevata omologia di sequenza tra il dominio C-terminale

umano di VGF e quello di suino, la cui sequenza non è ancora disponibile neppure in parte. Come si ricorda, per il bovino tale analogia risulta già evidente dal sequenziamento del "peptide V" (Liu *et al.*,1994), così come dalla sequenza di proVGF disponibile in banca dati (Accession XM_870373.2): a quest'ultimo riguardo, si noti l'elevatissimo grado di conservazione per parti estese della molecola di proVGF, ma anche la verosimile "mancanza" nella sequenza ad oggi pubblicata di una considerevole porzione di proVGF, nella porzione a cavallo del sito Arg-Pro-Arg discusso in vari punti della presente tesi. I nostri riscontri di immunoreattività per peptidi contenenti la sequenza "TLQP" anche nel bovino appaiono deporre a favore delle considerazioni immediatamente precedenti.

Per quanto riguarda le forme di VGF riscontrate negli esperimenti sopra citati, con il C-termino abbiamo trovato forme di elevato peso molecolare, presumibilmente corrispondenti al precursore proVGF, e forme più piccole quali verosimilmente il frammento che dal C-termino risale fino all'intera sequenza "TLQP", già altrove riportato come "VGF 10" (Trani *et al.*, 1995). A conferma di tale ipotesi, anche con il saggio per "TLQP" sono state individuate forme di peso molecolare assai simile nelle due specie testate.

Saggi e caratterizzazioni cromatografiche per peptidi "TLQP" indicano in prima approssimazione che i livelli di tali peptidi, nel surrene, sono considerevolmente meno rappresentati, specie per forme estese verso il C-termino, rispetto a quanto riscontrato per peptidi includenti l'estremo il C-terminale di proVGF.

Tuttavia, le informazioni più interessanti ottenute con il primo saggio di cui sopra, riguardano la presenza di forme clivate di VGF contenenti la sequenza "TLQP": infatti, tali forme clivate non erano ad oggi state riscontrate nel surrene. Inoltre, il

peso molecolare dei peptidi clivati individuati con ELISA risulta paragonabile a quello dei frammenti prevedibili in base alla sequenza primaria di proVGF (per quanto derivabile dalle specie in cui la conosciamo) e relativa collocazione dei siti di taglio noti. Ad esempio, il frammento che si riscontra in corrispondenza di circa 2.4KDa potrebbe ben corrispondere al peptide “**TLQP-21**”, mentre il frammento che migra in posizione 7.4KDa potrebbe rappresentare l'intera porzione da TLQP sino al C-termino di proVGF, che abbiamo già descritto poco sopra (VGF 10).

Residuo 556

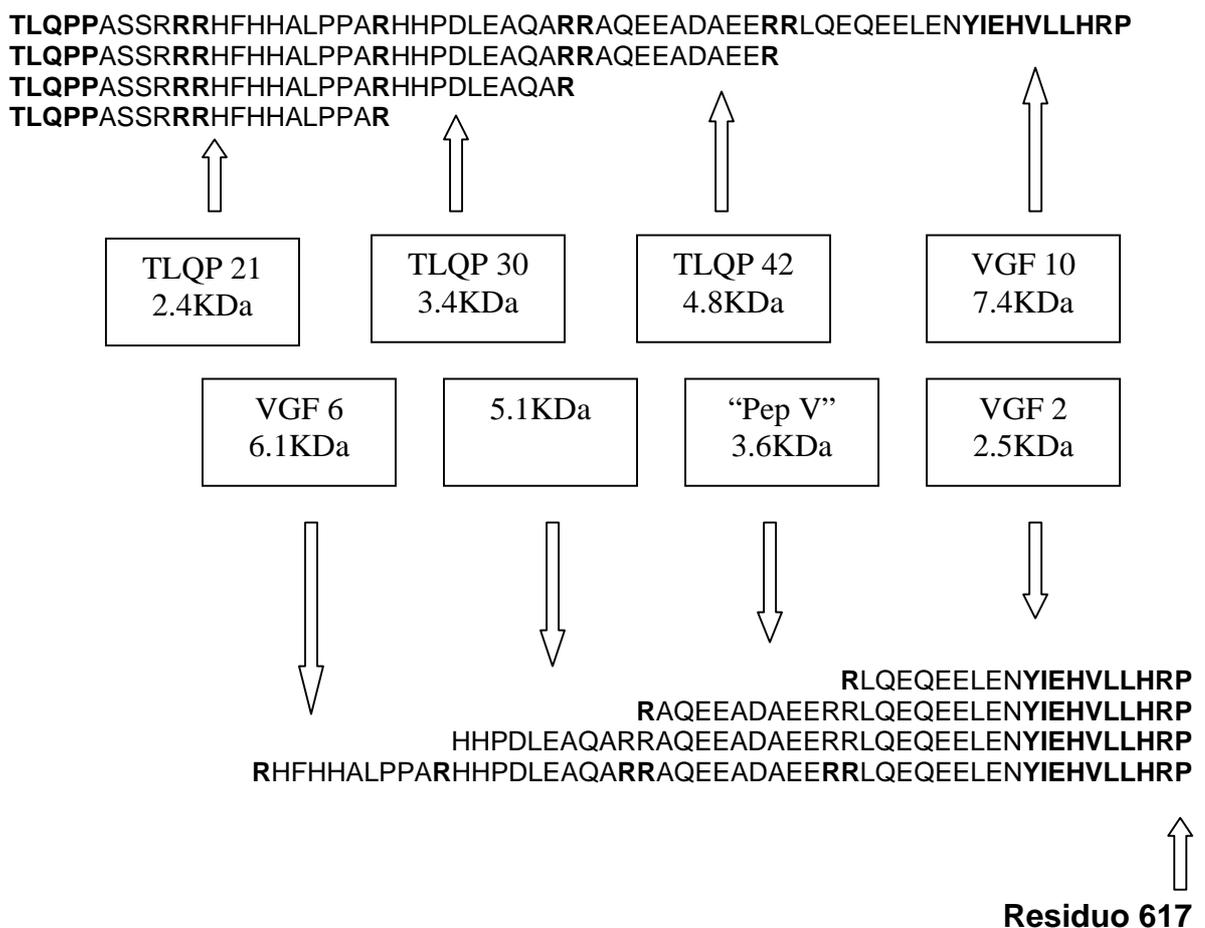


Fig. 4: Possibili forme clivate e pesi molecolari presenti nella sequenza di VGF dal residuo 556 al C-termino.

Saggiando estratti tissutali con ELISA per il C-termino di proVGF, riscontrammo peraltro un frammento di peso molecolare paragonabile a quello del “**peptide V**” già in precedenza sequenziato da ipofisi di bovino (Liu *et al.*, 1994) (vedi **Figura 4**). Infine, il surrene risulta contenere ulteriori forme molecolari di VGF-peptidi, sia nel bovino che nel suino: essi sono in fase di valutazione, ed in alcuni casi di caratterizzazione a confronto con peptidi sintetici di opportuna sequenza.

Quanto sopra riassunto appare dimostrare la processazione di pro-VGF nella ghiandola in esame, verosimilmente in risposta a stimoli di vario tipo anche esterni, specie correlati alle condizioni in cui i prelievi vennero effettuati: tra questi in particolare condizioni di stress ambientale, così come in rapporto al digiuno correlato alle procedure pre-abbattimento. Infatti, i risultati ottenuti dall’esperimento sui due gruppi di suini “a minimo stress” e “stressati” risultano assai suggestivi. In rapporto alle circostanze sperimentali (vedi in dettaglio nella sezione “Materiali e Metodi”), occorre tener presente alcuni aspetti tecnici che risulteranno familiari a chi tratti con qualche frequenza analisi su animali zootecnici: ad esempio, tutte le carcasse venivano sottoposte agli usuali trattamenti (passaggio in bagno d’acqua ad elevata temperatura, spazzolamento per rimozione delle setole, fiammeggiatura, infine suddivisione delle mezzene ed eviscerazione), risultandone un ritardo negli effettivi campionamenti di circa 20-30 minuti da stordimento-exanguinazione. Per converso, l’intera fase di stordimento-exanguinazione richiede non più di 20-25 minuti per lotti di 100 animali circa. Ne consegue che da un lato i tempi di “sopravvivenza in fase di stress ambientale severo” sono

compiutamente differenziati tra animali man mano e progressivamente abbattuti, dall'altro a tale tempo relativamente breve si aggiunge un "tempo di attesa" prima del campionamento e trattamento dei campioni nettamente più prolungato. Qualche considerazione ulteriore potrebbe comprensibilmente farsi in rapporto ai trattamenti che la carcassa subisce prima del campionamento, come sopra richiamati. A tutti gli effetti pratici, le nette differenze riscontrate risultano quindi un importante e strumentale punto di partenza. Comprensibilmente, occorrerà comunque prevedere quanto meno alcuni modelli sperimentali paralleli in animali sperimentali, nei quali le variabili aggiuntive sopra menzionate possano essere tenute sotto congruo controllo.

Riassumendo i risultanti dell'esperimento pilota "stress", si richiama il netto aumento osservato dei livelli di VGF tessutale nei maiali che avevano "atteso a lungo" quindi fortemente stressati, rispetto a quelli abbattuti pressochè immediatamente, di lunedì mattina, a sala di macellazione vuota e pulita. Tale incremento di VGF-peptidi fu riscontrato sia in termini di "livelli totali" di VGF in un intero surrene o per unità di peso tessutale (valori misurati col saggio per il C-termino e per il "TLQP"), che nelle rispettive forme molecolari osservate in cromatografia. Anche le diverse principali forme molecolari di VGF-peptidi, infatti, mostravano livelli di VGF-peptidi di basso peso molecolare (8-10KDa) nettamente inferiori negli animali sacrificati immediatamente e quindi a "minimo stress". Ne risulterebbe non soltanto un'attivazione rapida della biosintesi di proVGF, attribuibile almeno in larga misura a *vgf* mRNA già presente nelle cellule, stanti i tempi di risposta, ma anche la verosimile induzione del profilo di processazione e clivaggio a VGF-peptidi di basso peso molecolare.

I risultati da noi ottenuti concordano con precedenti studi nei quali era stato dimostrato un aumento dei livelli di VGF in ipotalamo di topi in risposta a stress da freddo (Chakraborty et al.,2006). Nell'insieme, quindi, appare sempre più verosimile l'ipotesi di un coinvolgimento di VGF-peptidi surrenalici e dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nei meccanismi di risposta allo stress ambientale.

Guardando al prossimo futuro e più avanti ancora, è assai auspicabile che i saggi da noi sviluppati e qui descritti, ed altri ancora sulla base dei numerosi e diversi anticorpi che già abbiamo prodotto, possano essere adattati alla misurazione di livelli sierici ed in altri liquidi biologici, di animali sperimentali, che di animali di interesse zootecnico anche nell'ambito delle note tematiche relative al "benessere animale" ed al suo monitoraggio, così come infine nell'uomo.

Ben si comprende, infatti, come quanto abbiamo riportato, in aggiunta a quanto discusso relativamente al gene *vgf*, a proVGF ed ai diversi e molteplici VGF-peptidi, sottolinei la potenziale utilità di tali analisi quantitative, o di un vero "profiling" di multipli VGF-peptidi in parallelo, con potenziale applicazione in vari e diversi contesti. Tra questi in particolare:

- Aspetti relativi all'adattamento omeostatico, incluso quello a condizioni di "stress" ambientale e verosimilmente fisico
- Controllo di alimentazione e metabolismo, anche in considerazione della possibile esistenza di VGF-peptidi ad azione differenziata
- Iperplasia neuro-endocrina, nella quale risultano nettamente aumentate le immunoreattività per vari epitopi ad oggi studiati di proVGF / VGF-peptidi (G Rindi, F D'Amato, G-L Ferri et al., submitted), e tumori.

Infine, si richiamano ormai numerosi studi di “mapping” proteomico comparativo svolti su liquor cerebro-spinale umano: risulta ormai ben evidente come vari e diversi VGF-peptidi siano ivi riscontrabili, e si modificino in netta, apparentemente anche selettiva riduzione in diverse malattie neuro-degenerative (morbo di Alzheimer: Carrette *et al.*, 2003; Sclerosi Laterale Amiotrofica: Pasinetti *et al.*,2006), così come in malattie neuro-psichiatriche quali la schizofrenia (di prima diagnosi: Huang *et al.*, 2006).

6. BIBLIOGRAFIA

- Alder J., Smita Thakker-Varia., Debra A. Bangasser., May Kuroiwa., Mark R., Plummer., Tracey J. Shors (2003)** *Brain-Derived Neurotrophic Factor-Induced Gene Expression Reveals Novel Actions of VGF in Hippocampal Synaptic Plasticity*. J. Neurosci., November 26, 2003 • 23(34):10800–10808
- Altar C.A., Pascal Laeng., Linda W. Jurata., Jeffrey A. Brockman., Andrew Lemire., Jeffrey Bullard., Yury V. Bukhman., Theresa A. Young., Vinod Charles., and Michael G. Palfreyman (2004)** *Electroconvulsive Seizures Regulate Gene Expression of Distinct Neurotrophic Signaling Pathway*. Brain Transcriptome after ECS J. Neurosci., March 17, 2004 • 24(11):2667–2677
- Baybis M, Salton S.R. (1992)** *Nerve growth factor rapidly regulates VGF gene transcription through cycloheximide sensitive and insensitive pathways*. FEBS Lett; 308 (2):202-6
- Bartolomucci A., La Corte G., Possenti R., Locatelli V., Rigamonti A. E., Torsello A., Bresciani E., Bulgarelli I., Rizzi R., Pavone F., D'Amato F. R., Severini C., Mignogna G., Giorgi A., Schininà M.E., Elia G., Brancia C., Ferri G.-L., Conti R., Cianio B., Pascucci T., Dell'Omo G., Muller E.E., Levi A., Moles A. (2006)** TLQP-21, a novel VGF-derived peptide, increases energy expenditure and prevents the early phase of diet-induced obesity. PNAS september 26 2006 Vol. 103 14584-14589.
- Barrett P., Alexander W. Ross., Ales Balik., Pauline A. Littlewood., Julian G. Mercer., Kim M. Moar., Tina Sallmen., Jan Kaslin., Pertti Panula., Sandrine Schuhler., Francis J. Ebling., Caroline Ubeaud., and Peter J.**

- Morgan (2005)** *Photoperiodic Regulation of Histamine H3 Receptor and VGF Messenger Ribonucleic Acid in the Arcuate Nucleus of the Siberian Hamster.* Endocrinology, April 2005, 146(4):1930–1939
- Berka JL, Kelly DJ, Robinson DB, Alcorn D, Marley PD, Fernley RT, Skinner SL (1996)** Adrenaline cells of the rat adrenal cortex and medulla contain renin and prorenin. Mol Cell Endocrinol 119:175-184
- Bornstein SR, Ehrhart–Bornstein M, Usadel H, Böckmann M, Scherbaum WA (1991)** Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. Cell Tissue Res 265:1-9
- Bornstein SR, Ehrhart–Bornstein M (1992)** Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells. Endocrinology 131:3126-3128
- Bornstein SR, Tian H, Haidan A, Bottner A, Hiroi N, Eisenhofer G, McCann SM et al. (2000)** Deletion of tyrosine hydroxylase gene reveals functional interdependence of adrenocortical and chromaffin cell system in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 97:14742-14747
- Bonni A, Ginty D.D., Dudek H., Greenberg M.E. (1995).** *Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signal.* Mol Cell Neurosci; 6:168-183
- Brancia C., Nicolussi P., Cappai P., La Corte G., Possenti R., and Ferri G-L., (2005)** *Differential expression and seasonal modulation of VGF peptides in sheep pituitary.* J.O. Endocrinology **186**, 97–107

- Canu N., Possenti R., Ricco A.S., Rocchi M., Levi A. (1997)** *Cloning, structural organization analysis, and chromosomal assignment of the human gene for the Neurosecretory Protein VGF.* Genomics 45,443-446.
- Canu N, Possenti R, Rinaldi AM, Trani E, Levi A (1997)** Molecular cloning and characterization of the human VGF promoter region. J Neurochem 68, 1390-1399
- Carrette O., Isabelle Demalte., Alexander Scherl., Oezkarn Yalkinoglu., Garry Corthals., Pierre Burkhard., Denis F. Hochstrasser., and Jean-Charles Sanche (2003)** *A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease.* Proteomics, 3, 1486-1494
- Chakraborty T.R., Tkalych O., Nanno D., Garcia A.L., Devi L.A., Salton S.R., (2006)** Quantification of VGF and pro- SAAS- derived peptides in endocrine tissues and the brain, and their regulation by diet and cold stress. Brain Res. Aprile 20 Vol 1089, 21-32
- Cocco C., Melis G.V., Ferri G-L. (2003)** *Embedding media for cryomicrotomy: an applicative reappraisal.* Appl.Immunohistochem, Mol. Morphol .11(3): 274-280.
- Delarue C, Contesse V, Lenglet S, Sicard F, Perraudin V, Lefebvre H, Kodjo M et al (2001)** Role of neurotransmitters and neuropeptides in the regulation of the adrenal cortex. Rev Endocr Metab Dis 2:253-267
- Dyce K.M., Sack O.W., Wensing C.G.G., (2002)** *Textbook of Veterinary Anatomy.* Third edition SAUNDERS

- Ehrhart–Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP (1998)** Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 19:101-143
- Ferri G-L, Gaudio R.M., Castello I.F. et al: (1995).** *Differential processing of the neuro-endocrine protein “VGF” in mammalian hypophysis.* Soc. Neurosci (Abstract), vol 21, part 3, p1628
- Ferri G-L, Gaudio R-M, Cossu M., Rinaldi A.M., Polak J.M., Berger P. and Possenti R. (1995).** *The “VGF” Protein in rat Adenohypophysis:Sex Differences and Changes during the Estrous cycle and after Gonadectomy* .*Endocrinology.* vol 136,2244-2251
- Ferri G.L, Gaudio R.M.,Tirolo C.,Anedda A.,and Corpino R.(1995)** Simultaneous Dual-Fluorochrome Visualization for Co-Localization Studies. *Cell Vision* vol.2 N°5:413-419
- Ferri G-L., Levi A., Possenti R. (1992).** *A novel neuroendocrine gene product: selective VGF8a gene expression and immunolocalization of the VGF protein in endocrine and neuronal population.* *Mol Brain Res* 13:139-143
- Ferri G-L. and Possenti R. (1996)** *VGF Neurotrophin-Inducible Gene Expressed in Neuroendocrine Tissues,* *Trends Endocrinol. Metab.;* 7:233-239
- Ferri G-L, Papadia C., Cocchia D., Polak J.M. (1987)** *Alluminium foil moulds for cryostat blocks.* *Stain Technol* 62:59-60-
- Gallo–Payet N, Pothier P, Isler H (1987)** On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible role in adrenocortical function. *Biochem Cell Biol* 65:588-592

- Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, Salaun-Martin C. (2005)** *Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes.* Diabetes Metab. 2005 Jun;31(3 Pt 1):233-42.
- Garcia A.L., Shan-Kuo Han., William G. Janssen., Zin Z. Khaing., Timothy Ito., Marc J. Glucksman., Deanna L. Benson., and Stephen R. J. Salton., (2005)** *A Prohormone Convertase Cleavage Site within a Predicted alpha-Helix Mediates Sorting of the Neuronal and Endocrine Polypeptide VGF into the Regulated Secretory Pathway.* JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOLUME 280•NUMBER 50•DECEMBER 16, 2005
- Grasselli F., Gaiani R., Tamanini C. (1992)** *Seasonal variation in the reproductive hormones of male goat.* Acta Endocrinol (Copenh) 126 (3): 271-5
- Hahm S., Kelley K.A., Salton S.R.J., (1997),** *VGF -deficient mice display decreased body size, reduced fertility, nurturing deficits and increased mortality.* 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans LA, 1997, p 798.4 (abstract)
- Hahm S, Mizuno T, Kelley KA Mobbs CV, Salton SRJ, (1998)** Knockout mice are hypermetabolic and have the neuroendocrine profile of fasted mouse. 28th Annual Meeting of the society for Neuroscience, Los Angeles CA, p 442.12 (Abstract)
- Hahm S., Mizuno T.M., Wu T.I., Wisor J.P., Priest C.A., Kozoc C.A., Boozer C.N., Peng B., Mcevoy R.C., Good P., Kelley K.A., Takahashi J.S., Pintar J.E., Roberts J.L., Mobbs C.V. and Salton S.R.J., (1999).** *Targeted deletion of the gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance.* Neuron 23, 537-548.

- Hahm S., Fekete C., Mizuno T.M., Windsor J., Yan H., Boozer C.N., Lee C., Elmquist J.K., Lechan R.M., Mobbs C.V., and Salton S.R.J. (2002).** *VGF is Required for obesity induced by Diet, Gold Thioglucose Treatment, and Agouti and is Differentially Regulated in Pro-Opiomelanocortin-and Neuropeptide Y-Containing Arcuate Neurons in Response to Fasting.* *J.Neurosci.*22(16):6929-6938.
- Halban F. and Irminger J.C. (1994)** *Sorting and processing in secretory protein* *Biochem.J.* 299, 1-18.
- Haug W.M., Gibson S.J., Facer P., Gu J., Polak J.M. (1983).** *Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-Lysine as slide coating.* *Histochemistry;* 77:275-9
- Hawley R.J., Scheibe R.J., Wagner J.A., (1992).** *NGF induces the expression of the VGF gene through a c-AMP response element.* *J.Neurosci* 12:2573-2781.
- Herschman H.R. 1989.** *Extracellular signals, transcriptional responses and cellular specificity.* *Trends Biol.Sci.*14: 455-458.
- Hevroni D, Rattner A., Bundman M., Lederfein D., Gabarah A., Mangelus M., Silverman M.A., Kedar H., Noar C., Kornuc M., Hanoch T., Serger R., Theill L.E., Nevidi E., Richter-Levi G., Citri Y. (1998).** *Hippocampal plasticity involves extensive gene induction and multiple cellular mechanism.* *J Mol Neurosci;* 32:55-62.
- Huang Jeffrey T.J., Leweke F. M., Oxley D., Wang L., Harris N., Keothe D., Gerth W. C., Nolden B M., Gross S., Schreiber D., Reed B., Bahn S.,**
 Disease Biomarkers in Cerebrospinal Fluid of Patient with First –Onset Psychosis
PLOS Medicine 7 Novembre (2006).

- Kanemasa, K, Okamura H, Kodama T, Iyata Y. (1995)** Induction of VGF mRNA in neurons of the rat nucleus tractus solitarius and the dorsal motor nucleus of the vagus in duodenal ulceration by cysteamine. *Mol Brain Res* 32:55-62
- Laslop A., Mahata SK., Wolkersdorfer M., Mahata M., Srivastava M., Seidah NG., Fischer-Colbrie R., Winkler H., (1994).** Large dense-core vesicles in rat adrenal after reserpine: levels of mRNAs of soluble and membrane-bound constituents in chromaffin and ganglion cells indicate a biosynthesis of vesicles with higher secretory quanta. *J. Neurochem.* Jun;62 (6):2448-56
- Levi A., Eldridge J.D., Paterson B.M. (1985)** *Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor.* *Science* 229:393-395
- Levi-Montalcini, R. and P.U. Angeletti (1968)** *The nerve growth factor* *Physiol. Rev.*48:534-569
- Levi A., Gian-Luca Ferri., Elizabeth Watson., Roberta Possenti., and Stephen R. J. Salton., (2003)** *Processing, Distribution, and Function of VGF, a Neuronal and Endocrine Peptide Precursor.* *Cellular and Molecular Neurobiology*, Vol. 24, No. 4, August 2004
- Liu J.W., Andrews P. C., Mershon J.L., Yan C., Allen D.L., and Ben-Jonatan N. (1994)** *Peptide V: a VGF-Derived Neuropeptide purified from Bovine posterior Pituitary.* *Endocrinology* 135: 2742-2748.
- Mahata SK, Mahata M., Fischer-Colbrie R., and Winkler H (1993)** *Messenger RNA levels of chromogranin B, secretogranin II, and VGF in rat brain after AF64A-induced septohippocampal cholinergic lesion.* *J Neurochem.*61, 1648-1656.

- Mbikay M., Seidah N.G., Chretien M. (2001)** *Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions.* Biochem J. Jul 15;357(Pt 2):329-42.
- Miyatake Y., Okumura N., Nagai K., Nakagawa H. (1993).** *The signal transduction pathway for VGF expression due to NGF is different from that due to b FGF in PC12 cell.* Biochem Mol Biol Int 30:231-236
- Newton SS., Emily F. Collier., Joshua Hunsberger., David Adams., Rose Terwilliger., Emmanuel Selvanayagam., and Ronald S. Duman., (2003)** *Gene Profile of Electroconvulsive Seizures: Induction of Neurotrophic and Angiogenic Factors.* ECS Gene Profile J. Neurosci 23(34):10841–10851
- Possenti R., Di Rocco G.,Nasi S.,and Levi A (1992).** *Regulatory elements in the promoter region of vgf, a nerve growth factor-inducibile gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 3815-3819
- Possenti R., Eldridge J.D., Paterson B.M., Grasso A, Levi A, (1989)** *A protein induced by NGF in PC 12 cells is stored in secretory vesicles and release through the regulated pathway.*EMBO J 8:2217-2223.
- Possenti R., Rinaldi A.,M., Ferri G-L., Borboni P., Trani E and Levi A (1999)** *Expression, processing, and Secretion of the Neuroendocrine VGF Peptides by INS-1 Cells.* Endocrinology Vol 140 n.8 3727-3735.
- Rossi A, Granata F, Augusti Tocco G, Canu N, Levi A, Possenti R, (1992)** *Expression in murine and human neuroblastoma cell lines of VGF, a tissue specific protein.* Int J Dev Neurosci 10:527-534
- Salton S.R.J., Ferri G.L. Hahm S.,Snyder S.E., Wilson A.J.,Possenti R and Levi A. (2000)** *VGF: A novel role for this neuronal and neuroendocrine*

polypeptide in the regulation of energy balance. Front.neuroendocrinol. 21, 199-219.

Salton S.R.J., Fischberg D.J. and Dong K. (1991) *Structure of the gene encoding VGF, a nervous system-specific mRNA that is rapidly and selectively induced by nerve growth factor in PC12 cells.* Mol.Cell.Biol. 11, 2335-2349.

Salton Stephen R. J., M.D., PH.D. (2003) *Neurotrophins, Growth-Factor-Regulated Genes and the Control of Energy Balance.* Rev.

Snyder S.E., Pintar J.E., and Salton S.R., (1998). *Development expression of VGF mRNA in the prenatal and postnatal rat* J Comp. Neurol.394, 64-90.

Snyder S.E.,B Peng., J E Pintar and S R J Salton., (2003) *Expression of VGF mRNA in developing neuroendocrine and endocrine tissue.* Journal of Endocrinology (2003) **179**, 227–235

Steiner DF, Smeekens SP, Ohagi S, Chan SJ (1992) The new enzymology of precursor processing endoproteases. J Biol Chem 267:23435 – 23438

Succu S., Cristina Cocco., Maria Stefania Mascia., Tiziana Melis., Maria Rosaria Melis., Roberta Possenti., Andrea Levi., Gian Luca Ferri., and Antonio Argiolas., (2004) *Pro-VGF-derived peptides induce penile erection in male rats: possible involvement of oxytocin.* Federation of European Neuroscience Societies, European Journal of Neuroscience, 20, 3035–3040

Tatemoto K.and Mutt.V., (1978) *Chemical determination of polypeptide hormones.* Proc Natl Acad Sci USA 75(9):4115-9.

Tilemans D., Andries M., Proost P., Devreese B., Van Beeumen J., Deneef C., (1994) *In vitro evidence that an 11-kilodalton N-terminal fragment of proopiomelanocortin is a growth factor specifically stimulating the*

development of lactotrophs in rat pituitary during postnatal life. Endocrinology
135:168-174

Trani E, Ciotti MT, Rinaldi AM, Canu N., Ferri GL, Levi A .and Possenti R., (1995) *Tissue-specific processing of neuroendocrine protein VGF.* J. Neurochem. 65, 2441-2449

Trani E., A. Giorni., N. Canu., G. Amadoro., A. M. Rinaldi., P. A. Halban., G.-L. Ferri, R. Possenti., M. E. Schinina., and A. Levi., (2002) *Isolation and characterization of VGF peptides in rat brain. Role of PC1/3 and PC2 in the maturation of VGF precursor.* International Society for Neurochemistry, Journal of Neurochemistry, 81, 565–574

Van den Pol A.N., Bina K., Decavel C., and Ghosp P. (1994) *VGF expression in the brain.* J Comp.Neurol, 347, 455-469

Van den Pol A.N., Decavel C., Levi A., (1989) *Hypothalamic expression of a novel gene product, VGF: immunocytochemical analysis.* J Neurosci. 9: 4122-4137

Watson E., Haham S., Mizuno M.T., Windsor J., Montgomery C., Scherer E.P., Mobbs V.C., and Salton R.j.S., (2005) *VGF Ablation Blocks the Development of Hyperinsulinemia and Hyperglycemia in Several Mouse Models of Obesità.* Endocrinology 146(12): 5151-5163

Wisor J.P. and Takahashi J.S. (1997) *Regulation of the VGF gene in the golden hamster suprachiasmatic nucleus by light and the circadian clock.* J Comp Neurol. 378, 229-238