



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Biomediche Nutrizionali e Metaboliche

Ciclo XXIX

**VGF precursore ed eterogenei VGF-peptidi
e loro risposta ad aspetti nutrizionali**

Settore scientifico disciplinare di afferenza BIO/16

Presentata da:

Dott.sa Giulia Corda

Coordinatore Dottorato:

Prof. Sebastiano Banni

Tutor:

Prof. Gian Luca Ferri

Co-Tutor:

Dott.sa Cristina Cocco

Esame Finale A.A. 2015-2016

Tesi discussa nella sessione d'esame marzo - aprile 2017

*To raise new questions,
new possibilities,
to regard old problems from a
new angle
requires creative imagination
and marks real advance
in science.*

Sollevare nuove domande,
nuove possibilità,
riguardo a vecchi problemi da un
nuovo punto di vista
richiede immaginazione
e segna un reale avanzamento
della scienza.

A. Einstein

*Questa tesi è dedicata a tutti
coloro che mi hanno sostenuto in
questo triennio.*

*A Simone, a Silvia, a Stefania, a
Mamma e Papà, ai miei zii Carla,
Gisa, Ciccio, Gianni, Cicci,
Stefano, Francesco.*

*Alle mie colleghe Laura, Roberta,
Paola, Cristina, Mena, Carla,
Barbara e Manuela.*

*Ma soprattutto questo lavoro è
dedicato a colei che mi ha dato
l'esempio di non arrendermi mai:*

per te Nonna!

INDICE

ABSTRACT	i
1. INTRODUZIONE	1
1.1 La scoperta di <i>vgf</i>	2
1.2 Struttura del gene <i>vgf</i>	4
1.3 La sequenza primaria di <i>vgf</i>	6
1.4 Processazione post-traduzionale di VGF	9
1.5 Localizzazione di VGF e VGF-peptidi	13
1.6 Modulazione dell'espressione genica	16
1.7 Azioni e attività biologiche di VGF	19
1.7.1 VGF nei meccanismi metabolici e di omeostasi	20
1.7.2 VGF nelle malattie dismetaboliche	23
1.8 Cricità riscontrate nello studio di VGF e dei VGF peptidi	25
2. SCOPO DEL LAVORO	28
3. MATERIALI E METODI	31
3.1 Anticorpi	32
3.1.1 Frazionamento IgG	33
3.1.2 Purificazione per affinità	34
3.2 Animali	39
3.3 Immunoistochimica	41
3.3.1 Preparazione dei tessuti	41
3.3.2 Immunocolorazioni	41
3.4 Saggi ELISA	45
3.4.1 Estrazioni Campioni	45

3.4.2 Procedura ELISA	45
3.5 Microscopia e acquisizione di immagini	48
3.5.1 Analisi d'immagine	48
3.5.2 Analisi di Co-localizzazione	50
3.6 Analisi statistica	51
4. RISULTATI E COMMENTI	52
4.1 Purificazione di Anticorpi	53
4.2 Risultati sperimentali: Plasma	58
4.3 Analisi tessutale su pancreas	61
4.3.1 Pancreas, Gruppo sperimentale 1	61
4.3.2 Pancreas, Gruppo sperimentale 2	66
4.4 Analisi tessutale nell'ipotalamo	72
5. DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI	86
5.1 Discussione generale	87
5.1.1 Purificazioni per affinità ed immunistochemica	87
5.1.2 VGF peptidi nel plasma	88
5.1.3 VGF peptidi nel pancreas	90
5.1.4 VGF peptidi nell'ipotalamo	92
5.2 Conclusi	96
6. RINGRAZIAMENTI	98
7. BIBLIOGRAFIA	101

ABSTRACT

vgf is an inducible gene implicated in the regulation of energy balance. Its derived primary gene product, VGF, acts as a multi-functional precursor, where from a modulated diversity of VGF peptides are differentially produced by post-translational processing. In the present context, it is relevant to note that chronic administration of the VGF derived peptide TLQP-21 delayed the onset of overt diabetes in Zucker diabetic fatty rats, and potentiated glucose stimulated insulin secretion (GSIS) from rat and human islets, resulting in improved glucose tolerance *in vivo*. The C-terminally extended form TLQP-62 distinctly stimulated insulin secretion from insulinoma cell lines. Nonetheless, the precise localizations and *in vivo* response/modulation of several diversely acting VGF-peptides have been scarcely clarified.

My aim has been to address the response to glucose of a number of VGF peptides, with a focus on: three peptide stretches within the ~128 amino acid C-terminal domain of the precursor (TLQP-21; NAPP-19 and VGF C-terminus), and the QQET-30 peptide. Thus, I have carried out an immunohistochemical and image-quantification study on the endocrine pancreas and the hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus (SCN). In parallel, the same peptides were measured in plasma by ELISA. Antisera/antibodies specific for peptides related to the VGF C-terminus, and to the known VGF cleavage products: TLQP-21 / TLQP-62, NAPP-19, and QQET-30 were used. Antibodies were directed to the relevant N- or C-terminal end of the mentioned cleaved peptides. Affinity purification procedures (including sequential and differential affinity steps) were used to optimise antibodies and their application/s, as well as to characterise their molecular specificity under non-competitive conditions.

Mice (Group 1, male, 12 weeks) underwent a period of starvation (18h), hence received (*i.p.*) a glucose load, or saline, and were sacrificed 30 or 120 min later. A pilot study (Group 2) was carried out on high-fat diet obese mice, similarly exposed to a glucose load. As expected, the glucose load resulted in a glicemia peak at 30 min, with return toward basal values at 120 min. TLQP-21 like peptide/s showed a progressive increase in plasma 30 and 120 min after the glucose load, in parallel to a major pancreatic islets degranulation at 30 min, and a reconstitution of their tissue stores at 120 min. Such peptide/s were not produced in the hypothalamic SCN, at least in their known, N-

terminally cleaved form/s. Conversely, VGF C-terminus, QQET-30 and NAPP-19 related peptides were found to be reduced in plasma at 30 min, and returned toward basal values after 120 min. QQET-30 related peptides were not revealed in pancreatic islets, while showing a negative modulation (reduced immunoreactivity) in Suprachiasmatic Nucleus 120 min after the glucose load. A similar trend was revealed in SCN for NAPP-19 related peptides. As to obese mice (Group 2), TLQP-21 related peptides showed a clear cut increase *vs.* non-obese animals, both under basal and glucose-load conditions, associated with a blunted response to glucose in both pancreatic islets and plasma. In the same (obese) mice, NAPP-19 like peptides were somewhat more abundant in pancreatic islets and reduced in plasma, with little response to glucose. On the whole, VGF peptides appeared to show a significant response to the acute administration of glucose, with distinct differential patterns across the peptides studied. Of especial interest were TLQP-peptides, which showed a profile suggestive of prompt release to plasma upon the glucose load (30 min). Such pattern seemed to be maintained in the later phase studied (120 min), probably in connection with *de novo* biosynthesis and continuing release to plasma. In the obesity/diabetes model studied, TLQP peptides were distinctly accumulated in pancreatic islets, in parallel with a virtually absent response to glucose in plasma, suggestive of their deranged release. Taken together with known evidence of an insulinotropic action of certain TLQP related peptides, the above results may be of relevance to the neuroendocrine response to an acute glucose load, hence to the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes.

1. INTRODUZIONE

1.1. La scoperta di *vgf*

vgf o *vgf8a* è il nome (non acronimico) che è stato attribuito ad un gene originariamente riconosciuto per la sua inducibilità da parte di NGF (Nerve Growth Factor, capostipite dei fattori di crescita neuronale, scoperto da Rita Levi-Montalcini nel 1968).

L'NGF fa parte della classe delle neurotrofine a cui appartengono anche altri fattori di crescita chiamati BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor); NT3 (Neurotrophin 3); e NT4/5 (Neurotrophin 4/5).

Queste neurotrofine sono proteine che promuovono la proliferazione, il differenziamento, la sopravvivenza e mantenimento, nonché modulazione funzionale del fenotipo di vari tipi di neuroni del Sistema Nervoso Centrale (SNC) e periferico (SNP).

Altre funzioni delle neurotrofine sono il rilevante effetto neuroprotettivo che esercitano su vari tipi neuronali, il che le rende interessanti nei quadri di malattie neurodegenerative come ad esempio il morbo di Alzheimer e quello di Parkinson, nonché in altre patologie neurologiche quali la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), e recentemente in disturbi del comportamento alimentare.

Una delle linee cellulari più utilizzate per studiare le neurotrofine ed il differenziamento neuronale è una linea derivata da feocromocitoma di ratto. Tali linea prende il nome di PC12, e le sue cellule in assenza di NGF (vedi oltre) si presentano tonde, piccole (5-10µm), contengono poco citoplasma e si duplicano in poco più di 48 ore.

Le PC12 derivano da cellule della midollare del surrene, non richiedono NGF per sopravvivere, ma in assenza di questa neurotrofina, mostrano aspetto epitelioide e crescono a confluenza. L'aggiunta di NGF nel terreno di coltura induce il differenziamento di tali cellule in un fenotipo neuronale, caratterizzato dall'estensione di neuriti. Tale modificazione si associa ed è in larga parte mediata dall'espressione di

geni specifici appunto studiati quali geni necessari, o addirittura caratterizzanti di cellule tipo neuronale.

I geni indotti da NGF sono stati suddivisi in due categorie in base alle tempistiche necessarie alla loro induzione:

- Geni “*Immediate-Early*”: di induzione molto precoce, in larga parte codificano fattori di trascrizione, e sono parte del sistema di risposta cellulare (Herschman, 1989);
- Geni “*Delayed-Early*”: ovvero quei geni indotti con cinetica ritardata dopo l’accumulo dei prodotti degli “*Immediate-Early genes*”.

Il gene *vgf* appartiene a quest’ultima categoria e la sua espressione dipende in modo essenziale dalla sintesi proteica.

Un incremento a livello dell’ mRNA di *vgf* è evidente dopo circa 30/60 minuti dalla somministrazione dell’ NGF nelle PC12 e arriva a plateau (50 volte i valori di base) dopo 5/8 ore (Levi et al., 1985).

Oltre alla neurotrofina NGF ci sono anche altri fattori che si sono dimostrati efficaci nell’indurre *vgf*, come ad esempio bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Miyatake et al., 1993), l’interleuchina 6 (IL-6), cAMP, BDNF, EGF (Epidermal Growth Factor), insulina e depolarizzazione cellulare (Salton et al., 1991; Possenti et al., 1992; Hawley et al., 1992).

Tutti questi fattori però inducono il gene di *vgf* in maniera nettamente minore (5-10 volte rispetto ai valori basali) rispetto all’NGF nel medesimo sistema cellulare.

Ulteriori studi praticati sulle PC12 hanno dimostrato che somministrando NGF alle cellule per tempi lunghi (9-25 ore) l’RNA messaggero di *vgf* diminuisce ed è meno stabile (Baybis and Salton, 1992).

1.2. Struttura del gene *vgf*

Il gene *vgf* o *vgf8a* è stato scoperto nel 1985 da Andrea Levi. Esso è stato originariamente identificato come un frammento di cDNA isolato dalle cellule PC12 trattate con NGF. Il gene *vgf* è presente come singola copia (Salton et al., 1991) ed è mappato nell'uomo sul cromosoma 7q22 (Canu et al., 1997), nel topo sul cromosoma 5 (Hahm et al., 1999).

La regione codificante del gene consta di un esone e di un introne che si trova in posizione 5' (Salton et al., 1991; Hawley et al., 1992; Possenti et al., 1992).

Nonostante sia presente una certa eterogeneità con produzione di due diversi mRNA, essa non coinvolge la porzione codificante del gene, ed i due mRNA codificano entrambi per una proteina precursore chiamata VGF.

Per quanto la presente dissertazione si focalizzi su aspetti post-traduzionali, piuttosto che di regolazione e modulazione trascrizionale, segue qui un breve resoconto relativo alla regione promotrice, la quale contiene:

- una sequenza TATAA in posizione -32;
- una regione palindroma di 14 paia di basi (bps) 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 sequenza CCAAT all'interno di una regione palindroma di 13 bps a -140;
- 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 bps risultano importanti per l'induzione da NGF. Esso è capace di indurre la fosforilazione del fattore di trascrizione CREB in un sito chiave (Ser133), attivando selettivamente la risposta di geni tardivi di

cui fa parte anche *vgf* (Bonni et al., 1995). Un altro sito di legame il “G(S)G” che si trova tra la sequenza TATAA e il sito di inizio della trascrizione sembra fondamentale per l’induzione da NGF che però non avviene con c-AMP. Infine la sequenza destabilizzante potrebbe essere in qualche modo collegata alla riduzione di mRNA per VGF vista dopo lunga stimolazione da NGF (Baybis and Salton., 1992).

Il sequenziamento del gene *vgf* ha rivelato che esso codifica per un prodotto primario del peso molecolare di circa 65kDa, che migra, se sottoposto a western blot, a circa 90kDa (Possenti et al., 1989).

1.3. La sequenza primaria di *vgf*

Il prodotto primario derivato dal gene *vgf* è una proteina chiamata VGF, o talvolta, nel passato pro-VGF a sottolineare il suo ruolo predetto e successivamente dimostrato quale precursore. Essa è costituita da 617 aminoacidi (aa) nel ratto e nel topo (Salton et al., 1991) e da 615 aa nella specie umana (sequenza in Fig. 1)

Tra le specie umana e quelle di ratto / topo c'è un'omologia pari all'85% (Review: Ferri et al., 2011). Inoltre, successivi studi hanno evidenziato che la sequenza di *vgf* umana è simile, se non uguale, alla sequenza reperita in altri animali, come ad esempio nei bovini, nella cui neuroipofisi è stato trovato un peptide corrispondente alla sequenza C-terminale del VGF tale regione viene detta peptide V o AQEE-30, essa possiede gli stessi 30 aminoacidi sia nell'uomo che nel bovino (Liu et al., 1994). Ulteriori studi hanno inoltre trovato somiglianze di sequenza anche nei primati e negli equini (Review: Ferri et al., 2011).

La sequenza aminoacidica primaria presenta alcune peculiarità degne di nota:

- Una sequenza leader di 22 aa con una regione idrofobica nella regione amminotermine, che promuove la traslocazione all'interno del reticolo endoplasmatico;
- Numerosi *stretches* contenenti due o più residui basici (Arg e/o Lys, o R/K in notazione a singola lettera), o sequenze correlate (Arg-Pro-Arg, o R-P-R; in posizione 555). Tali siti sono stati identificati come siti di clivaggio proteolitico che può avvenire grazie ad enzimi di processazione;
- Una sequenza Ala-Gly-Arg-Arg (A-G-R-R) che mostra un residuo glicina immediatamente a monte di un sito di potenziale clivaggio. Questa sequenza suggerisce che sia possibile da qui produrre un peptide amidato al suo estremo C-terminale;

- Alto contenuto di prolina (11%). Questa caratteristica rende VGF simile alle proteine neuroendocrine che vengono chiamate secretine o cromogranine;
- Alto contenuto di acido aspartico (14%) e glutammico in una ristretta zona della molecola che la rendono acida.

Sulla base della sequenza, la proteina VGF non ha similitudini con altri prodotti noti, Questo conferma la sua unicità, tanto che VGF può rappresentare il precursore di una nuova famiglia di peptidi.

VGF, come già detto sopra, viene spesso associato alla famiglia delle secretine o cromogranine, in rapporto alla loro comune localizzazione selettiva in granuli secretori neuro-endocrini.

La proteina VGF e/o i prodotti derivati dal suo clivaggio, VGF peptidi, possono essere secreti seguendo la via regolata: il processo implica la scissione in frammenti peptidici attraverso processi proteolitici. Tale scissione / clivaggio viene favorito da enzimi che riconoscono specifiche sequenze a monte o a valle, anche eventualmente a qualche distanza dal sito di-basico (Salton et al., 1991), in parallelo al trasporto in vescicole secretorie, con finale accumulo nelle stesse cellule e/o secrezione in rapporto a stimoli (Possenti et al., 1999). Giova qui notare brevemente che sono oggi riconosciuti anche VGF peptidi necessariamente derivanti da clivaggio in siti mono-basici (un singolo aminoacido Arg or Lys).

Fig.1: VGF: sequenza UMANA e di RATTO (Salton SRJ; J Neurochem 1991; 57: 991-996).

```

RAT  MKTFTLPASV LFCFLLLRG LGAAPPGRSD VYPPPLGSEH NGQVAEDAVS  50
HUM  --ALR-S--A --_----N-- -----PE AQ---S--- KEP--G---P  49
AT   RPKDDSVPEV RAARNSEPQD QGELFQGVDP RALAAVLLQA LDRPASPPAV  100
HUM  G--G-A--- -G----- E----- -----_  98
RAT  PAGSQQTPE EAAEALLTES VRSQTHSLPA SEIQASAVAP PRPQTQDNDP  150
HUM  -S----PE- -----T ----- PESPEP--_-- ----PE-G-  147
RAT  EADDRSEELE ALASLLQELR DFSPSNAKRQ QETAAAETET RHTLTRVNL  200
HUM  --S-P----- -----S----- -----  197
RAT  ESPGPERVWR ASWGEFQARV PERAPLPPSV PSQFQARMSE NVPLPETHQF  250
HUM  ----- ----- -----PA -----PD SG-----K-  247
RAT  GEGVSSPKTH LGETLTPLSK AYQSL SAPFP KVRRLEGSFL GGSEAGERLL  300
HUM  ----- --A-A--- --GVA--- -A-P-SAL- -----  297
RAT  QQGLAQVEAG RRQAEATRQA AAQEERLADL ASDLLQYLL QGGARQDLG  350
HUM  ----- ----- ----- -----G--  347
RAT  GRGLQETQQE RENER_EEEAE QERRGGGEDE VGEEDDEAAE AEAEAEAAER  400
HUM  -----AAE- --SA-E-----E_R -----  398
RAT  ARQNALLFAE EEDGEAGAED KRSQEEAPGH RRKDAEGTEE GGEEDDDDEE  450
HUM  ----- ----- -----T--- --E----- --E_----  447
RAT  MDPQTIDSLI ELSTKLHLPA DDVVSIEEV EEKRRKKNANA PPEPVPPPRA  500
HUM  ----- ----- ----- -----  497
RAT  APAPTHVRSP QPPPPAP_A_RD ELPDWNEVLP PWDREEDVFP PPGPYHPFPN  550
HUM  ----- -----APA-- -----Y -----  548
RAT  YIRPRTLQPP ASSRRRHFFH ALPPARHHPD LEAQAARRAQE EADAEERRLLQ  600
HUM  ----- SAL---Y- ---S--Y-G R----- --E-----  599
RAT  EQEELNYIE HVLLHRP 617
HUM  ----- --R-- 615

```

1.4. Processazione post-trasduzionale di VGF

Come già detto precedentemente la proteina VGF presenta numerose coppie di aminoacidi basici. Questi vengono considerati siti preferenziali di clivaggio, il quale avviene grazie a convertasi specifiche (PC1 e PC1/3).

Nel corso degli anni vari studi hanno identificato e isolato differenti frammenti di VGF in tessuti neuroendocrini (Fig 2.).

Uno strumento fondamentale è stata qui la produzione di anticorpi altamente specifici, diretti contro ristretti segmenti aminoacidici selezionati in base alla sequenza primaria di VGF ed ai siti di potenziale clivaggio, o clivaggio-amidazione sopra menzionati.

Tra questi in particolare un anticorpo indirizzato contro la sequenza C-terminale della proteina (sequenza di ratto / topo), che ha rivelato la presenza non solo di un polipeptide ad alto peso molecolare (90kDa), riconducibile all'intera proteina, ma anche la presenza di peptidi più piccoli (di circa 20kDa e 10kDa, rispettivamente) in omogenati di cervello, come pure in estratti di colture primarie di granuli cerebellari, ed in alcuni tessuti endocrini, tra cui linee cellulari ipofisarie ed ipotalamiche, nonché linee cellulari pancreatiche (Possenti et al., 1999; Trani et al., 1995). La regione C-terminale di VGF è caratterizzata da notevole conservazione della sequenza tra le specie da cui il gene è stato ad oggi sequenziato. Infatti si osserva una singola sostituzione aminoacidica in posizione -3, tra la sequenza umana in cui vi è un residuo arginina (Arg₆₁₃), e quella di ratto o topo, in cui vi è un residuo istidina (His₆₁₅) (Salton et al., 2000).

Utilizzando procedure di immunopurificazione fondate sul suddetto anticorpo in HPLC-massa e Massa-Massa sono stati identificati, isolati e sequenziati vari peptidi di basso peso molecolare a partire da estratti di cervello di ratto.

Almeno alcuni di tali peptidi risultano essere prodotti in seguito a clivaggio di un inusuale, specifico sito R₅₅₃P₅₅₄R₅₅₅ (numerazione corrispondente alla sequenza del

ratto), localizzato in un dominio relativamente prossimo al C-termino di VGF (Trani et al., 2002).

Un peptide correlato al suddetto sito di clivaggio R-P-R è il peptide: “TLQP-21”, così denominato perché composto dei 21 aminoacidi susseguenti alla sequenza “TLQP” (Thr-Leu-Gln-Pro) al suo estremo N-terminale. Esso risulta biologicamente attivo sulla muscolare dello stomaco di ratto, determinandone la contrazione (Severini et al., 2009). Il medesimo peptide iniettato in ratti intracerebroventricolarmente (*i.c.v.*) ha portato alla diminuzione della massa grassa associata ad aumenti nei livelli di adrenalina nel siero di questi animali (Bartolomucci et al., 2006).

In rapporto alla sequenza del gene umano, è interessante ricordare come già tempo addietro sia stato identificato il peptide AQEE-30, detto anche “peptide V”, da estratti di ipofisi bovina posteriore (Liu et al., 1994). Tale peptide comprende i 30 residui amminoacidici sino all'estremo C-terminale di VGF. L'identificazione di tale peptide non solo conferma come la sequenza bovina di VGF sia in questa regione virtualmente identica a quella umana, ma stabilisce anche come tale peptide sia un naturale prodotto di clivaggio *in vivo* di VGF, che viene effettivamente biosintetizzato e verosimilmente liberato nell'animale.

Lavori più recenti nel campo della proteomica hanno identificato due peptidi bioattivi chiamati NERP-1 e NERP-2. Questa scoperta è avvenuta analizzando cellule TT di carcinoma tiroideo umano. Il nome è un acronimo che sta per Neuroendocrine Regulatory Peptide 1 e 2. Essi sono dei peptidi amidati e derivano da una distinta regione della proteina di VGF (Yamaguchi et al., 2007).

Altri due peptidi identificati recentemente sono: (i) quello con sequenza ERVW al suo estremo C-terminale e sequenza QQET al suo estremo N-terminale: tale frammento viene quindi chiamato NERP-3, o QQET-30 (nella presente tesi ci riferiremo a:

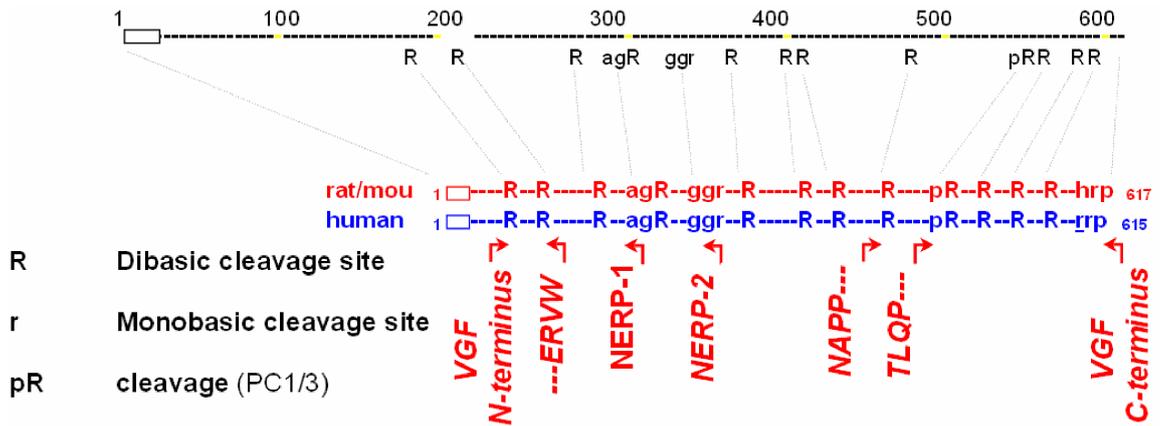
immunoreattività anti-ERVW, in rapporto alla reattività degli anticorpi usati per studiarlo, vedi oltre); inoltre: (ii) un peptide con sequenza PTHV al suo estremo C-terminale, e sequenza NAPP al suo estremo N-terminale, denominato NERP-4, o NAPP-19.

Entrambi questi ultimi peptidi, QQET-30 e NAPP-19, sono stati ritrovati dal nostro laboratorio tramite approcci di HPLC-ESI-MS in frazioni da plasma umano (D'Amato et al., 2015). NAPP-19 è stato inoltre ritrovato in estratti di corteccia prefrontale di topi *Cpe^{fat/fat}* (Lim et al., 2006; Zhang et al., 2008).

Il peptide QQET-30 è stato identificato in estratti acidi di cervello e di intestino di ratto (Fujihara et al., 2012). Tale frammento è risultato più abbondante nel cervello e nell'ipofisi posteriore rispetto all'intestino. Inoltre è stato dimostrato come l'immunoreattività per il C-termino di questo peptide appaia significativamente più alta nel nucleo soprachiasmatico, nella porzione magnocellulare dall'area paraventricolare, e anche nella parte esterna dell'eminenza mediana in condizioni di disidratazione (Fujihara et al., 2012).

Frammenti prossimi all'N-termino di VGF sono stati riconosciuti nel liquido cerebrospinale umano (Stark et al., 2001). Alcuni tra essi risultano ridotti in pazienti affetti da morbo di Alzheimer (Carrette et al., 2003) ed in altre malattie neurodegenerative, ovvero alterati con possibile incremento in portatori di schizofrenia o suoi prodromi (Huang et al., 2006, 2007).

Fig.2: sequenza di VGF e i suoi siti di clivaggio dai quali è possibile che si originino alcuni dei *vgf* peptidi di interesse. Sequenze adiacenti possono essere utilizzate come immunogeni per produrre anticorpi. NOTA: peptidi correlati a QQET-30 furono studiati con anticorpi contro l'estremo C-terminale di tale peptide, cioè contro la sequenza: ERVW



1.5. Localizzazione di VGF e VGF peptidi

Come precedentemente affermato, i prodotti derivanti da VGF mostrano una localizzazione altamente tessuto e tipo cellulare specifica, per di più variamente modificabile e modulabile in diverse circostanze.

Essi sono stati riscontrati in alcune popolazioni neuronali ed in vari tipi di cellule endocrine, come anche in linee cellulari derivate da tessuti nervosi e neuroendocrini (Van Den Pol et al., 1989; Salton et al., 1991; Ferri et al., 1992).

Più precisamente VGF è rappresentato nel sistema nervoso periferico (SNP) in specifiche sottopopolazioni neuronali. Tra le quali in particolare i neuroni sensitivi primari dei gangli spinali e trigeminali, nonché neuroni simpatici dei gangli paravertebrali e prevertebrali ed altri dell'innervazione autonoma afferente.

Un' alta espressione dell'mRNA di VGF è stata riscontrata nei gangli spinali, nei gangli trigeminali, nel midollo spinale, nei gangli simpatici (Ferri et al., 1992).

Nel SNC è stato riscontrato un'abbondante presenza di VGF-peptidi nella porzione dorsomediale del nucleo soprachiasmatico (SCN), mentre nella porzione ventrolaterale è meno rappresentato (Van Den Pol et al., 1989).

Inoltre l'immunoreattività per VGF è stata riscontrata anche in altre aree del SNC come nella corteccia cerebrale, nel bulbo olfattivo, nel nucleo caudato e nell'ippocampo (Van den Pol et al., 1994), soprattutto nell'area del giro dentato.

Ancora, VGF è stato immunolocalizzato in cellule di Purkinje del cervelletto, nei nuclei del nervo vago, in motoneuroni delle corna ventrali ed in neuroni ed assoni e terminali nelle corna dorsali del midollo spinale (Ferri et al., 1992; Salton et al., 2000). Per quanto concerne la regione ipotalamica, è stata evidenziata una apprezzabile densità di neuroni contenenti VGF nei nuclei paraventricolare, supraottico ed arcuato, con elevata espressione anche nel nucleo soprachiasmatico e nella regione tuberomamillare

soprattutto nella regione ventrale laterale. In queste ultime aree VGF appare localizzato in aree che esprimono anche vasopressina (ADH), VIP e GABA (Van Den Pol et al., 1989 Okamura et al., 1990; Wisor et al., 1997).

Una certa quantità di assoni di passaggio sono stati osservati nella zona interna dell'eminenza mediana (EM), in relazione al transito di *pathways* da nuclei ipotalamici come il paraventricolare (PVN) e il sopraottico (SON), notoriamente connessi al controllo del bilancio osmotico e diretti all'ipofisi posteriore (D'Amato et al., 2008).

La zona esterna dell'eminenza mediana dove vengono secreti i fattori di rilascio o inibitori ipotalamici, è densamente popolata di terminazioni VGF-immunoreattive, facendo pensare ad un coinvolgimento di VGF nella regolazione ipotalamica della ghiandola ipofisaria.

Per quanto riguarda la localizzazione dei peptidi di VGF in cellule endocrine, è stata ritrovata in numerosi organi, sia in ghiandole endocrine che in organi contenenti sottopopolazioni endocrine.

Immunoreattività per VGF è presente in varie popolazioni endocrine del tubo digerente (Ferri et al., 1992). Nello stomaco, ad esempio, alcuni VGF-peptidi appaiono variamente localizzati in cellule secernenti serotonina, gastrina, o grelina, ed in alcune altre popolazioni, anche in associazione ad epitopi della cromogranina A (Brancia et al., 2010).

Nelle insule pancreatiche immunoreattività per la porzione C-terminale di VGF è stata dimostrata nel ratto e nel topo, tra l'altro in cellule ad insulina, come pure in relative linee tumorali (Possenti et al., 1999; D'Amato et al., 2015). Più in dettaglio, è stata riscontrata anche ampia e selettiva localizzazione di specifici VGF peptidi anche in cellule a somatostatina o glucagone (Cocco et al., 2007).

Nella midollare del surrene alcuni VGF peptidi appaiono localizzati in modo

differenziale in cellule adrenergiche e noradrenergiche (D'amato et al., 2008).

Utilizzando anticorpi prodotti contro specifici VGF-peptidi clivati / processati, è stato possibile evidenziare dette parti e prodotti di VGF a livello cerebrale (Trani et al., 2002). Ciò ha suggerito l'esistenza di localizzazioni differenziali tra diverse popolazioni ormone-secerenti dell'ipofisi. In questa ghiandola, VGF è stata 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 (Ferri et al., 1995).

La proteina VGF ed i suoi prodotti si ritrovano in compartimenti subcellulari in particolare in granuli secretori definiti a "*dense core*", come dimostrato con l'impiego di tecniche di arricchimento e purificazione di granuli (Possenti et al., 1989) e microscopia elettronica (Ferri et al., 1995).

La secrezione di VGF o dei suoi frammenti può avvenire in risposta a depolarizzazione della membrana cellulare, indotta da alti livelli di potassio, o in seguito ad aumento degli ioni calcio liberi, come pure in risposta ad agonisti colinergici (Possenti et al., 1989).

1.6. Modulazione dell'espressione genica

È stato già affrontato nei precedenti paragrafi quanto VGF sia ampiamente, ma spesso selettivamente localizzato in diverse strutture a livello del sistema nervoso centrale e periferico. Inoltre, si è potuta dimostrare una sua diversa modulazione in risposta a vari stimoli e diverse condizioni fisiologiche.

Infatti studi compiuti al livello dell'SNC di ratto hanno evidenziato che l'espressione di VGF aumenta durante lo sviluppo dell'animale in numerose strutture del cervello come ad esempio nei nuclei ipotalamici, nell'amigdala, nella 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), inoltre viene stimolata dall'attività neuronale (Lombardo et al., 1995; Snyder et al., 1998), e dalla stimolazione correlata alla luce (Wisor et al., 1997).

Nel ratto adulto, l'espressione di VGF nell'ipotalamo è fortemente influenzata da variazioni ormonali correlate all'allattamento, oppure in conseguenza di lesioni neurotossiche delle vie colinergiche setto-ippocampali (Mahata et al., 1993).

Particolarmente rilevante è l'aumento dei livelli di RNA messaggero di VGF nel nucleo arcuato, in risposta al digiuno, con modulazioni differenziali in neuroni a NPY e a POMC. Questa regione, infatti, possiede specifici e differenti sistemi neuronali importanti per il loro coinvolgimento in meccanismi che incrementano l'assunzione di cibo (NPY, AGRP), oppure la riducono (α -MSH) (Hahm et al., 1999; Hahm et al., 2002).

Questi studi suggeriscono come VGF e i suoi prodotti possano essere implicati nella modulazione sia del dispendio energetico, che dell'assunzione di cibo, e quindi nel bilancio energetico e nella regolazione del metabolismo. Infatti studi riguardanti il

ridotto accumulo di massa grassa in ratti trattati con TLQP-21 (*i.c.v.*) hanno dimostrato che questo frammento di VGF attiva il consumo di energia, contemporaneamente aumentando i livelli sierici di adrenalina (Bartolomucci et al., 2006).

L'interesse di VGF peptidi in sistemi nocicettivi e di protezione mucosa è stimolato dal 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 in tale esperimento sembra di poter identificare un coinvolgimento di VGF nell'adattamento a mutate circostanze omeostatiche e/o di difesa. I nuclei coinvolti (nucleo del tratto solitario e nucleo motore del vago) sono sede di terminazione ed origine, rispettivamente, di sistemi afferenti ed efferenti coinvolti nella regolazione della secrezione e della motilità gastrica, nonché nella difesa della mucosa.

Per quanto riguarda l'ipofisi anteriore del ratto, VGF peptidi C-terminali sono abbondanti nella femmina, e assai poco rappresentati nel maschio (Ferri et al., 1995). Una drastica degranulazione di VGF è stata riscontrata in cellule gonadotrope la mattina successiva al picco estrale, in parallelo all'incremento di mRNA. In entrambi i sessi VGF e/o VGF peptidi si accumulano in cellule gonadotrope in risposta a gonadectomia (Ferri et al., 1995). In ogni caso, ad ulteriore indicazione di un coinvolgimento di VGF nella regolazione delle cellule gonadotrope, l'mRNA per LH ed FSH risultarono ridotti in topi *knock-out vgf* (sia maschi, che femmine) (Hahm et al., 1999, 2002).

Peptidi correlati a VGF C-terminus ed a VGF N-terminus, come pure ad una sequenza interna denominata PGH, sono stati ritrovati in neuroni contenenti Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH; Noli et al., 2014).

In hamster siberiano l'mRNA di VGF è uno dei pochi che viene modulato nella porzione dorsale del nucleo Arcuato ipotalamico, nel momento del passaggio tra lo stato

di *Long Day adaptation* (LD; periodo estivo) e lo stato di *Short Day adaptation* (SD; periodo invernale), suggerendo che il VGF possa avere un ruolo nei meccanismi circadiani o stagionali (Wisor and Takahashi, 1997; Ebling and Barrett, 2008).

In particolare, la porzione dorsale del nucleo arcuato, che in tale specie risulta topograficamente separata, sarebbe quella che sovrintende al “*setting*” regolativo del peso corporeo e suo mantenimento, mentre quella ventrale regolerebbe essenzialmente le risposte alle oscillazioni “acute” di nutrizione e quindi leptina circolante in rapporto all’introito alimentare (Ebling and Barrett, 2008). Ciò è assai rilevante, poiché nella maggior parte delle specie, umana compresa, tali due funzioni risultano topograficamente sovrapposte nel nucleo arcuato.

Più di recente analisi su *gene-arrays* hanno evidenziato cambiamenti dell’espressione del gene *vgf* in diverse altre condizioni: l’*mRNA* era indotto nel cervello mediante trattamento con eritropoietina (Girgenti et al., 2009), nelle cellule epiteliali gastriche dopo l’infezione arrecata da *Helicobacter pylori* (Liu et al., 2006) e nei testicoli dopo la deplezione delle cellule germinali, comparati con livelli estremamente bassi, riscontrati nello stesso organo in condizioni normali (Xia et al., 2007).

Al contrario, una ridotta espressione dell’*RNA* messaggero per VGF è stata ritrovata nel corpo carotideo in seguito a iperossia cronica (Dmitrieff et al., 2011). Linee cellulari di tumore mammario (Hernandez-Vargas et al., 2007; Mitra et al., 2008) mostrerebbero ridotto VGF *mRNA*, con un associata riduzione di prodotti di VGF (Mitra et al., 2008). Al momento non è chiaro il significato di tali modificazioni. Peraltro, sono riportate evidenze di metilazione del gene VGF in varie patologie tumorali: la tematica peraltro del tutto travalica i confini della presente tesi.

1.7. Azioni ed attività biologiche di VGF peptidi

Il processamento proteolitico della proteina VGF determina la formazione di differenti VGF-peptidi, per vari dei quali risultano già ad oggi dimostrate significative e distintamente differenziate attività biologiche.

I peptidi derivanti dalla porzione C-terminale di proVGF sono stati i primi studiati.

L'iniezione nei nuclei ipotalamici paraventricolari di alcuni peptidi da regioni prossime al C-termino di VGF (VGF₅₇₇₋₆₁₇ o peptidi più brevi all'interno di detta sequenza) determinava erezione in ratti, tramite l'eccitazione mediata dall'ossido nitrico attraverso una via ossitocinergica (Succu et al., 2004; Succu et al., 2005).

Evidenze su un possibile ruolo di VGF nella regolazione della plasticità sinaptica sono state riscontrate dopo trattamento di cellule PC12 con il peptide C-terminale AQEE-30, o con infusione di quest'ultimo nel giro dentato dell'ippocampo di ratti. In entrambi i casi il peptide induceva l'espressione di specifici geni coinvolti nella sinaptogenesi, nel rimodellamento sinaptico o nella stimolazione di fattori di crescita (Hunsberger et al., 2007).

Altri studi hanno determinato che alcuni peptidi dal dominio C-terminale di VGF (TLQP-62 e AQEE-30) stimolano la secrezione di BDNF (Bozdagi et al., 2008), l'attività sinaptica (Alder et al., 2003) e la proliferazione di cellule progenitrici ippocampali (Thakker-Varia et al., 2007).

In modelli animali di depressione, l'espressione endogena di VGF mRNA è risultata ridotta, mentre l'iniezione di TLQP-62 nell'ippocampo riduceva l'entità dello stato depressivo inducendo neurogenesi (Thakker-Varia et al., 2007). Inoltre il trattamento cronico aumentava la proliferazione di markers neuronali espressi nelle cellule progenitrici ippocampali sia *in vivo* che *in vitro* (*ibidem*).

Iniezioni periferiche di TLQP-21 portavano ad iperalgesia in un modello di dolore

infiammatorio, mentre la sua somministrazione a livello centrale produsse un effetto analgesico (Rizzi et al., 2008).

Più recentemente è stato dimostrato che il TLQP-21 somministrato centralmente (*i.c.v.*) induce una risposta con secrezione dell'ormone di rilascio della gonadotropina (GnRH). *In vitro* lo stesso peptide induceva la secrezione dell'ormone luteinizzante (LH) da preparati di ipofisi di ratti maschi in età puberale, mentre non si è verificò lo stesso effetto in animali adulti (Pinilla et al., 2011).

NERP-1 e NERP-2 iniettati *i.c.v.* risultarono sopprimere il rilascio di vasopressina nel plasma, mentre la somministrazione *i.c.v.* di anticorpi contro i suddetti peptidi inibiva la riduzione dei livelli di vasopressina in risposta alla ri-assunzione di acqua dopo disidratazione. Tali risposte suggeriscono un possibile ruolo di tali peptidi nel controllo fisiologico dell'omeostasi dell'acqua mediata da vasopressina (Yamaguchi et al., 2007). In accordo con tale ipotesi, è stato dimostrato un incremento di NERP-1 e 2 nell'eminenza mediana ed un loro decremento a livello plasmatico in condizioni di aumentata osmolarità plasmatica (D'Amato et al. 2012).

1.7.1 VGF nei meccanismi metabolici e di omeostasi

Studi di modulazione / risposta dinamica convergono con quelli di bioattività, nel suggerire che vari peptidi derivanti da VGF possano avere importanti ruoli chiave nella regolazione del bilancio energetico.

È stato infatti dimostrato che i livelli di VGF mRNA aumentano nel nucleo arcuato in risposta al digiuno, con modulazioni differenziali in neuroni a NPY e a POMC (Hahn et al., 1999; Hahn et al., 2002). Lo stesso vale per VGF / VGF peptidi, specialmente in neuroni ad NPY (Saderi et al., 2014). Questi studi suggeriscono come VGF e i suoi prodotti possano essere considerati implicati nelle regolazioni del comportamento

alimentare e/o assunzione di cibo, bilancio energetico e metabolismo.

Topi *knockout* (*KO*) per il gene *vgf* risultano magri, ipermetabolici, iperattivi e con ridotti livelli di leptina anche dopo l'alimentazione (Hahm et al., 1999).

Inoltre i medesimi topi *KO* sono resistenti all'obesità indotta da dieta iperlipidica, come pure a quella indotta da tioglucosio, che in topi normali causa iperfagia ed obesità (Hahm et al., 2002).

Uno dei peptidi di VGF maggiormente studiato per il suo ruolo nel bilancio energetico è TLQP-21, biosintetizzato da una regione di VGF precursore piuttosto prossima all'estremo C- terminale di VGF medesimo.

Tale peptide iniettato *i.c.v.* in topi fa aumentare il loro consumo energetico, l'adrenalina circolante e la temperatura corporea. Somministrato cronicamente inoltre previene l'obesità indotta da dieta iperlipidica senza apparentemente effetto sull'assunzione di cibo (Bartolomucci et al., 2006, 2009).

Recentemente è stato evidenziato che i topi VGF *KO* mostrano un incremento della sensibilità all'insulina in associazione con ridotti depositi di glicogeno nel fegato (Watson et al., 2015).

Il gruppo di ricerca del prof. Salton ha sviluppato e studiato due diversi modelli di topi VGF *Knockin* (*KI*). In uno di questi era stata utilizzata l'intera sequenza di VGF umano (hVGF), mentre nell'altro era stata eliminata la porzione C-terminale della sequenza (hSNP). Risultò che i topi hVGF avevano maggiore accumulo adiposo rispetto agli animali hSNP. Questi risultati focalizzerebbero un ruolo chiave della porzione C-terminale nella regolazione di metabolismo energetico ed adiposità (Sadahiro et al., 2015).

Nella specie *Siberian hamsters* (*Phodopus sungorus*), TLQP21 provoca una riduzione dell'assunzione di cibo, del peso corporeo, e della massa del tessuto adiposo bianco

(WAT) imitando una componente centrale dello stato catabolico tipica di questa specie quando si trovano in fase di adattamento “*short day*” durante il periodo invernale (Jethwa et al., 2007; Jethwa and Ebling, 2008).

TLQP-21 ha inoltre mostrato altre attività biologiche: *in vitro* induceva la contrazione in preparati di cellule muscolari lisce della zona fundica dello stomaco, mediata dal rilascio di prostaglandine, mentre la somministrazione *i.c.v.* riduceva lo svuotamento gastrico di circa il 40% (Severini et al., 2009).

La versione più estesa del peptide precedente (TLQP-62, esteso sino all'estremo C-terminale di VGF) è risultato essere un potente induttore della secrezione di insulina in linee cellulari di insulinoma stimulate con glucosio. Questo riscontro fa pensare che TLQP-62 si comporti come un fattore endocrino, paracrino e/o autocrino dalla forte azione insulintropica (Petrocchi-Passeri et al., 2015).

Un altro peptide che potrebbe agire sulla secrezione dell'insulina inducendola è il NERP-2 (Moin et al., 2012). Quest'ultimo peptide avrebbe ulteriori implicazioni nella regolazione del metabolismo, infatti iniettato *i.c.v.* in ratti induce incremento dell'assunzione di cibo, dell'attività locomotoria e della temperatura corporea (Toshinai et al., 2010).

Il peptide NERP-3, invece, su preparazioni di ipofisi posteriore *in vitro* parebbe indurre un significativo rilascio di vasopressina (ADH), quindi potrebbe essere un attivatore autocrino nell'ipofisi posteriore del rilascio di ADH, coinvolto nella regolazione idrosalina corporea in una direzione “alternativa” a quella operata da NERP-1 e 2 (Fujihara et al., 2012).

1.7.2 VGF nelle malattie dismetaboliche

La proteina VGF e/o suoi peptidi derivati date le loro azioni sul controllo dell'equilibrio energetico appaiono implicati rilevanti malattie dismetaboliche, *in primis* il diabete.

Nel diabete di tipo 2, che insorge in conseguenza al deterioramento delle cellule β del pancreas. Quindi tali cellule non possiedono più la loro normale funzione fisiologica (Muoio and Newgard, 2008), si riscontra over-espressione del fattore di trascrizione Nkx6.1, che fa aumentare la replicazione delle cellule β e simultaneamente induce la secrezione di insulina stimolata da glucosio (Glucose stimulated insuline secretion; GSIS) (Schisler et al., 2005; Schisler et al., 2008). Ricerche successive hanno provato che il fattore di trascrizione Nkx6.1 induce l'espressione di VGF, e questo potrebbe essere necessario e sufficiente per scatenare la GSIS mediata da Nkx6.1 (Stephens et al., 2012).

TLQP-21 pare indurre GSIS da insule pancreatiche di ratto e umane, ed incrementare la tolleranza al glucosio *in vivo*. La somministrazione cronica di tale VGF-peptide in ratti Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ritarderebbe l'insorgenza del diabete preservando la massa cellulare delle insule pancreatiche. Inoltre, studi *in vitro* hanno dimostrato come TLQP-21 svolga un azione simile all' exendina 4, bloccando l'apoptosi delle cellule β (Stephens et al., 2012).

Riassumendo, secondo il gruppo di Stephens TLQP-21 mostra una serie di proprietà anti-diabetogeniche tra cui:

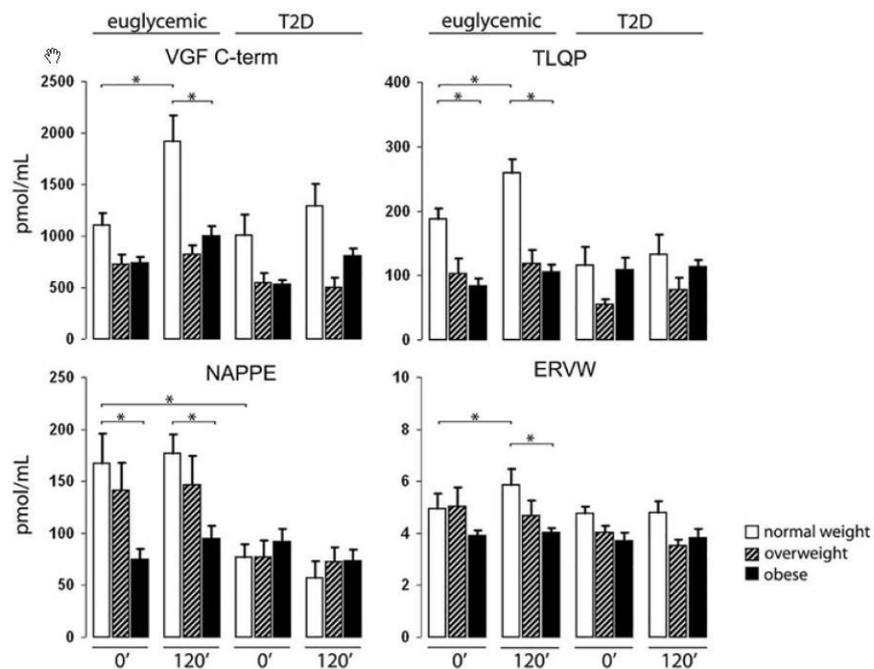
- potenziamento del GSIS;
- aumento del controllo glicemico;
- riduzione dell'apoptosi delle cellule β .

L'unico studio compiuto sinora su alterazioni di VGF peptidi nel diabete umano ha mostrato che il plasma di pazienti affetti da diabete di tipo 2 delinea un profilo alterato,

con significativa riduzione di alcuni VGF peptidi in soggetti affetti da diabete di tipo 2 (Fig.3; D'Amato et al., 2015).

Da tale studio si evince che non solo esistono differenze fra i pazienti affetti da diabete di tipo 2 e gli individui euglicemici studiati, ma che ulteriori differenze si correlano al BMI dei pazienti stessi. (vedi Fig.3).

Fig.3: livelli dei VGF-peptidi nel plasma umano di individui affetti da diabete di tipo 2 (T2D) e indivui euglicemici. I livelli sono stati misurati su individui normopeso, sovrappeso e obesi sia a digiuno che dopo 120 minuti dall'assunzione di glucosio (D'Amato et al., 2015)



1.8. Criticità nello studio di VGF e dei VGF-peptidi

Alcuni aspetti, almeno in parte delineati nelle parti precedenti, rendono particolarmente “*challenging*” lo studio di VGF peptidi, delle loro variazioni e modulazioni, del loro ruolo funzionale e fisiopatologico, della loro possibile importanza anche quali Biomarcatori. Riassumo qui sotto tali aspetti in forma altamente schematica:

- da un unico precursore VGF
- possono derivare molteplici VGF peptidi in circostanze / sedi diverse,
- in varia proporzione tra loro,
- con eterogenee e variabili forme molecolari più o meno brevi / estese,
- con modulazione sia dei diversi VGF peptidi, che delle loro forme molecolari, in condizioni sperimentali e/o patologiche,
- con attività biologiche diversificate (opposte?) tra i diversi VGF peptidi e/o loro forme molecolari

Su tali basi, non stupirà che tuttora una delle problematiche più critiche sia quella di ottimizzare metodi ed approcci congruamente specifici, selettivi, sensibili ed affidabili per lo studio differenziale di VGF peptidi. O, meglio ancora, per l'analisi di profili multipli e complessi di tali peptidi e delle loro forme molecolari. Si aggiunga come molti dei peptidi suddetti siano presenti in concentrazioni basse o molto basse, all'interno di matrici di alta complessità (esempio: nei tessuti, nel plasma, e/o altri liquidi biologici). Di conseguenza, approcci di Proteomica, che pure hanno contribuito grandemente alla messa in evidenza di VGF peptidi e loro alterazioni in alcune sedi (es.: liquor cerebro-spinale), non sono oggi significativamente applicabili in modo estensivo, se non ipotizzando a priori una batteria *multiplex* di *step* di “immunopurificazione selettiva” di *sets* di VGF peptidi, ancora da sviluppare.

L'uso di metodi fondati sull'uso di anticorpi resta quindi di primario rilievo anche per la

loro elevatissima sensibilità e – una volta ben ottimizzati e caratterizzati – estesa e semplice applicazione.

Ciò tuttavia richiede che si mantenga ben chiaro un punto fondamentale: detti anticorpi, ed i metodi che su di essi si fondano, dovranno essere in condizione di discriminare ampiamente PEPTIDI CLIVATI, ovvero altrimenti modificati per processazione post-traduzionale (esempio: AMIDAZIONE all'estremo C-terminale, noto fattore chiave di bioattività per molti ormoni e neuropeptidi), rispetto alle identiche sequenze contenute (*embedded*) all'interno di VGF precursore, o all'interno di frammenti di VGF stesso più estesi al loro estremo N- o C-terminale, o entrambi, rispetto a quei peptidi che effettivamente dimostrano le attività biologiche ed i possibili ruoli funzionali / fisiopatologici / diagnostici evidenziati.

Comprensibilmente, le “richieste” di specificità e selettività degli anticorpi da applicare nel presente contesto sono profondamente diverse da quelle a cui in generale si è abituati a pensare, non senza che vi sia oggi una certa tendenza all'eccesso di “fiducia” nelle caratteristiche proposte da molti produttori di anticorpi commerciali, spesso senza chiare evidenze. Inoltre, sfugge spesso alla riflessione come in molti casi gli anticorpi siano utilizzati in metodi NON competitivi (esempio: tutti gli studi immunohistochimici), mentre anche i controlli più attenti e dettagliati sono regolarmente svolti con metodi COMPETITIVI (esempio: assorbimento dell'anticorpo con il suo antigene operato sul tessuto). Tale discrepanza può avere conseguenze circoscritte in molti casi (esempio: analisi di proteine di alto peso molecolare), ma nel presente contesto essa espone al rischio di interpretazioni totalmente erranee ed infondate dei rapporti: immunolocalizzazione-bioattività-ruolo diagnostico applicati ad immunoreattività riscontrate per VGF peptidi. Come noto, infatti, basta una modestissima cross-reattività, dell'ordine di pochi punti percentuali o ancora meno, perché un anticorpo si legi sia ad

un peptide clivato, che alla medesima sequenza “estesa” presente all’interno del suo precursore. Possibile risultato: dati infondati o anche del tutto errati e fuorvianti.

Di conseguenza, non deve stupire che parte considerevole ancorchè assai “*labour intensive*” del lavoro sperimentale e di ricerca dei miei anni di Dottorato sia stata dedicata a dare un contributo nella direzione di “ottenere e caratterizzare Anticorpi e conseguenti Metodi Immunoistochimici ed Immunochimici congrui al *challenge*”. Ci si augura che tale lavoro venga compreso e valorizzato nel suo valore fondante, sia nel presente contesto, che in prospettiva nel contesto altrettanto complesso e difficile relativo a molti altri precursori multifunzionali di peptidi ormonali, neuropeptidi, neuromodulatori ecc.

Infatti, nel genoma sono presenti in numero limitato geni codificanti per ormoni e neurotrasmettitori / regolatori peptidici, come noto, mentre sono enormemente più numerosi i geni codificanti per i rispettivi Recettori. È quindi tramite una complessa, variabile e modulabile processazione post-traduzionale della limitata “dotazione genica” di precursori di peptidi ormonali e neuropeptidi, che le cellule neuronali e/o endocrine si dotano dell’enorme varietà di segnalatori e regolatori che consentono la loro attività e funzione. Soltanto attraverso una debita comprensione di tale complessità sarà possibile di meglio comprendere una moltitudine di sistemi e meccanismi di regolazione neuro-ormonale sistemica e/o locale che oggi solo in parte sono conosciuti.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del mio lavoro è stato studiare un aspetto della risposta dell'organismo all'assunzione di glucosio, specialmente in alcune sedi maggiormente coinvolte nel controllo metabolico.

I meccanismi metabolici che vengono attivati dall'assunzione di nutrienti, come il glucosio, sono fondamentali per la nostra vita, ed alterazioni a questo livello comportano patologie più o meno gravi, come ad esempio il diabete. Tale patologia è una malattia cronica caratterizzata dalla presenza di elevati livelli di glucosio nel sangue (iperglicemia), in rapporto in particolare a deficit di insulina o ad alterata risposta ad essa. Ad oggi, anche l'obesità è considerata una patologia a tutti gli effetti, caratterizzata da insulino-resistenza, che nel 90% dei casi porta all'insorgenza di diabete di tipo II. Come è noto l'insulina è un ormone pancreatico che consente al glucosio l'ingresso nelle cellule, con conseguente utilizzo come fonte energetica. Quando questo meccanismo è alterato, il glucosio si accumula nel circolo sanguigno, creando molteplici conseguenze di breve, medio e lungo periodo.

Si è evidenziato sopra che taluni VGF peptidi sembrano essere coinvolti in meccanismi metabolici legati alla nutrizione e/o alla risposta al glucosio.

Il fine del mio lavoro è stato quindi di comprendere la risposta di un numero di VGF peptidi in relazione all'introduzione del glucosio.

È stato strumentale all'analisi sviluppare ed applicare approcci indirizzati alla caratterizzazione avanzata di specifici *sets* di anticorpi, prodotti contro differenti VGF-peptidi clivati e eventualmente modificati post-traduzionalmente (ad esempio con amidazioni C-terminali). Questa fase è avvenuta dopo una primo step di *screening* degli anticorpi a disposizione nel nostro laboratorio. Dopo una selezione degli antisieri "grezzi", ho intrapreso un *iter* di miglioramento qualitativo di quelli risultati migliori, allestendo le seguenti metodiche: (a) isolamento delle frazioni IgG dall'antisiero in toto;

(b) purificazione per affinità degli anticorpi, incluse alcune purificazioni sequenziali e/o differenziali. Tutto ciò in modo che l'anticorpo ottenuto e successivamente applicato potesse essere considerato effettivamente selettivo per il VGF peptide di interesse a confronto con il suo precursore o forme estese.

Gli anticorpi così purificati sono stati utilizzati per compiere analisi su topi, su sedi e tessuti particolarmente coinvolti nella regolazione del metabolismo (ipotalamo, pancreas), e nel plasma periferico. Per delineare in qualche misura il *time-course* di risposta al glucosio sono stati studiati due tempi diversi: 30 e 120 minuti dalla somministrazione di glucosio. Infine, è stato condotto un limitato studio pilota su topi obesi (da dieta iperlipidica).

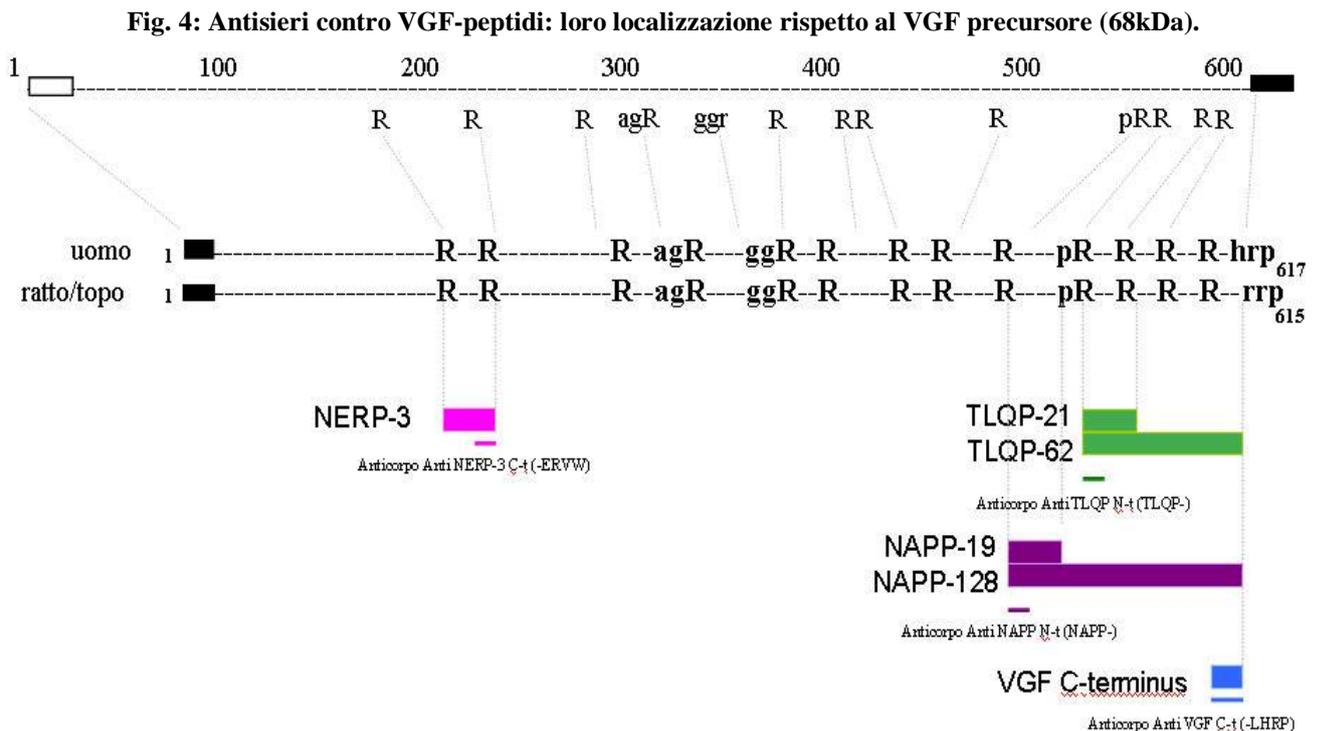
3.MATERIALI E METODI

3.1 Anticorpi

Per questo lavoro si sono utilizzati differenti antisieri contro specifici peptidi ed epitopi di VGF, prodotti appositamente nel nostro laboratorio immunizzando conigli, pecore, capre, galline o porcellini d'India (occasionalmente ratti). Come immunogeni furono utilizzati peptidi sintetici corrispondenti a ben selezionate regioni della sequenza primaria di VGF, opportunamente coniugati all'estremo opposto a quello di interesse (in genere tramite aggiunta di un residuo Cisteina) a proteine carrier. Pur avendo utilizzato numerosi anticorpi variamente caratterizzati e di vario titolo ed efficacia, nella descrizione e discussione che seguono mi focalizzerò su quanto riscontrato usando anticorpi di alta specificità per le quattro sequenze qui sotto delineate in Tab. 1.

Tabella 1: schema riassuntivo degli antisieri contro VGF-peptidi utilizzati nel seguente lavoro.

Nome	Sequenza	Porzione VGF	Specie
VGF C- terminus	dY-I EHV L LHRP	rVGF 609-617	Rabbit
TLQP-21 (N-term.)	TLQPP ASSRR-c	rVGF 556-576	G.Pig
NAPP-19 (N-term.)	NAPP EPVP P-c	rVGF 489-497	Rabbit
QQET-30 (C-term.)	L ESPGP ERVW-c	rVGF 200-209	Rabbit



3.1.1 Frazionamento IgG

Utilizzando gli anticorpi prodotti, nelle prime prove preliminari di immunocolorazione di sezioni del cervello di ratto (specie ipotalamo), si evidenziava in alcuni casi un elevato background (colorazione diffusa, che riduce la chiara visibilità ed apprezzabilità delle strutture selettivamente immunomarcate). Quindi sono state effettuate alcune metodiche standard dirette a migliorare la colorazione, ottenendo *in primis* frazioni IgG degli antisieri di interesse. In rapporto con la procedura standard, un volume costante (4ml) di antisiero veniva portato a volume con soluzione di acetato, e regolato il pH (a 4.5). Veniva quindi aggiunta una quota volume-dipendente di acido octanoico indiluito, per la precipitazione / rimozione di varie componenti sieriche, lasciando però in soluzione le immunoglobuline. Dopo congrua incubazione e centrifugazione, al sopranatante (grossolanamente filtrato) veniva aggiunta PBS EDTA (10X), e di nuovo regolato il pH (a 7.4). Tenendo sotto attento controllo la temperatura (a 4°C), veniva aggiunta soluzione satura di ammonio solfato (anch'essa a 4°C). Dopo 45' di incubazione a temperatura controllata e centrifugazione veniva raccolto il *pellet* contenente le IgG, che era quindi re-dissolto con di PBS 1X (circa 2ml). La soluzione così ottenuta veniva dializzata *overnight*, per rimuovere l'ammonio solfato residuo, e ne veniva misurata la concentrazione proteica (assunta quale concentrazione di IgG). In vari casi, già il presente step risultava efficace, e la frazione IgG presentava un chiaro miglioramento del rapporto segnale-rumore in immunoistochimica, con riduzione del fondo non specifico.

3.1.2 Purificazione per affinità

Come fase ulteriore e mirata, sono state allestite ed ottimizzate procedure di purificazione per affinità, sia per migliorare ulteriormente il rapporto segnale-rumore in immunostochimica, sia per caratterizzare (in alcuni casi mirati) le fini reattività e cross-reattività molecolari di alcuni anticorpi. In sostanza, in tal modo, sono state isolate dalle frazioni IgG solo gli anticorpi reattivi con singole e ben determinate sequenze peptidiche di interesse.

La purificazione per affinità si svolge in tre fasi principali: (i) legame di un antigene (nel nostro caso un peptide) ad un substrato solido; (ii) aggiunta della frazione IgG con incubazione *overnight*, e rimozione finale del restante della soluzione contenenti anticorpi non legatisi; (iii) recupero dell'anticorpo che si era legato al supporto solido, dissociandolo dai siti di legame.

Per compiere tale procedura si sono utilizzate piccole colonne in polipropilene, in cui veniva impaccato apposito gel (Sulfolink Coupling gel). Tale gel presentava gruppi chimici adatti a legare in modo covalente gruppi sulfidrilici. Incidentalmente, i gruppi chimici esposti sono stabili nel tempo, e non richiedono attivazione per divenire reattivi con i gruppi sulfidrilici.

Come antigeni venivano utilizzati peptidi sintetici, in cui era stato incluso ad un estremo un residuo aminoacidico cisteina, che appunto contiene un gruppo sulfidrilico prontamente reattivo con i gruppi appositi del Gel. Seguivano varie fasi di lavaggio, a vario pH e forza ionica, in modo da rimuovere qualunque quota di peptide non legato, come pure per bloccare e saturare i gruppi presenti sul gel. Dopo questa fase, veniva inserita la soluzione contenente la frazione IgG da purificare (di massima con concentrazione 5 mg/mL, per un carico totale ove disponibile di circa 20 mg di IgG): essa veniva lasciata in incubazione *overnight*, con rimescolamento ciclico in modo da

massimizzare il legame anticorpo-peptide-gel. Il giorno dopo venivano effettuati vari lavaggi a diversa forza ionica (stringenza) per ridurre eventuali legami al gel di componenti interferenti. Poiché le prime frazioni di liquido di lavaggio contenevano il resto degli anticorpi IgG dell'animale (quelli non legatisi alla colonna), esse venivano raccolte per eventuali analisi e/o per successive purificazioni sequenziali o differenziali (frazione di LAVAGGIO).

In seguito veniva quindi eluito / distaccato l'anticorpo legatosi al peptide-gel usando un basso pH (pH = 2.5, ottenuto con acido debole: soluzione di Glicina), con raccolta (ed immediata neutralizzazione) dell'eluito in molteplici frazioni onde poter selezionare quelle contenenti anticorpi. Misurata l'assorbanza, con spettrofotometro a 280 nm, le frazioni che presentavano valori di assorbanza più alta, contenenti gli anticorpi, venivano riunite e conservate (frazione PURIFICATA PER AFFINITÀ).

In specifici casi, la frazione DI LAVAGGIO della corsa 1 veniva caricata in una nuova colonna, e sottoposta alla procedura (corsa 2) usando una colonna cui era coniugato un peptide modificato rispetto a quello usato prima: omologo con mutazione puntiforme (aggiunta / rimozione di un singolo residuo aminoacidico, vedi schema qui sotto):

CORSA N°	ANTIGENE LEGATO
1 2	TLQPPASSR-Cisteina-Gel LQPPASSR-Cisteina-Gel
1 2	LQPPASSR-Cisteina-Gel TLQPPASSR-Cisteina-Gel
1 2	RTLQPPASSR-Cisteina-Gel TLQPPASSR-Cisteina-Gel

In tal modo, si verificò se nella frazione di lavaggio residuassero anticorpi selettivamente specifici per l'antigene minimamente modificato, e che invece non si erano legati (quindi non erano reattivi) con quello usato nella Corsa 1. L'intera procedura di legame avveniva in condizioni NON COMPETITIVE, essendovi un solo antigene disponibile (legato in colonna) in ciascuna reazione. Poteva quindi bastare anche un'assai limitata reattività / selettività degli anticorpi perché questi si legassero alla colonna. È importante notare che cosa ci si potrebbe attendere, nel caso siano presenti in misura significativa popolazioni anticorpali diverse: ciò non deve stupire, trattandosi qui di immunizzazioni in animale, e quindi di antisieri policlonali. In pratica, alcune delle popolazioni anticorpali avrebbero potuto essere reattive con l'esatto peptide immunogeno, mentre altre potevano cross-reagire, o addirittura "preferire" il peptide leggermente modificato (es.: per rimozione o modificazione di un singolo aminoacido, ciò che potrebbe ben verificarsi *in vivo* ad opera di proteasi / enzimi tissutali, durante lo sviluppo della risposta immunitaria alle ripetute somministrazioni di immunogeno nell'arco di alcuni mesi).

Alternativamente, una procedura di purificazione SEQUENZIALE e SOTTRATTIVA poteva essere ottenuta con una "fase 1" come descritto sopra, seguita da una "fase 2" nella quale si caricava in colonna la frazione PURIFICATA prima ottenuta. Si recuperavano dalla colonna 2: (A) la frazione PURIFICATA_2 e: (B) la frazione di "LAVAGGIO_2". Dalla frazione PURIFICATA_2 si erano rimossi con la colonna 2 selettivamente quegli anticorpi che potessero reagire ANCHE con l'antigene modificato (che si ritrovavano peraltro nella frazione di LAVAGGIO_). Comprensibilmente, le proporzioni quantitative tra le due frazioni anticorpali possono variare anche marcatamente da caso a caso.

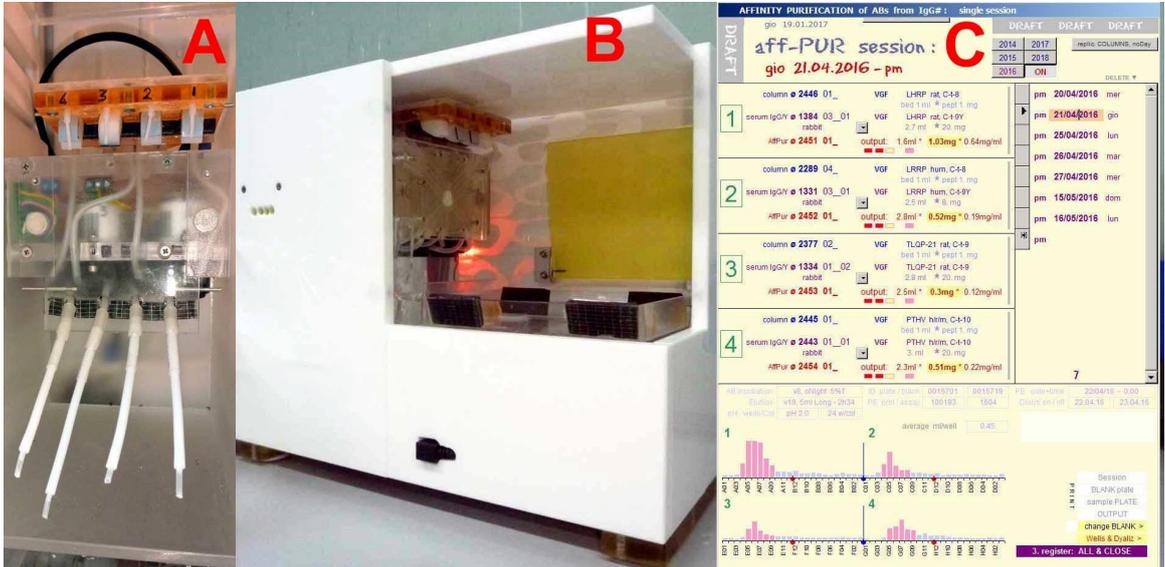
Sul piano operativo, è importante notare come una procedura di purificazione per affinità sia decisamente labour intensive.

- allestimento colonna con peptide coniugato: circa 5 ore nette, >25 diversi lavaggi;
- incubazione frazione IgG: *overnight* circa 16 ore, > 10 fasi di ri-miscelamento IgG;
- eluizione dalla colonna e ri-condizionamento: circa 4 ore nette, >15 diversi lavaggi .

Inoltre, nella procedura manuale i tempi suddetti si allungano nettamente, per ogni nuovo intervento e fase di aggiunta di frazioni di lavaggio. Quindi è stato allestito un sistema AUTOMATIZZATO per lo svolgimento delle tre fasi ripetitive, interfacciato con PC contenente il listato dei singoli step operativi (da 50 a 170 circa per le diverse procedure), come pure una fase di automazione del calcolo di valutazione e rappresentazione grafica dell'assorbanza delle frazioni purificate, onde contenere la quantità di lavoro richiesta.

Non discuterò qui oltre gli aspetti di automazione, susseguente ottimizzazione e validazione delle procedure, limitandomi a tre immagini illustrative di: (A) set-up per automazione delle incubazioni delle IgG; (B) set-up per automazione delle fasi di preparazione colonne / lavaggi / eluizioni; (C) raccolta dati e rappresentazione grafica nel nostro DataBase di laboratorio (Fig.5, vedi pagina seguente).

Fig. 5: Purificazioni per affinità: (A) set-up per automazione delle incubazioni delle IgG; (B) set-up per automazione delle fasi di preparazione colonne / lavaggi / eluizioni; (C) raccolta dati e rappresentazione grafica nel nostro DataBase di laboratorio



3.2Animali

La risposta di VGF al glucosio è stata studiata in due gruppi di topi. *In primis*, animali del gruppo sperimentale 1 (maschi, CD1, età 12 settimane al sacrificio) furono stabulati a Roma in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico Legali dell'Apparato Locomotore, Università La Sapienza, Roma. Gli animali del gruppo sperimentale 2 (maschi, CD1, età 20 settimane al sacrificio) furono mantenuti nello stabulario presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Cagliari. Tutti gli animali furono tenuti in condizioni ambientali standard (temperatura $23\pm 2^{\circ}\text{C}$; umidità relativa $60\pm 10\%$; cicli di luce e buio di 12h con illuminazione dalle ore 8 alle ore 20; 6 animali / gabbia). Tutti gli studi furono condotti nel rispetto delle approvazioni da parte del rilevante comitato etico e delle prescrizioni di legge.

Gli animali del primo gruppo furono tenuti a digiuno (con libero accesso all'acqua) per 18h (n=38). Nel giorno del sacrificio gli animali furono divisi in 3 sottogruppi: (1a) topi che ricevettero iniezione di soluzione glucosata (3g/kg, *i.p.*) e furono sacrificati 30 minuti dopo (n=10); (1b) topi come 1a, ma sacrificati 120 minuti dopo l'iniezione (n=10); (1c) topi che ricevettero iniezione (*i.p.*) di soluzione fisiologica e furono sacrificati dopo 30-120 minuti (n=11).

Gli animali del gruppo sperimentale 2 includevano animali a dieta standard, ed animali a dieta iperlipidica (*pellet* standard, Mucedola, Italia con aggiunta di 30% V/V di strutto). Gli animali furono messi a digiuno per 18h. Nel giorno del sacrificio furono divisi in 4 sottogruppi: (2a) topi a dieta iperlipidica (obesi), che ricevettero iniezione di soluzione glucosata (3g/kg *i.p.*) e furono sacrificati 120 minuti dopo; (2b) topi obesi (come 2a) sacrificati senza nessuna iniezione; (2c) topi normopeso (dieta standard) che

ricevettero iniezione di soluzione glucosata (3g/kg; *i.p.*) e furono sacrificati 120 minuti dopo (n=12); (2d) topi come 2c ma sacrificati senza iniezione.

Dopo induzione di anestesia profonda con etere etilico, campioni di plasma furono prelevati da tutti gli animali del gruppo 1. Il sangue, prelevato dall'atrio sinistro con siringa contenente acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), fu rapidamente trasferito a provettine Eppendorf, e centrifugato. Il plasma fu quindi raccolto e conservato a freddo (-20°C). Il plasma così trattato fu impiegato per l'allestimento di saggi ELISA (6 animali / sottogruppo).

Immediatamente dopo il prelievo ematico, ogni animale fu sottoposto a perfusione transcardiaca, per circa 20 minuti, con soluzione di paraformaldeide (4% in tampone fosfato 0.1M, pH 7.2-7.4, a 4°C). I cervelli dei casi del gruppo 1 sono stati rapidamente rimossi dalla teca cranica ed immersi in soluzione criopreservante (tampone fosfato salino - PBS 0.01mol/l PO₄, 0.15 mol/ml NaCl, pH 7.2-7.4 , contenente 70g/L di saccarosio e 0.1 g/L di NaN₃). Il pancreas (gruppi 1 e 2) fu prelevato e post-fissato per immersione in paraformaldeide (come sopra, 2h), quindi immerso in soluzione criopreservante (vedi sopra). I campioni così fissati furono studiati impiegando metodiche immunoistochimiche, i cui risultati presentati in questa tesi derivano dall'analisi di 6 animali / sottogruppo per il sistema nervoso centrale (ipotalamo) e per i campioni di pancreas (1a; 1b e 1c), mentre per i sottogruppi 2a; 2b; 2c e 2d fu compiuta un'analisi pilota su campioni di pancreas (3 animali / sottogruppo).

3.3 Immunoistochimica

3.3.1 Preparazione dei tessuti

Per il presente studio e risultati, furono studiati ipotalamo (gruppo 1) e pancreas (gruppi 1 e 2). Per il taglio di questi tessuti, i campioni precedentemente fissati furono individualmente inseriti in stampi in foglio di alluminio di opportune dimensioni (Ferri et al., 1987), immersi in mezzo di inclusione come appropriato (Cocco et al., 2003) e sottoposti a congelamento rapido con Freon a temperatura di fusione (raffreddato con azoto liquido).

I blocchetti così ottenuti sono stati conservati nella fase gassosa di un congelatore dewar contenente azoto liquido, fino al giorno del criosezionamento.

Utilizzando un criomicrotomo (Microm HM-560, Walldorf, Germania; temperatura del blocchetto circa -10°C, della lama -30 °C) la regione ipotalamica (da bregma 0.02 mm a bregma -3.16mm circa, vedi: The Mouse Brain; K.B.J. Franklin & G. Paxinos; 2008) ed i campioni di pancreas furono tagliati ad un settaggio di 10µm. Le sezioni ottenute furono raccolte su vetrini trattati con Poli-L-Lisina, per la successiva fase di immunocolorazione.

3.3.2 Immunocolorazioni

Le immunocolorazioni sono state effettuate utilizzando metodiche indirette.

Dopo trattamento con TRITON X-100 (0.1% in H₂O, 45 minuti), le sezioni venivano lavate (con PBS 1x, 3 x 3minuti), quindi incubate *overnight* con i differenti anticorpi primari descritti in precedenza (vedi Tabella 1 pagina 32; per diluizioni vedi Tabella 2 pagina 43), diluiti in PBS contenente: (i) siero normale della “specie da colorare” (nel nostro caso: Topo): 3%; (ii) siero dell’animale donatore dell’anticorpo secondario (nel nostro caso: Asino): 3%; (iii) NaN₃ come conservante: 0.05%.

Il giorno seguente, dopo lavaggi con PBS (3 x 3 minuti. o più), le sezioni venivano incubate con un appropriato anticorpo secondario coniugato.

Per le colorazioni singole si è preferito in genere utilizzare come fluorocromo la *cyanina 3* (Cy3 che emette in giallo / rosso) per la sua apparente maggiore sensibilità.

Dopo circa 1h di incubazione del secondario, i vetrini subivano altri lavaggi con PBS (3 x 3 minuti. o più) e poi venivano montati con coprioggetto usando PBS-Glicerolo (60/40%) contenente NaN_3 (0.05%). I primi esperimenti furono condotti per mettere appunto il metodo e le diluizioni ottimali. Per le analisi immunostochimiche sono state impiegate colorazioni singole in modo da evidenziare la presenza di immunoreattività per i VGF peptidi studiati. Per caratterizzare i tipi cellulari contenenti immunocolorazione per VGF peptidi, furono effettuate immunocolorazioni doppie, in modo da ricercare colocalizzazioni tra l'immunoreattività per VGF-peptidi e quella per ormoni e/o neurotrasmettitori tipici di ipotalamo o pancreas.

In particolare furono utilizzate miscele di anticorpi contro: (i) uno specifico VGF peptide / epitopo; (ii) un ormone, o un neurotrasmettitore / enzima biosintetico ipotalamico o pancreatico. I due anticorpi utilizzati erano stati prodotti in specie differenti (vedi Tabella 3, pagina 44).

Ogni anticorpo secondario usato, in questo caso, era marcato con un diverso fluorocromo, ad esempio: (i) Cy3, fluorescente in giallo / rosso; (ii) *Alexa 488* e/o *Cyanina 2* (Cy2), fluorescente in verde. Ognuno di questi secondari veniva utilizzato ad una diluzione rivelatasi appropriata in prove preliminari (vedi Tebella 4, pagina 44).

Questo metodo permetteva di visualizzare simultaneamente i due fluorocromi, utilizzando un sistema di filtri ottimizzati (Ferri et al., 1995), per rilevare le sedi di colocalizzazione, o non colocalizzazione, tra le due immunoreattività studiate.

Considerazioni specifiche riguardano agli antisieri anti-NPY, anti-AVP, anti α -MSH e anti-Insulina utilizzati.

L' anti-NPY e l'anti-insulina utilizzati furono prodotti nei laboratori dei Proff. J.M. Polak e S.R. Bloom (RPMS, ora *Imperial College*, Londra) contro l'intera sequenza del peptide, in coniglio e in porcellino d'india (rispettivamente). L'anticorpo anti-Arg-Vasopressina (AVP) fu prodotto contro la sequenza CYFQNCPRGNH₂, in porcellino d'India (Peninsula, San Carlos, California, USA, ora parte del gruppo Bachem, Torrance, California, USA).

L'antisiero contro α -MSH era prodotto contro la sequenza Ac-SYSMEHFRWGKPVNH₂, in coniglio (BIOMOL, Exter, UK). Per le diluzioni a cui sono stati utilizzati tali anticorpi si veda la Tabella 3.

L'anticorpo indirizzato contro la parvalbumina era prodotto contro la sequenza proteica da 12 kDa in topo (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, USA). Per le diluzioni a cui sono stati utilizzati tali anticorpi si veda la Tabella 3.

L'anticorpo indirizzato contro la calretinina era prodotto contro l'intera sequenza proteica da 29 kDa in topo (MILLIPORE, Darmstadt, Germania). Per le diluzioni a cui sono stati utilizzati tali anticorpi si veda la Tabella 3.

Appropriati controlli sono furono svolti per confermare l'attendibilità delle colorazioni, tra cui: (a) utilizzo del siero pre-immune; (b) incubazione di ciascun primario, singolarmente, seguito da un secondario prodotto contro una specie inappropriata; (c) la sostituzione di ciascun passaggio, a turno, o di tutti i passaggi con PBS. Si veda inoltre quanto specificamente discusso per anticorpi contro VGF peptidi.

Tabella 2: Schema riassuntivo delle diluizioni utilizzate per gli antisieri indirizzati contro i VGF-peptidi.

NOME ANTISIERO	DILUIZIONE	TESSUTO IMMUNOCOLORATO
Anti - VGF C-terminus	1:5000	Ipotalamo
Anti - VGF C-terminus	1:4000	Pancreas
Anti - NAPP-19 (N-term)	1:300	Ipotalamo
Anti - NAPP-19 (N-term)	1:300	Pancreas
Anti - QOET-30 (C-term)	1:300	Ipotalamo
Anti - TLQP-21 (N-term)	1:1500	Pancreas

Tabella 3: schema riassuntivo delle diluizioni utilizzate per gli antisieri indirizzati contro gli ormoni / neurotrasmettitori ipotalamici o pancreatici.

NOME ANTISIERO	DILUIZIONE	TESSUTO IMMUNOCOLORATO
Anti - AVP	1:500	Ipotalamo
Anti - NPY	1:1000	Ipotalamo
Anti - α -MSH	1:300	Ipotalamo
Anti - Parvalbumina	1:5000	Ipotalamo
Anti - Calretinina	1:5000	Ipotalamo
Anti - Insulina	1:1500	Pancreas

Tabella 4: schema riassuntivo delle diluizioni utilizzate per gli antisieri secondari.

FLUOROCROMO	DILUIZIONE
<i>Cy 3</i>	1:500
<i>Cy 2</i>	1:250
<i>ALEXA 488</i>	1:250

3.4 Saggi ELISA

3.4.1 Estrazioni Campioni

Per il presente studio e risultati furono studiati campioni di plasma derivanti dal gruppo sperimentale 1 (vedi paragrafo 3.2 Animali)

3.4.2 Procedura ELISA

Gli immunosaggi ELISA sono stati eseguiti utilizzando una metodica indiretta e competitiva. Il protocollo generalmente utilizzato per l'allestimento dei saggi può essere riassunto in tre diverse fasi principali (D'Amato et al. 2008):

- **Coating delle piastre** Furono usate piastre *multiwell* da 96 pozzetti appositamente trattate per favorire l'adesione di molteplici peptidi alla superficie, grazie alla presenza di numerosi siti idrofilici ed idrofobici (Maxisorp, NUNC Italia). In esse veniva compiuta un incubazione con l'antigene (o con suo coniugato con una proteina carrier differente da quella utilizzata per l'immunizzazione, vedi Tabella 5, pagina 46) in tampone carbonato / bicarbonato (pH 7.2 *overnight*, a 4°C, o in alcuni casi: 3-4h, a temperatura ambiente, come ottimizzato in precedenza in rapporto ai singoli saggi). Dopo 3 lavaggi (con PBS contenente 0.05% di Tween-20), veniva effettuato un bloccaggio (con siero normale di asino, NDS, usando *pool* da diversi animali, 9% in PBS, con 0.05% NaN₃) per 4h a temperatura ambiente in agitazione costante. Le piastre così trattate con l'antigene potevano quindi essere utilizzate immediatamente, oppure potevano essere stoccate a -20°C per un prossimo utilizzo.

Tabella 5: schema riassuntivo degli antigeni utilizzati nella fase di coating.

Nome Peptide	Sequenza
VGf C- terminus	dY-I EHVl LHRP
TLQP-21 (N-term.)	TLQPPASSRR-C-NH ₂
NAPP-19 (N-term.)	NAPPEVPP-C-
NERP-3 (C-term.)	C-LESPGPERVW

▪ **Allestimento del Saggio:** nelle piastre precedentemente preparate nella fase di *coating*, venivano inseriti, alternativamente nei pozzetti della piastra: (i) concentrazioni scalari di peptide, in modo da poter allestire una curva standard (pozzetti: CURVA); (ii) il campione da testare a diverse diluizioni (pozzetti: CAMPIONI); (iii) un appropriato volume del solo solvente (pozzetti di controllo “BIANCHI”). Si aggiungeva quindi il rilevante anticorpo primario (salvo quelli “BIANCHI”). Tutte le soluzioni erano allestite con PBS-BSA 0.1 %, 0.05% NaN₃, EDTA, ed inibitori enzimatici (aprotinina). Le diluizioni d’uso degli anticorpi sono descritte in Tabella 6 (pagina 47). L’incubazione viene quindi protratta per 4 ore a temperatura ambiente con agitazione / vibrazione costante.

Dopo congrui lavaggi (con PBS contenente 0.05% Tween-20), faceva seguito incubazione con anticorpi secondari (1 ora, 1:10 000 a partire da soluzioni stock standardizzate alla concentrazione di 1mg/ml). Furono usati di anticorpi secondari purificati per affinità ed assorbiti contro proteine sieriche di multiple specie, per minimizzare potenziali cross-reattività), coniugati con biotina. Dopo un ulteriore set di lavaggi (con PBS come sopra), faceva seguito incubazione con streptavidina coniugata con perossidasi (30 minuti, in PBS). Dopo un set di lavaggi finali, faceva seguito la fase di **rivelazione**.

Tabella 6: schema riassuntivo degli anticorpi primari utilizzati per i saggi ELISA.

NOME ANTISIERO	N°	DILUIZIONE
Anti - VGF C-terminus	215	1:12000
Anti - NAPP	1758	1:100000
Anti - ERVW	1837	1:160000
Anti - TLQP-21 (N-t).	717	1:5000

- **Rivelazione:** la piastra a questo punto veniva incubata con tetra-metil-benzidina (TMB X-tra, Kementec, Taastrup, Danimarca) per 10 minuti, a temperatura ambiente, in agitazione. La reazione veniva bloccata tramite aggiunta di HCl (1mol/l; 100 µl/pozzetto). A questo punto si effettuava misura densitometrica con lettore multifunzionale (*Plate Chameleon Multi Label Detection Platform HIDEX*), in assorbanza a 450nm, entro 30 minuti dal bloccaggio.

3.5 Microscopia e acquisizione di immagini

I preparati furono osservati e fotografati mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza (Olympus BX60), al quale è connesso un sistema prototipo che permette l'eccitazione multipla di diversi fluorocromi con visualizzazione simultanea sino a 5 canali nel visibile + infrarosso) con regolazione separata per ciascuna banda di eccitazione.

Il microscopio è fornito di fotocamere digitali Fuji (S3 PRO e S5 PRO; Fujifilm, Milano, Italia) interfacciate a PC.

Le fotografie sono state scattate a diversi ingrandimenti (principalmente a 10X e 20X) a seconda dell'uso.

3.5.1 Analisi d'immagine

Approcci di analisi d'immagine furono utilizzati per delineare in modo quantitativo differenze suggerite dall'osservazione dei preparati immunocolorati. Le aree di interesse furono fotografate in condizioni standardizzate, utilizzando un obiettivo 10X (aree ipotalamiche), o 20X (insule pancreatiche). Per ciascuna sessione fotografica fu utilizzato un set misto di preparati da animali di tutti i sottogruppi studiati, immunocolorati in parallelo. Per ciascuna delle due aree studiate: *in primis*, furono ottimizzate le condizioni di esposizione fotografica (in base ad alcune esposizioni pilota), quindi fu impostato manualmente il tempo di esposizione che rimase costante per tutte le fotografie. Per ciascuna area di interesse furono utilizzate per la quantificazione tre immagini, ottenute a partire da tre sezioni (tagliate ad una distanza di almeno 30 μm l'una dall'altra) per ciascun animale ed immunocolorazione. Per il nucleo soprachiasmatico, le analisi furono condotte selezionando l'area di entrambi i nuclei dei due lati. Per il pancreas, l'area selezionata corrispondeva all'intera insula.

Furono quantificati due diversi parametri:

1. **La densità ottica media:** utilizzata per valutare il grado di marcatura delle strutture immunocolorate (fibre nervose, pericari neuronali e/o cellule endocrine insulari, rispettivamente). Utilizzando immagini in formato TIFF (8 bit), con il software ImageJ (*National Institute of Health*, NIH) si impostavano valori di luminosità e contrasto automatici. Successivamente veniva effettuato *Thresholding* (sotto controllo visivo), grazie al quale le aree immunomarcate venivano distinte da quelle non immunocolorate (sopra e sotto valori di *threshold*, rispettivamente, rese in scala di grigio, ed in bianco, rispettivamente). A ciascun pixel dell'immagine veniva assegnato un valore sulla scala dei grigi, compreso tra il valore di *threshold* ed il valore di densità ottica massimale (nero = 255). Veniva quindi selezionata l'area tessutale di interesse, circoscrivendola entro un poligono delineato interattivamente. Entro tale area il programma effettuava il calcolo della densità ottica media dei pixel sopra *threshold* (immunocolorati). Tale misurazione veniva convertita secondo una scala di valori arbitrari, distribuiti tra il valore di *threshold* e la densità ottica massimale (valore del nero).
2. **Conteggio cellule immunoreattive per area:** tale analisi era diretta a valutare le popolazioni di pericari neuronali, ovvero di cellule endocrine pancreatiche immunocolorate per ciascuna area analizzata. Per ridurre *bias* dovuti a variazioni volumetriche degli elementi cellulari studiati, venivano contati soltanto neuroni / cellule che mostravano un profilo visibile del nucleo nella sezione. Ciò in base all'assunto comunemente usato che il nucleo presenti variazioni volumetriche minime, o comunque assai minori di quelle delle cellule complessivamente, almeno per i tipi cellulari qui studiati. Per tale procedura si partiva da un'immagine (formato TIFF; 8 bit). Con il software

ImageJ veniva *in primis* delineata l'area di interesse entro cui effettuare il conteggio, come descritto in precedenza. Quindi, utilizzando la funzione “*Cell counter*” venivano selezionate a mano interattivamente le cellule individualmente riconosciute come immunocolorate (cioè chiaramente distinte dal fondo, ancorchè con variabili intensità di marcatura), che il programma registrava e conteggiava. Il numero delle cellule conteggiate fu espresso in unità per area analizzata (numero/mm²). Tale valutazione fu effettuata sulle medesime immagini utilizzate per la misurazione della densità ottica.

3.5.2 Analisi di co-localizzazione

Su preparati del Nucleo Soprachiasmatico in doppia immunocolorazione, furono contati i corpi cellulari evidenziati per ciascuna delle due marcature, nonché quelli simultaneamente marcati da entrambe. I risultati furono espressi in percentuale di cellule doppiamente marcate, rispetto al totale delle cellule marcate per il marcatore espresso con maggior frequenza.

3.6 Analisi statistica

I dati provenienti dai saggi ELISA sono stati analizzati mediante test ANOVA (one-way), seguiti da T-test, utilizzando il software StatistiXL. Allo stesso modo i dati derivanti dall'analisi d'immagine furono analizzati confrontando i valori (percentuale di area immunoreattiva e conteggio cellule immunopositive) tramite l'applicazione dei medesimi test sopracitati. Quando la loro risultante determinava un p uguale o inferiore a 0.05, i sottogruppi confrontati furono considerati statisticamente diversi.

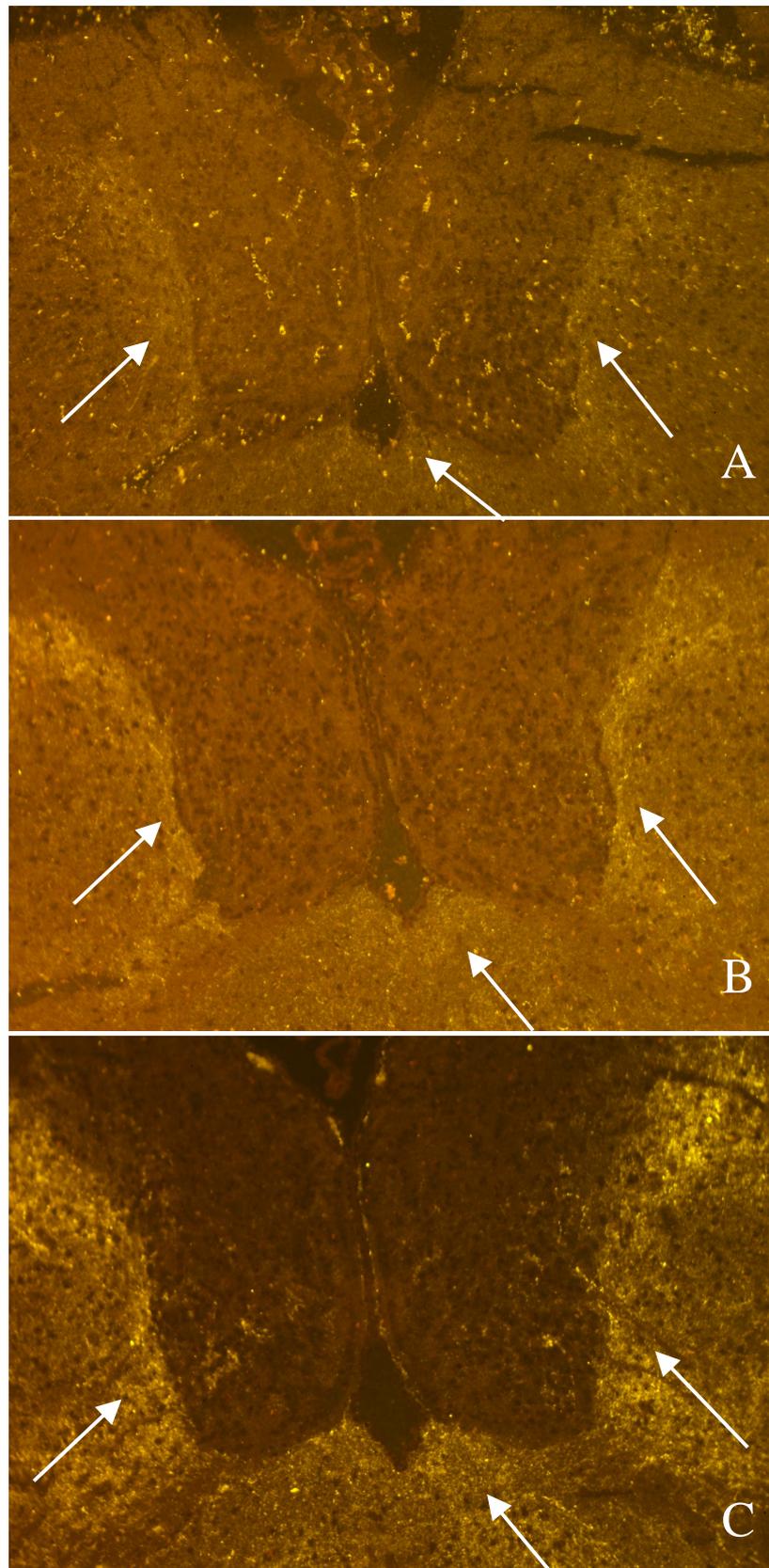
4. RISULTATI E COMMENTI

4.1 Purificazione di Anticorpi

Come sopra delineato, purificazioni per affinità dei nostri anticorpi furono in vari casi condotte per migliorare la qualità delle immunolorazioni ed il relativo rapporto segnale-rumore. Mostro qui di seguito un esempio rappresentativo (Fig. 6, pagina seguente: 53), in riferimento ad area cerebrale utilizzata per prove pilota di messa a punto, ancorchè non specificamente oggetto della presente tesi (confronto in parallelo tra: antisiero, corrispondente frazione IgG, e corrispondente frazione purificata per affinità). Dalle foto presentate a pagina 53 si possono ben apprezzare chiare differenze nella qualità di colorazione e nel rapporto segnale-rumore, con buon evidenziamento dei numerosi assoni di piccolo calibro in “C” (anticorpi purificati per affinità).

In conclusione, si verificò un chiaro aumento del rapporto segnale-rumore, per taluni antisieri per i quali il *background* dovuto a legame aspecifico dell’anticorpo poteva essere un problema, e che invece dopo purificazione diminuiva nettamente fin quasi a scomparire.

Fig. 6: Confronto immunocolorezione nel nucleo periventricolare del talamo: (A) antisiero in toto; (B) frazione IgG; e (C) anticorpi ottenuti con la purificazione per affinità



In secondo luogo, in alcuni casi fu condotta una dettagliata analisi della reattività molecolare di anticorpi di interesse, specie per quanto riguarda quelli diretti contro la sequenza **TLQPPASSRR**, ovvero l'estremo N-terminale del peptide VGF denominato: TLQP-21, identico in quella porzione al peptide: TLQP-62, che è semplicemente esteso al C-termino rispetto a TLQP-21. Furono così trattati alcuni antisieri prodotti in PECORA, due dei quali risultavano di alto titolo, in condizioni non competitive che mimavano ad esempio le procedure immunoistochimiche. Si purificò la frazione IgG su una colonna cui era stato legato uno qualsiasi dei tre peptidi di sequenza embricate (PRIMA PURIFICAZIONE):

- **TLQPPASSRR**

sequenza identica all'N-termino dei peptidi bioattivi TLQP-21 e/o TLQP-62, come si diceva

- **RTLQPPASSRR**

sequenza estesa al suo N-termino con un aminoacido: Arg. Tale modificazione include uno degli aminoacidi che fanno parte del sito di clivaggio utilizzato per la biosintesi endogena di TLQP-21 o TLQP-62, e rende la sequenza più simile a quella non clivata presente all'interno di VGF precursore.

- **LQPPASSRR**

sequenza con delezione di un aminoacido all'N-termino, che intende mimare eventuali modificazioni intra-tessutali, ad esempio da proteasi o enzimi tissutali.

Si recuperò quindi l'effluente di LAVAGGIO, che avrebbe potuto contenere quote di anticorpi specificamente reattivi con l'uno o l'altro degli ALTRI DUE peptidi. Tale effluente di lavaggio fu quindi "purificato" (SECONDA PURIFICAZIONE IN SEQUENZA) usando una colonna cui era stato legato l'uno o l'altro dei due peptidi

rimanenti. Riassumendo sinteticamente: qualunque peptide fosse stato usato per la PRIMA PURIFICAZIONE, si ottene una quantità comparabile di anticorpi purificati (mg di anticorpi), ma soprattutto NON si recuperò alcuna significativa quantità di anticorpi dalla SECONDA PURIFICAZIONE applicata all'effluente di lavaggio. In pratica, dalla PRIMA PURIFICAZIONE si recuperò la totalità degli anticorpi "anti-TLQP" prodotti dall'animale, qualunque antigene fosse stato legato nella colonna usata per tale (PRIMA) purificazione. In conclusione, quindi, i due antisieri ad alto titolo prodotti in pecora contenevano (soltanto) anticorpi che reagivano similmente con i tre antigeni descritti, quindi: (i) con TLQP clivato, (ii) con il precursore VGF o forme similmente estese all'N-termino di TLQP-21, (iii) con forme con delezione dell'aminoacido T localizzato all'estremo N-terminale di TLQP-21 e forme apparentate.

Parallelamente, furono trattati alcuni campioni di antisieri prodotti in Porcellino d'India, in misura più limitata in rapporto al volume di antisiero originariamente disponibile, molto inferiore rispetto a quello degli antisieri prodotti in pecora in rapporto alla massa corporea e volume di sangue circolante. Tuttavia, è stato possibile valutare la reattività degli anticorpi da essi purificati come segue:

- **TLQPPASSRR** : positiva
- **RTLQPPASSRR** : negativa

Le conclusioni operative, richiamate più oltre, furono:

- i due anticorpi prodotti in PECORA sopra menzionati CROSS-REAGISCONO estesamente con i peptidi TLQP-21 e TLQP-62, ma anche con VGF precursore, o altri peptidi clivati dal precursore che contengano al loro interno la sequenza analizzata (esempio: NAPP-128, che si estende per 128 residui aminoacidici, dalla posizione N₄₈₉, inizio del peptide NAPP, sino al C-termino di VGF).
- gli anticorpi prodotti in PORCELLINO D'INDIA sopra menzionati reagiscono invece SELETTIVAMENTE con i peptidi TLQP-21 e TLQP-62 clivati (o con

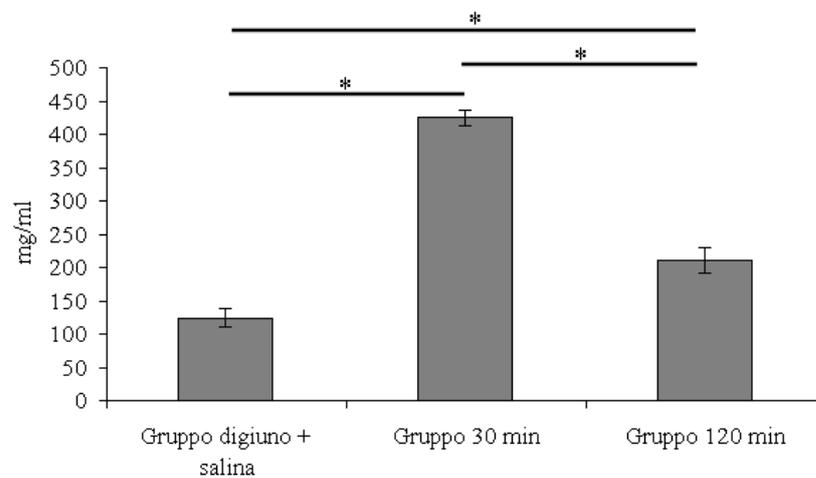
eventuali altre forme di diversa estensione nella porzione C-terminale, ma comunque contenenti la sequenza N-terminale analizzata nella sua forma clivata), mentre NON REAGISCONO con VGF precursore o altre forme che contengano la sequenza analizzata al loro interno, ovviamente estesa in direzione N-terminale.

4.2 Risultati sperimentali: plasma

Immediatamente prima del sacrificio, si ottenne un campione di sangue venoso periferico (da vasi della coda), per la misura della glicemia.

Come atteso, furono ritrovati valori ben distinti fra diversi gruppi, infatti la glicemia (Fig.7) saliva a 30 minuti, per ridiscendere dopo 120 minuti, sebbene con valori ancora superiori rispetto a quelli basali.

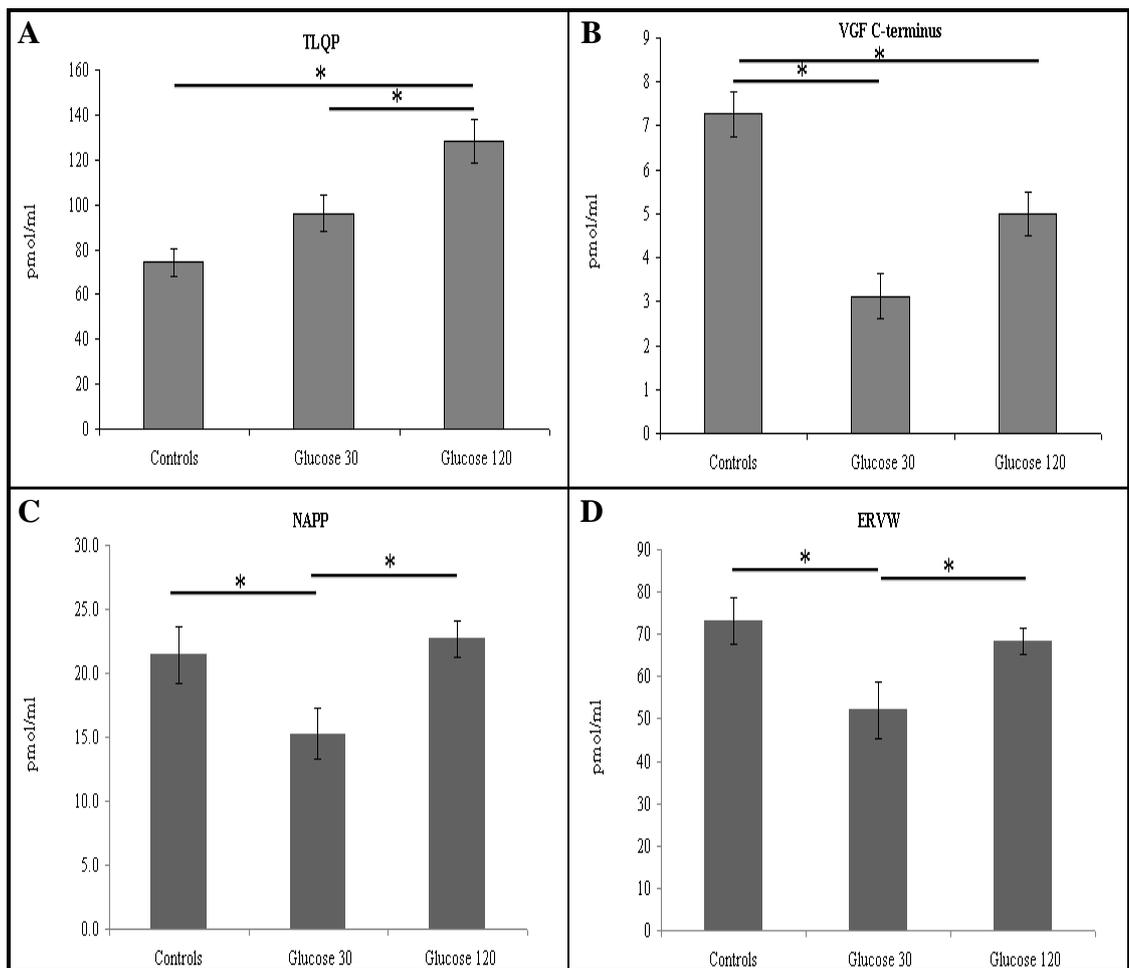
Fig. 7: Andamento della glicemia nel Gruppo di animali normali di 12 settimane.



I diversi VGF peptidi furono studiati nel plasma nei gruppi: “1a”, “1b” ed “1c” (rispettivamente: carico di glucosio e sacrificio a 30 minuti; carico di glucosio e sacrificio a 120 minuti; salina e sacrificio a 30-120 minuti). L’immunoreattività per TLQP (Fig. 8, grafico A) tendeva a salire già dopo 30 minuti, ma raggiungeva il picco a 120 minuti (livelli significativamente più alti sia rispetto a quelli di base, sia rispetto a quelli a 30 minuti). Per quanto riguarda l’immunoreattività per il C-termino di VGF (Fig. 8, grafico B), i livelli erano nettamente più bassi dopo carico di glucosio, sia a 30 che a 120 minuti ($p < 0.05$). I livelli a 120 minuti mostravano una tendenza al rialzo, tuttavia con valori ancora significativamente inferiori rispetto a quelli di base (*ibidem*). Prendendo in analisi i frammenti di VGF chiamati NAPP e ERVW fu trovato un andamento di immunoreattività simile al picco glicemico: l’immunoreattività per

entrambi i peptidi pareva comportarsi in maniera inversamente correlata alle oscillazioni della glicemia, con immunoreattività per NAPP e per ERVW ridotte a 30 minuti, e ritorno a valori comparabili a quelli di base a 120 minuti ($p < 0.05$, Fig. 8, grafico C e D).

Fig. 8: Immunoreattività per i VGF-peptidi nel plasma di topi di 12 settimane. A: grafico dell'andamento del TLQP (Controlli vs. Glucose 30 $p=0.066$, Controlli vs. Glucose 120 $*p=0.00012$, Glucose 30 vs. Glucose 120 $*p=0.008$); B: grafico dell'andamento del VGF C-terminus (Controlli vs. Glucose 30 $*p=0.003$, Controlli vs. Glucose 120 $*p=0.041$, Glucose 30 vs. Glucose 120 $p=0.084$); C: grafico dell'andamento del NAPP (Controlli vs. Glucose 30 $*p=0.036$, Controlli vs. Glucose 120 $p=0.644$, Glucose 30 vs. Glucose 120 $*p=0.036$); D: grafico dell'andamento dell' ERVW (Controlli vs. Glucose 30 $*p=0.033$, Controlli vs. Glucose 120 $p=0.546$, Glucose 30 vs. Glucose 120 $*p=0.044$).



In rapporto ad un precedente studio condotto nel nostro laboratorio (D'Amato et al, 2015), i valori basali e l'andamento della risposta plasmatica al glucosio osservate allora risultano sostanzialmente comparabili con quelle qui descritte (controlli e 120'). Fanno eccezione i valori basali di peptidi correlati al C-termino di VGF: essi risultarono allora inferiori in condizioni basali, con modica ma significativa risposta al glucosio a 120 minuti, qui non confermata.

4.3 Analisi tessutale su pancreas

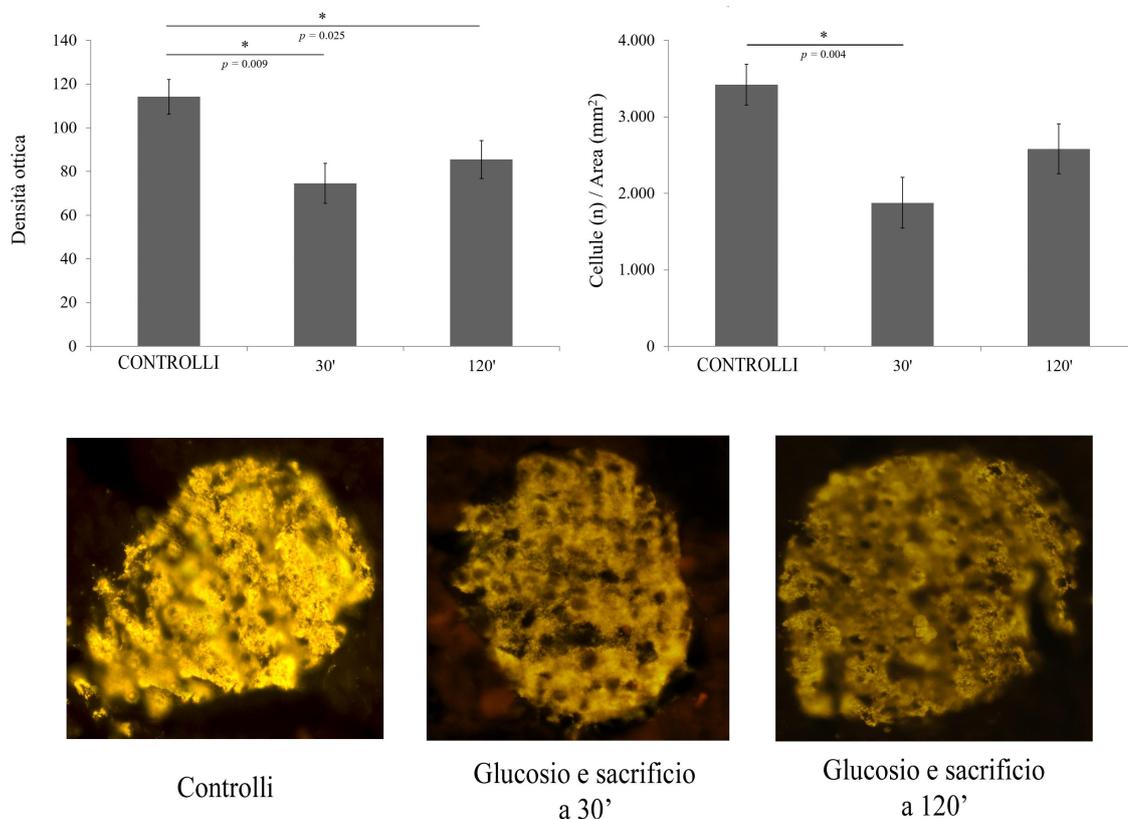
4.3.1 Pancreas, Gruppo sperimentale 1

Sezioni di pancreas prelevato dai sottogruppi “1a” “1b” ed “1c” furono immunocolorate con anticorpi: (i) Anti-insulina; (ii) Anti-TLQP; (iii) Anti-NAPP; (iv) Anti-ERVW (anti-C-termino del peptide QQET-30); (v) Anti-VGF C-termino. Analizzando le immunocolorazioni, fu chiaro che, come già pubblicato, gli anticorpi anti-TLQP marcavano in misura evidente una “corona” di cellule periferiche dell’insula, mentre gli anticorpi anti-VGF C-termino e anti-NAPP, coloravano distintamente cellule della porzione centrale dell’insula. In doppia colorazione queste ultime marcature erano localizzate largamente in cellule esprimenti insulina. In aggiunta, l’anticorpo contro VGF C-termino colorava fini assoni bottonuti intorno ed all’interno delle isole di Langerhans. Utilizzando l’anticorpo anti-ERVW (C-termino di QQET-30) non si reperì nessuna evidente colorazione, pertanto l’uso di tale anticorpo su sezioni di pancreas fu interrotto.

Immunocolorazioni con l’anticorpo anti-insulina suggerì alcune modulazioni visibili. Si rilevò ridotta densità di colorazione 30 minuti ($p = 0.009$) e 120 minuti dopo il carico di glucosio ($p = 0.025$), che si rifletteva nella riduzione del numero di cellule positive “sopra soglia” dopo 30 minuti dal carico ($p = 0.004$; Fig.9, pagina 61), e una tendenza alla ripresa a 120 minuti.

Fig. 9: Immunocolorazione per insulina (pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura: Cy3; *: differenza significativa.

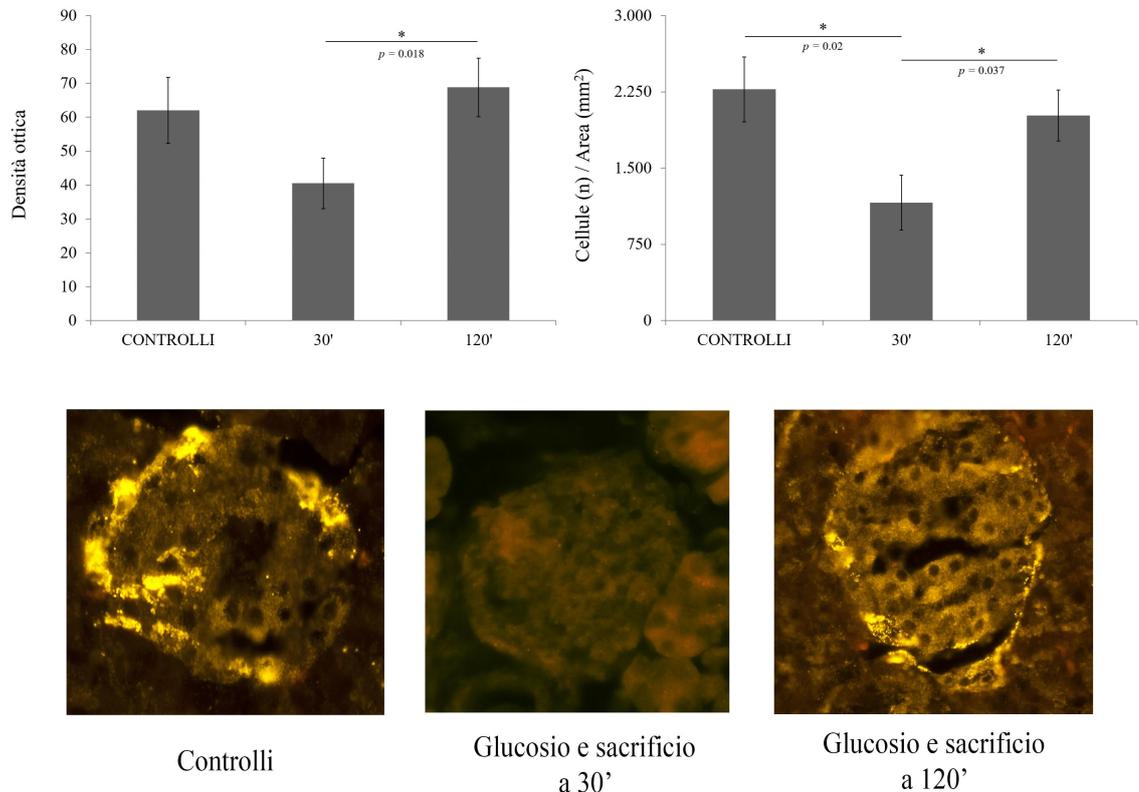


Come sopra menzionato, l'anticorpo anti-TLQP mostrò una distinta immunoreattività in cellule alla periferia delle insule, con l'aggiunta di un certo grado di immunocolorazione in cellule centrali (*bona fide* cellule ad insulina: vedi Fig. 10, pagina 62). A 30 minuti si evidenziò una netta diminuzione dell'immunocolorazione (rispetto a quella riscontrata a 120 minuti, $p = 0.018$), in parallelo con una marcata riduzione sia dell'area immunoreattiva, che del numero di cellule positive ($p = 0.02$; $p = 0.037$; Fig. 10, pagina 62). A 120 minuti il quadro immunoistochimico era tornato simile a quello visto in condizioni basali, con normalizzazione anche dei parametri quantitativi.

Ciò parrebbe suggerire un massiccio release del peptide al picco glicemico (a 30 minuti) parallelo a quello di insulina. Al contempo, i valori plasmatici (vedi sopra e Fig. 8, pagina 58) indicarono una progressiva elevazione dell'immunoreattività plasmatica per

TLQP peptide/i. Ipotizzando che almeno parte significativa di tale peptide abbia origine pancreatica, si potrebbe suggerire l'embricarsi di due fasi: (i) a 30 minuti (picco glicemico), un aumentato release di TLQP peptidi da pool intracellulari, eventualmente associata ad aumentata processazione di VGF precursore già presente; (ii) a 120 minuti, il proseguire del release, associato a distinta induzione genica e nuova biosintesi di VGF e suoi prodotti. Ciò spiegherebbe sia il ripristino del pool intracellulare immunocolorabile, che l'ulteriore elevazione in circolo.

Fig. 10: Immunocolorazione per TLQP peptide/i (pannelli inferiori), e relativa quantificazione. Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura: Cy3; *: differenza significativa.

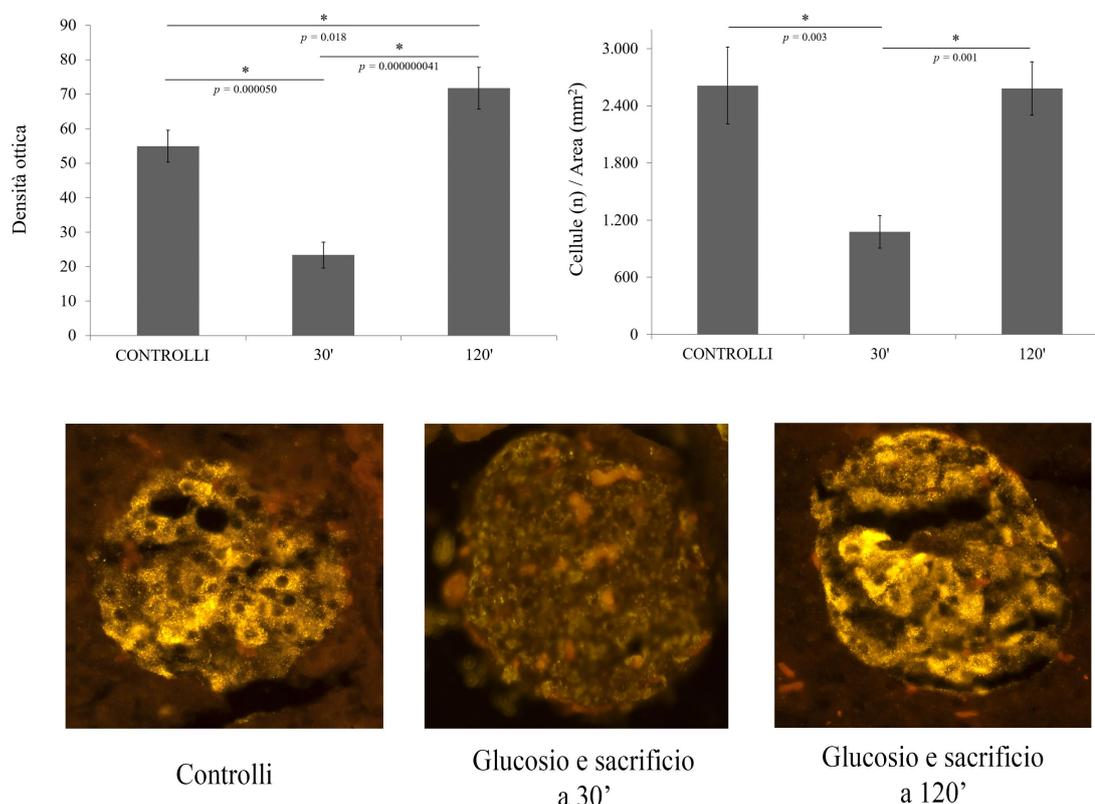


L'immunocolorazione con anticorpi contro il C-termino di VGF risultò in colorazione prevalente nel *core* centrale delle insule, quindi in cellule a insulina. Il profilo di risposta al glucosio mimava in qualche misura quello osservato per TLQP peptide/i, con chiara riduzione a 30 minuti, seguita da un aumento a 120 minuti rispetto al quadro basale ($p = 0.018$). Si riscontrò significativa riduzione dell'area percentuale immunocolorata a 30 minuti, rispetto a basale ed a 120 minuti ($p < 0.001$). Un simile andamento si riscontrò analizzando il numero di cellule immunopositive per area, ancorchè con differenze significative solo tra gli animali sacrificati dopo 30 minuti rispetto agli altri due sottogruppi (120 minuti: $p = 0.001$, Controlli: $p = 0.003$; Fig. 11, pagina 64).

La risposta plasmatica che riscontrammo (vedi Fig. 8, pagina 58) mostra una generale riduzione dell'immunoreattività per peptidi correlati al C-termino di VGF, sia a 30 che a 120 minuti. Nell'ipotesi che tali variazioni siano correlabili a variazioni di release dalle insule pancreatiche, si potrebbe speculare su una forte stimolazione dei meccanismi di processazione, con release preferenziale di un subset di prodotti clivati di VGF (es.: TLQP peptidi). È qui opportuno richiamare che in uno studio precedente rilevammo valori modicamente inferiori in condizioni di base (D'Amato et al., 2015), però associati a risposta positiva dopo glucosio a 120 minuti, qui non confermata (solo per il presente peptide/i).

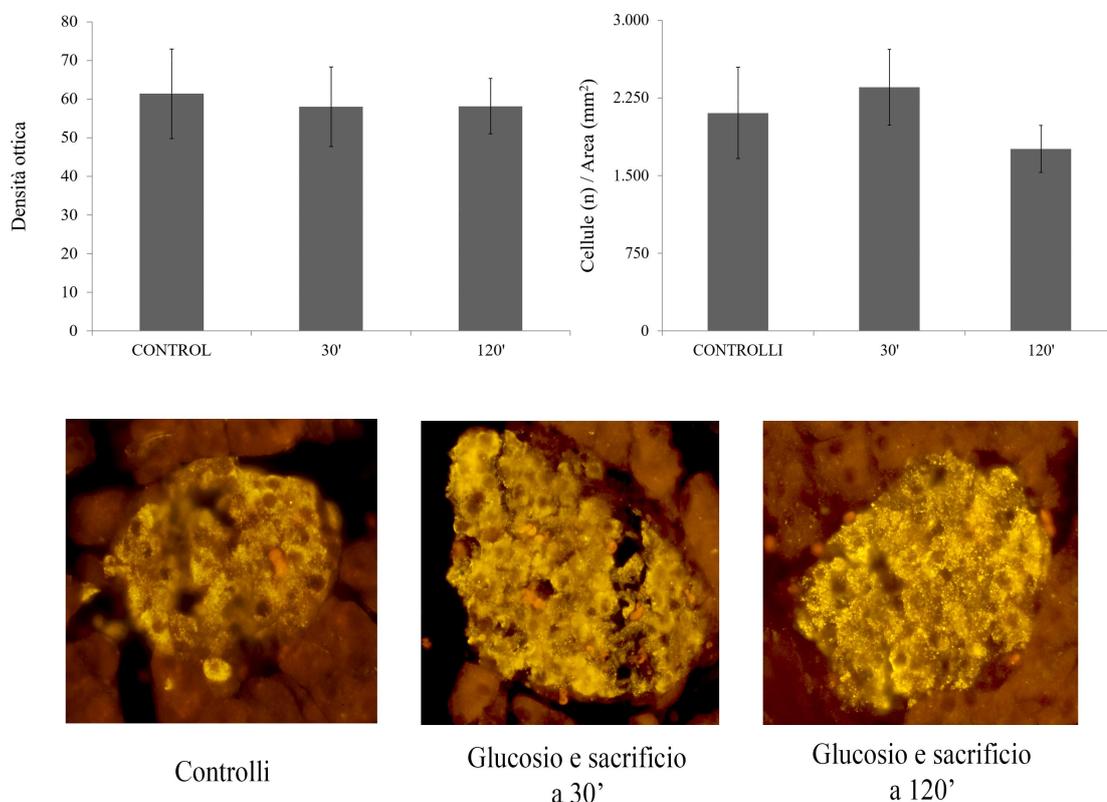
Fig. 11: Immunocolorazione per peptide/i correlati all'estremo C-terminale di VGF (pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura: Cy3; *: differenza significativa.



In condizioni di controllo, anche l'immunocolorazione per NAPP peptidi era prevalentemente centrale, ancorchè a bassa intensità (Fig. 12, pagina 65). Le misurazioni di densità ottica media e del numero di cellule per area, ottenute utilizzando l'anticorpo anti NAPP peptidi, non evidenziarono differenze significative fra i diversi sottogruppi (vedi Fig. 12, pagina 65).

Fig. 12: Immunocolorazione per NAPP peptide/i (pannelli inferiori), e relativa quantificazione. Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura: Cy3.



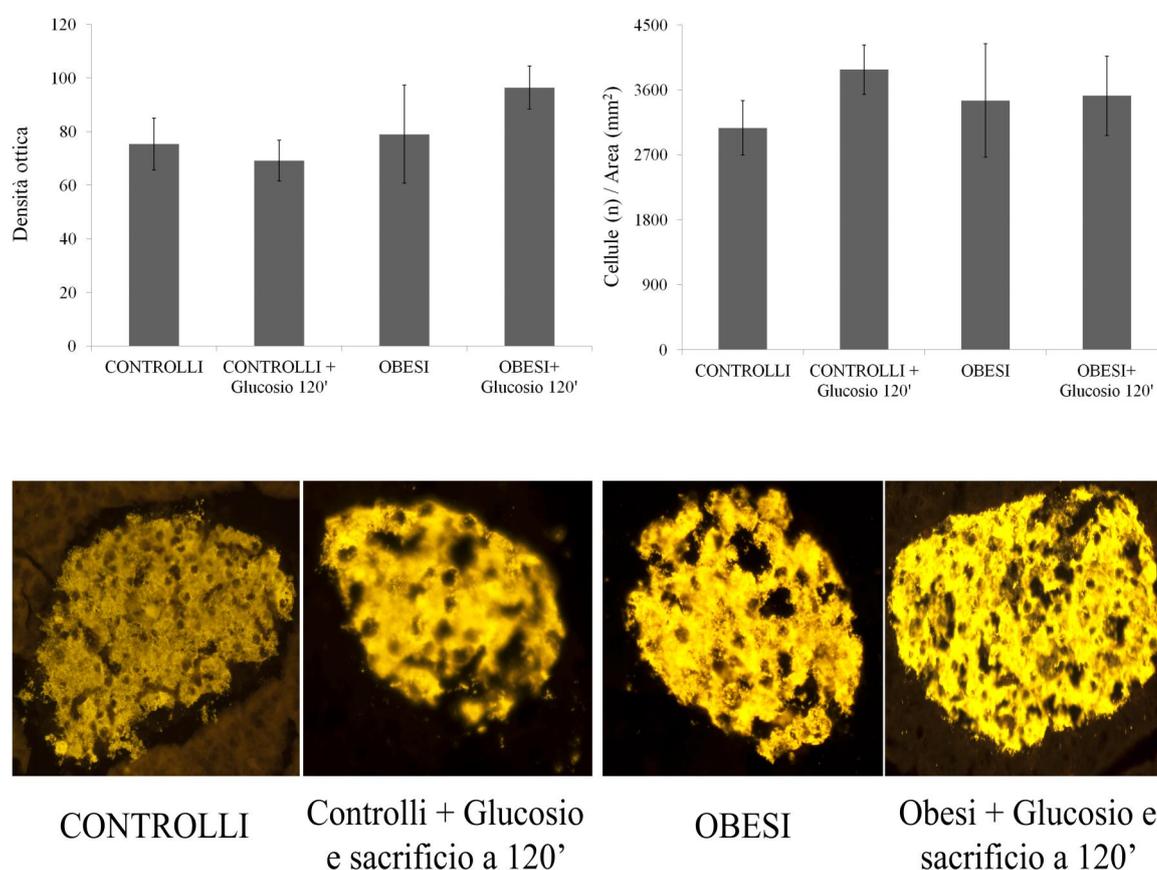
4.3.2 Pancreas, Gruppo sperimentale 2

Da un lavoro precedente del nostro gruppo risultava che i livelli plasmatici di VGF peptidi analoghi a quelli qui studiati erano ridotti in animali resi obesi con dieta iperlipidica (D'amato et al., 2015). Quindi per indagare sulle possibili differenze reperibili a livello tissutale furono utilizzati alcuni campioni resi disponibili nel corso del suddetto studio. I relativi animali e campioni sono qui denominati "Gruppo 2", vedi paragrafo 3.2: Animali). Ricordo che tale parte della presente investigazione fu condotta quale "STUDIO PILOTA", in rapporto al piccolo numero di campioni disponibili per ognuno dei sottogruppi di animali (2a, 2b, 2c, e 2d: tre campioni utilizzabili / gruppo).

L'immunocolorazione per l'insulina (Fig. 13, pannelli inferiori), come pure l'analisi statistica non evidenziarono alcuna differenza significativa né per quanto riguarda i valori di densità ottica media né per quanto concerne i dati derivanti dai conteggi (Fig. 13: pannelli superiori).

Fig. 13: Immunocolorazione per insulina (pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

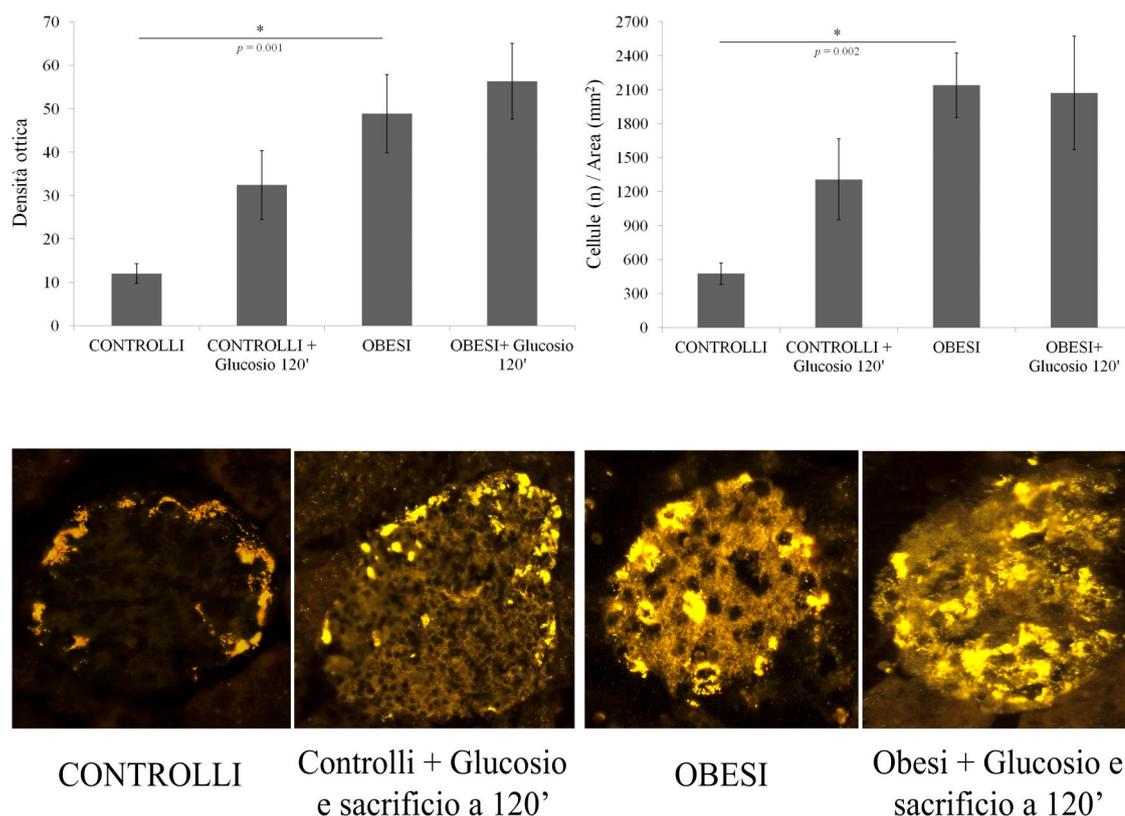
Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: senza carico di glucosio; immunomarcatura: Cy3.



Anche qui l'immunoreattività per TLQP peptide/i era prevalentemente localizzata alla periferia dell'insula nei controlli (normopeso), con incremento della reattività e relativi parametri quantitativi 120 minuti dopo il carico di glucosio (Fig. 14, pagina 68: pannelli inferiori 1-2, e barre 1-2 nei pannelli superiori). Riprendendo l'ipotesi proposta per il Gruppo 1 (vedi sopra: Fig. 10 e commenti associati), in questo caso la "fase 2" a 120

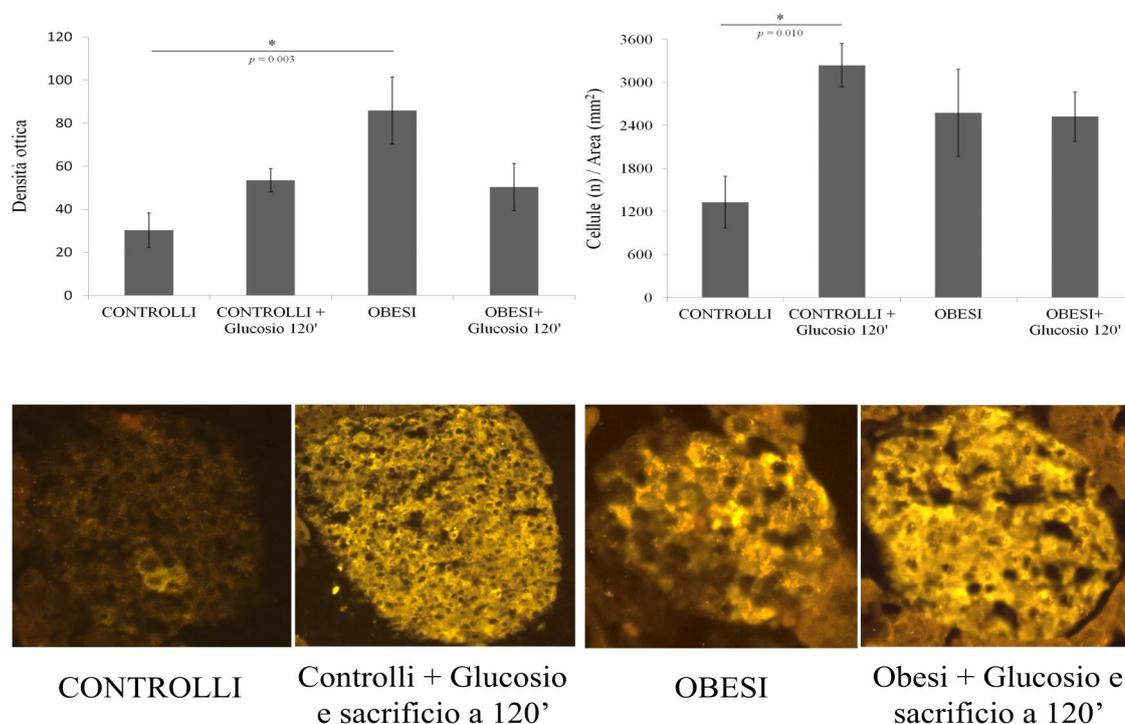
minuti potrebbe vedere una risposta maggiore o temporalmente più estesa che per il Gruppo 1. Di particolare rilievo i campioni da topi obesi, nei quali si riscontrò un'immunoreattività ancora più spiccata per TLQP peptide/i, estesa anche alla parte centrale dell'insula (Fig. 14, pagina 68 ultimi due pannelli). Le analisi quantitative diedero risultati analoghi, con scarse differenze in rapporto al carico glucidico (Fig.14, pagina 68). È rilevante notare che i valori plasmatici di TLQP peptidi risultavano ridotti nei topi obesi, con scarse differenze in rapporto al carico di glucosio (D'Amato et al., 2015). Nell'insieme, si potrebbe ipotizzare un ridotto *release* di TLQP peptidi nel modello di obesità da alimentazione iperlipidica, che spiegherebbe anche la maggiore immunoreattività a livello delle cellule insulari.

Fig. 14: Immunocolorazione per TLQP peptide/i (pannelli inferiori), e relativa quantificazione. Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: senza carico di glucosio; immunomarcatura: Cy3; *: differenza significativa.



Per quanto riguarda NAPP peptide/i (Fig 15, pagina 69), confrontando i dati derivanti dal sottogruppo dei topi normopeso e il sottogruppo dei topi obesi, è apparso chiaro che i livelli di NAPP-peptidi nel pancreas di questi ultimi risultano più alti rispetto ai valori che furono riscontrati nei normopeso ($p = 0.003$), questo suggerirebbe una tendenza all'accumulo intracellulare del peptide in condizioni di obesità, senza visibili variazioni dopo il carico di glucosio (Fig. 15, pagina 69). Anche i valori plasmatici di NAPP peptidi risultavano ridotti nei topi obesi, con scarse differenze in rapporto al carico di glucosio (D'Amato et al., 2015).

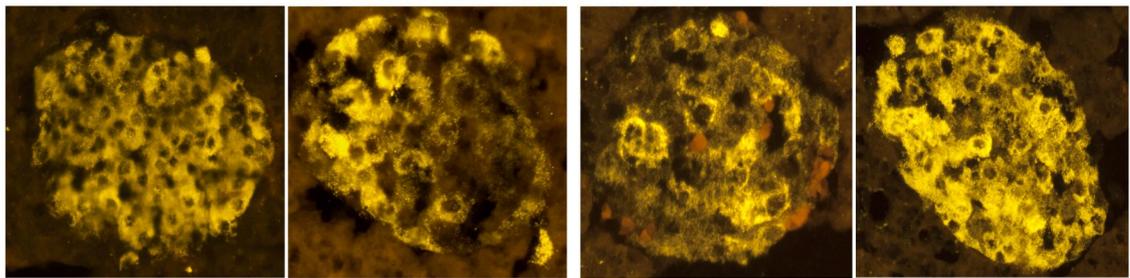
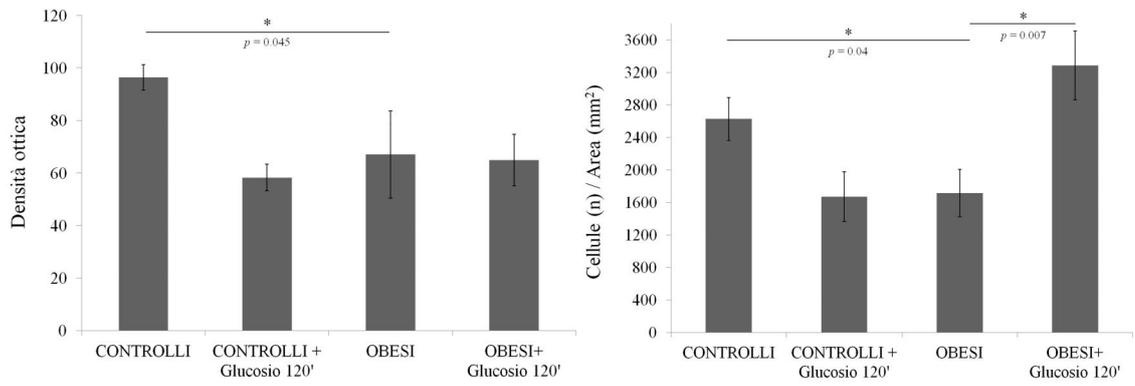
Fig. 15: Immunocolorazione per NAPP peptide/i (pannelli inferiori), e relativa quantificazione. Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: senza carico di glucosio; immunomarcatura: Cy3; *: differenza significativa.



Per quanto riguarda peptidi correlati alla sequenza C-terminale di VGF, in immunoistochimica si delineò un quadro sfaccettato, con considerevole eterogeneità nel grado di colorazione delle singole cellule, e quindi con popolazioni insulari di lieve, media ed intensa reattività (Fig.16, pagina 70, pannelli inferiori). Tale aspetto rende difficile interpretare i risultati della quantificazione, scarsamente concordanti tra loro (Fig. 16, pagina 70, pannelli superiori). Anche i valori plasmatici di peptidi correlati al C-termino di VGF risultavano ridotti nei topi obesi, con scarse differenze in rapporto al carico di glucosio (D'Amato et al., 2015).

Fig. 16: Immunocolorazione per peptide/i correlati all'estremo C-terminale di VGF (pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: senza carico di glucosio; immunomarcatura: Cy3; *: differenza significativa.



CONTROLLI

Controlli + Glucosio e sacrificio a 120'

OBESI

Obesi + Glucosio e sacrificio a 120'

4.4 Analisi tessutale nell' ipotalamo

Anche nell'ipotalamo furono evidenziate distinte risposte di VGF-peptidi al carico di glucosio. Come sopra discusso, in una fase preliminare furono analizzate varie aree ipotalamiche maggiormente implicate nel controllo della nutrizione e del metabolismo, compresi: nucleo arcuato; area ipotalamica laterale; nucleo soprachiasmatico (SCN). In rapporto all'osservazione di probabili variazioni / modulazioni di alcuni VGF-peptidi più evidenti nel Nucleo Soprachiasmatico, lo studio oggetto della presente tesi fu concentrato sull'analisi di tale porzione dell'ipotalamo.

È utile richiamare recenti indicazioni a favore del ruolo del nucleo soprachiasmatico nel controllo del metabolismo (Saderi et al., 2013 Kalsbeek et al., 2014; Herrera-Moro Chao et al., 2016; Moran-Ramos et al., 2016).

Per l'analisi del nucleo soprachiasmatico furono utilizzati principalmente sei anticorpi come segue: (1) Anti-VGF C-terminus; (2) Anti-NAPP; (3) Anti-ERVW (C-termino del peptide QQET-30), (4) anti Arg-Vasopressina o AVP; (5) anti-Neuropeptide Tirosina, o NPY; (6) anti α -MSH.

Come sopra descritto, inoltre, furono purificati per affinità alcuni differenti anticorpi contro la porzione N-terminale dei peptidi TLQP (vedi pagina 34). Su tali basi, alcuni anticorpi prodotti in pecora risultarono similmente reattivi in un sistema non-competitivo su colonna per:

- **TLQPPASSRR;**
- **RTLQPPASSRR...**, inteso a mimare la sequenza estesa presente in VGF precursore;
- **LQPPASSRR...**, inteso a mimare eventuali delezioni all'N-termino, ad esempio da parte di proteasi o enzimi tissutali

Altri anticorpi (prodotti in porcellino d'India) mostrarono invece reattività come segue:

- **TLQPPASSRR:** positiva
- **RTLQPPASSRR:** negativa (= assenza di immunoreattività)

Le conclusioni operative furono:

- gli anticorpi prodotti in PECORA cross-reagiscono estesamente con la medesima sequenza di TLQP N-termino, anche quando essa è inclusa (embedded) all'interno del precursore o di forme comunque estese, tali da modificarne o bloccarne il significato biologico e l'eventuale bioattività.
- gli anticorpi prodotti in Porcellino d'India risultano invece altamente specifici per TLQP peptidi clivati (TLQP-21, TLQP-62, ecc), e non reattivi per l'identica sequenza quando estesa all'estremo N-terminale, ovvero inclusa nel precursore.

I due tipi di anticorpi furono applicati parallelamente a sezioni vicine del Nucleo Soprachiasmatico. Ne risultò:

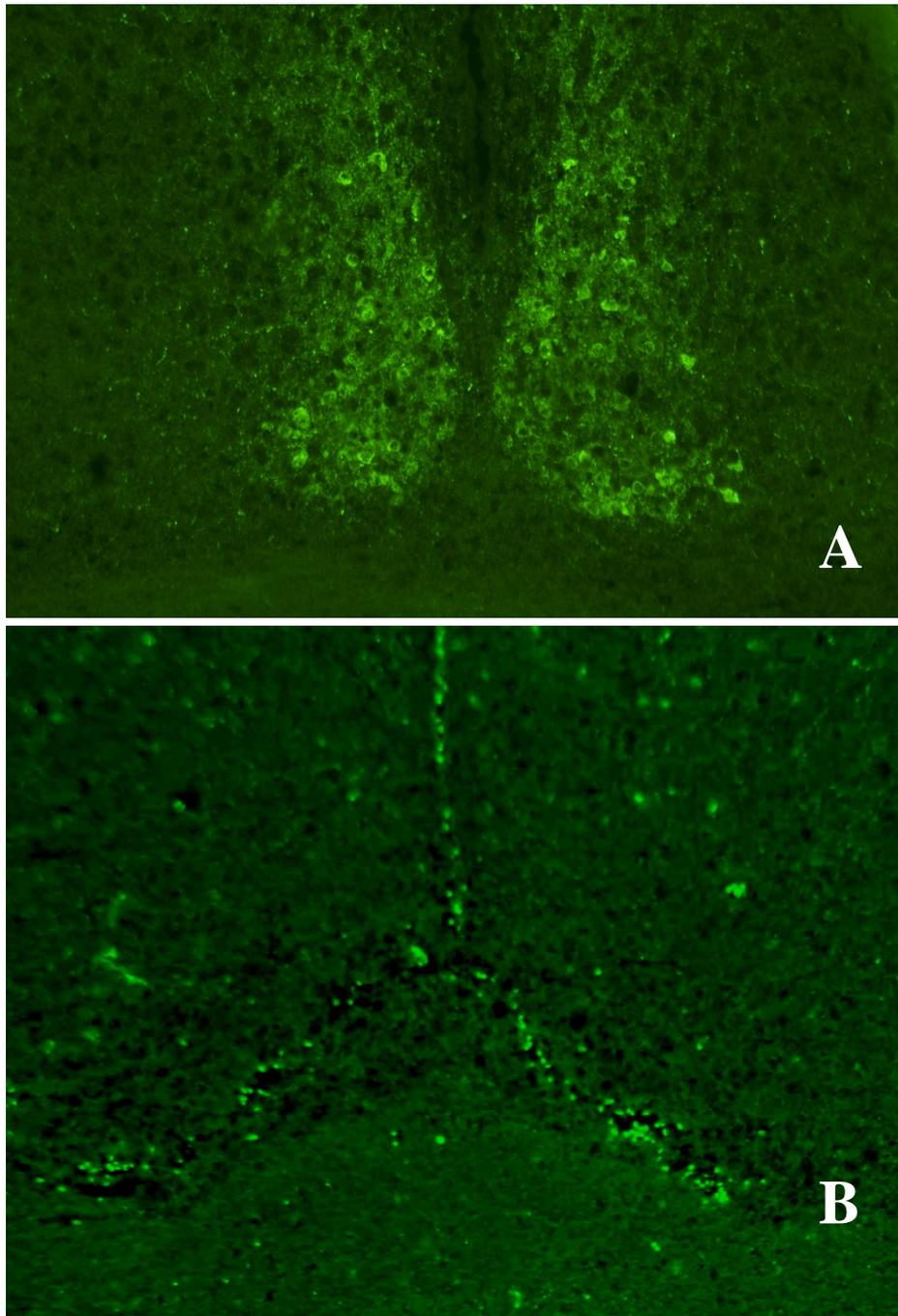
- numerosi assoni varicosi e pericari immunocolorati con gli anticorpi prodotti in pecora (Fig 17, pagina 73 pannello superiore)
- nessuna immunocolorazione con gli anticorpi prodotti in Porcellino d'India, (Fig. 17, pagina 73 pannello inferiore)

Le conclusioni che vogliamo trarne sono fondate sulla dettagliata analisi delle reattività dei due anticorpi in condizioni non-competitive (su colonna), del tutto comparabili a quelle esistenti nel sistema di immunocolorazione su sezione. Esse sono:

- peptidi clivati corrispondenti a TLQP-21, o TLQP-62, o altre forme che condividano il medesimo segmento N-terminale **NON SONO PRODOTTI** nel nucleo soprachiasmatico
- *ibidem* sono invece presenti peptidi in cui la medesima sequenza TLQP è contenuta all'interno di molecole estese **NON** clivate al sito: R₅₅₃P₅₅₄R₅₅₅. Ad

esempio, potrebbe trattarsi di NAPP-128, che si prolunga dal peptide NAPP-19 sino all'estremo C-terminale di VGF precursore (Trani et al., 2002).

Fig. 17: Nucleo soprachiasmatico: immunocolazione ottenuta utilizzando (A) un anticorpo purificato anti-TLQP in pecora, ovvero (B) un anticorpo anti-TLQP in porcellino d'India. Si notino numerosi corpi cellulari ed assoni in A, assenti in B.



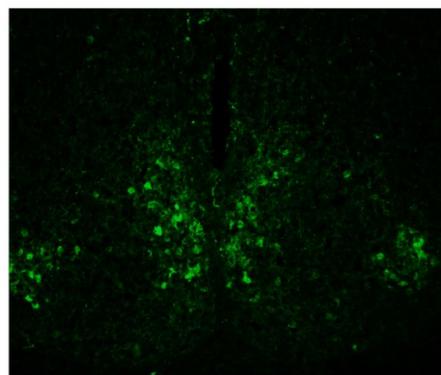
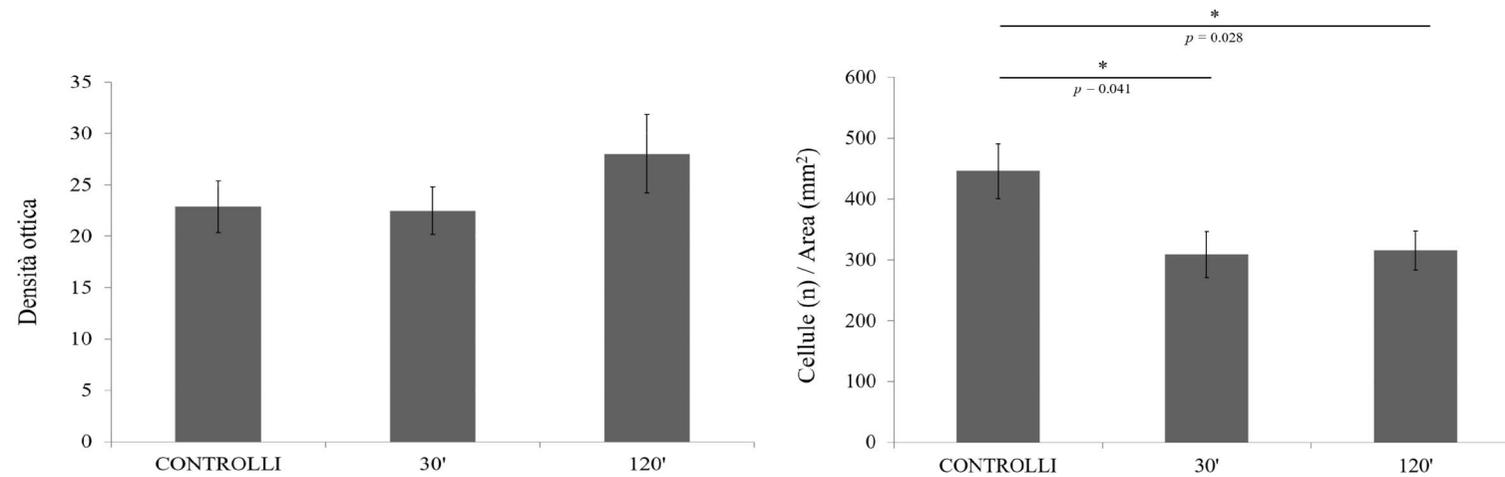
Data la nota presenza di AVP nella porzione “*Shell*” del SCN (Welsh et al., 2010), furono ricercate differenze nella sua immunocolorazione fra i vari diversi sottogruppi analizzati.

L’immunocolorazione evidenziò numerosi pericari, principalmente localizzati a livello dello *Shell* del nucleo. Analizzando quantitativamente le immagini fotografate, non si riscontrarono variazioni significative nella densità ottica media, mentre dopo il carico di glucosio risultava immunocolorato un numero di cellule nettamente inferiore rispetto ai controlli (Fig. 18). Questo potrebbe suggerire che la vasopressina venga in qualche modo rilasciata in seguito alla somministrazione di glucosio.

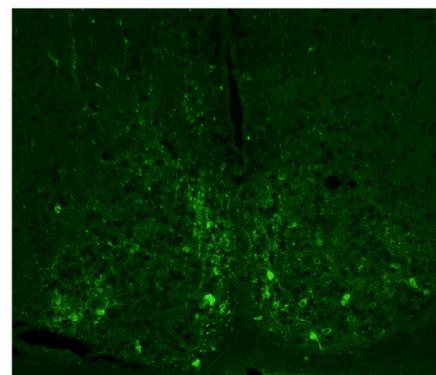
Fig. 18 – vedi Pag. 75 (Pagina seguente)

Fig. 18: Immunocolorazione per AVP (pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

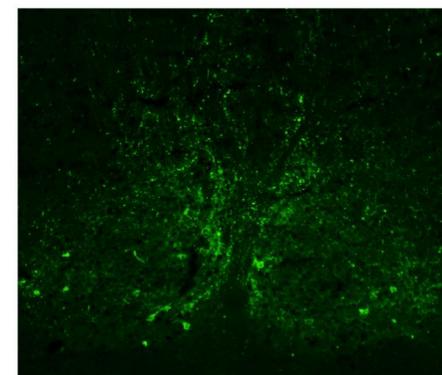
Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura:Alexa488; *: differenza significativa.



Controlli



Glucosio e sacrificio
a 30'



Glucosio e sacrificio
a 120'

Un altro approccio compiuto fu quello di delineare possibili differenze di immunocolorazione per il peptide tirosina (NPY, correlato alla stimolazione della fame, almeno nel N. Arcuato) e per α -MSH (*ibidem* correlato alla sazietà). Infatti, tali neuropeptidi sono ben rappresentati anche nel nucleo soprachiasmatico (Saderi et al., 2013; Guzman-Ruiz et al., 2013).

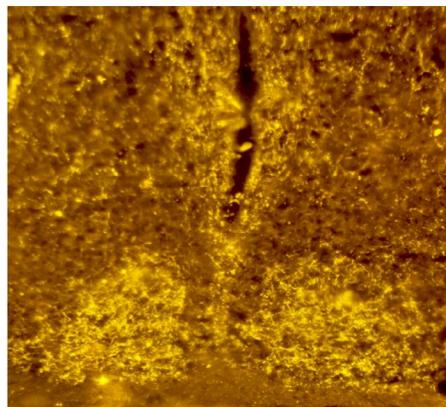
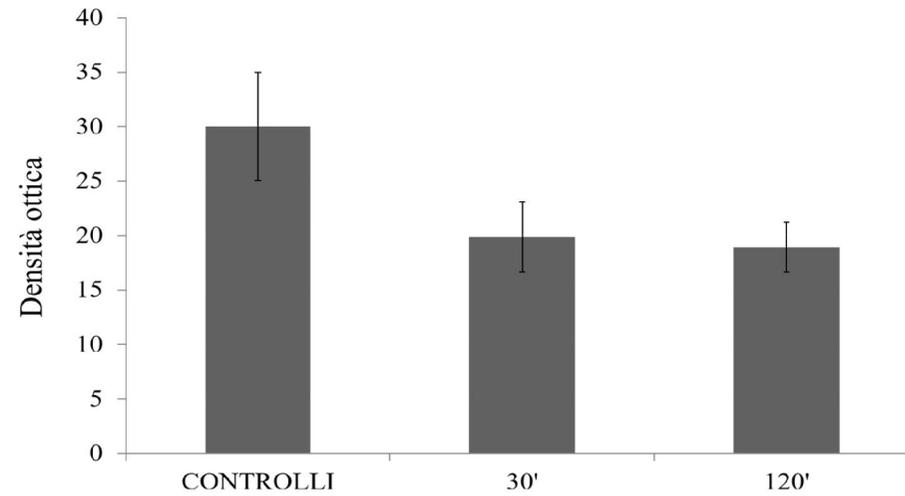
Visivamente, immunoreattività per NPY pareva diminuire di densità in seguito al carico di glucosio (Fig.19, pagina 77). La marcatura assonale riscontrata nel nucleo SCN risultava riempire quasi totalmente il *Core* del nucleo. Non si dimostrarono tuttavia variazioni significative nell'analisi quantitativa, verosimilmente in rapporto ad elevata variabilità.

Per quanto riguarda α -MSH, occorre notare la sua localizzazione in discreti, fini assoni varicosi nel SCN, meglio visibili a medio-alto ingrandimento. Ciò nonostante, fu riscontrata una differenza nella percentuale di area immunoreattiva (Fig.20, pagina 78), con più assoni distinti nella porzione dello *Shell* del nucleo 30 minuti dopo il carico di glucosio, rispetto alla loro leggera degranulazione negli animali di controllo o virtuale assenza di marcatura negli animali che sono stati sacrificati dopo 120 minuti dal carico di glucosio (Fig. 20, pagina 78).

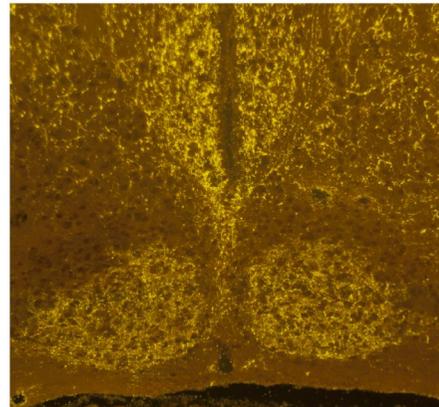
Fig. 19-20– vedi Pagg. 77 e 78 (due pagine seguenti)

Fig. 19: Immunocolorazione per NPY (pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

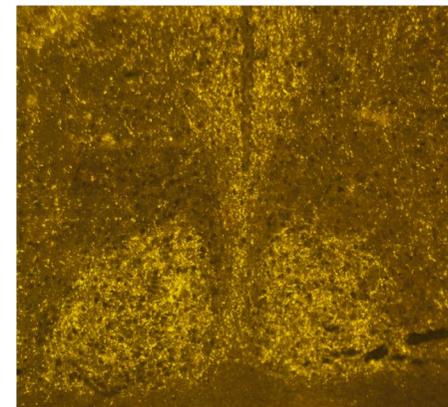
Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura: Cy3.



Controlli



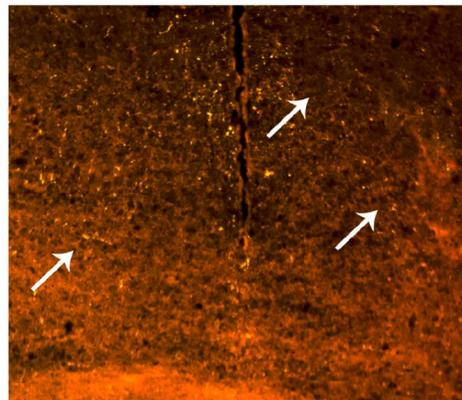
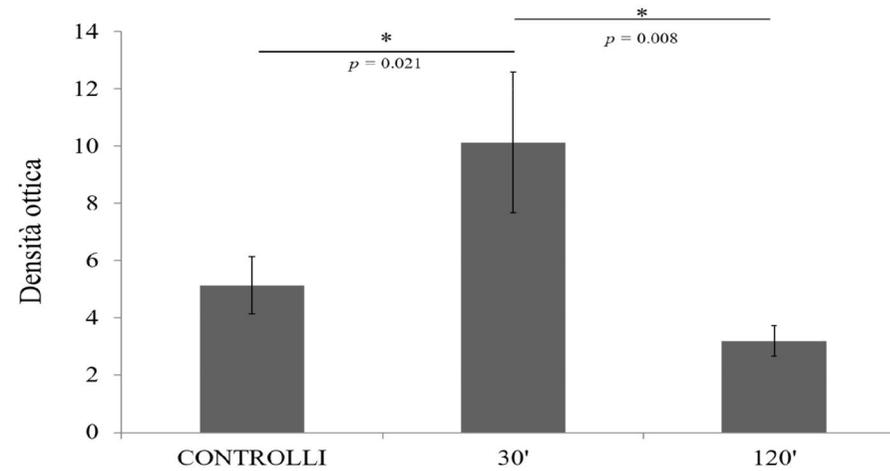
Glucosio e sacrificio
a 30'



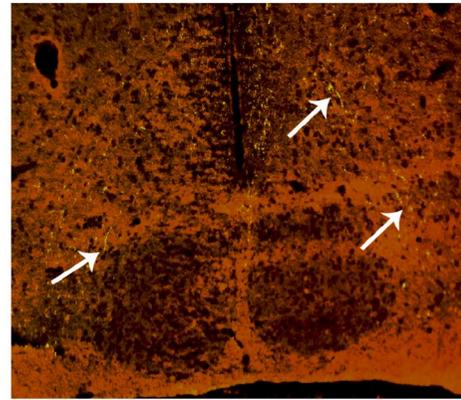
Glucosio e sacrificio
a 120'

Fig. 20: Immunocolorazione per α -MSH (pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

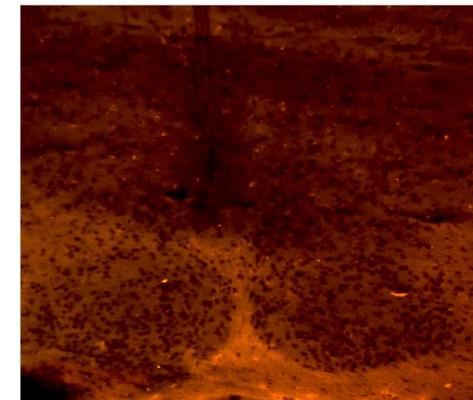
Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura: Cy3; *: differenza significativa.



Controlli



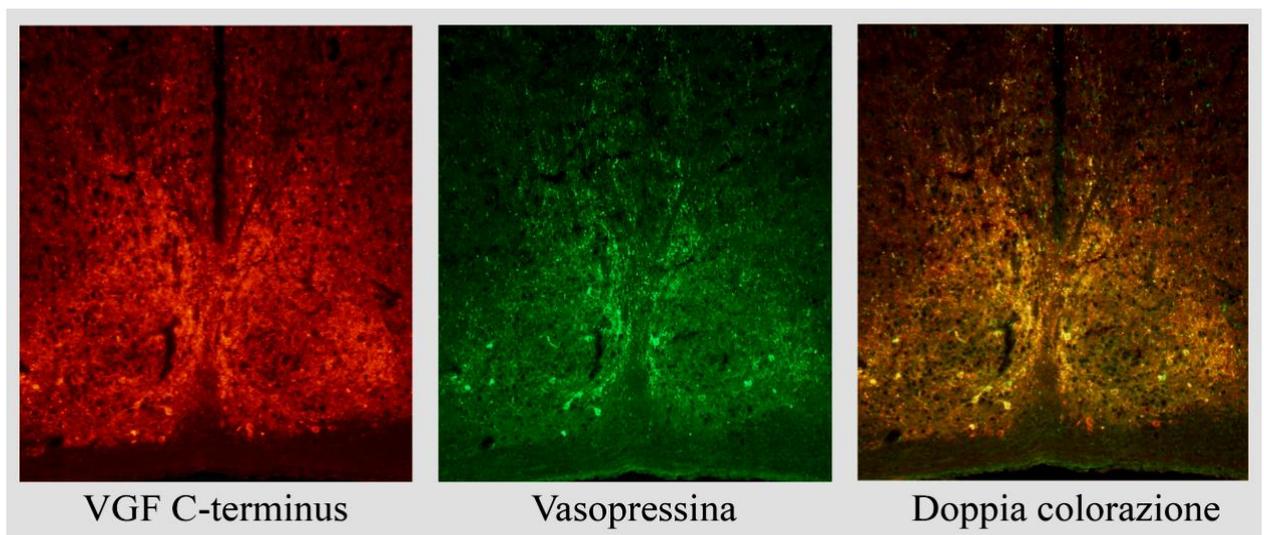
Glucosio e sacrificio
a 30'



Glucosio e sacrificio
a 120'

Tramite doppia colorazione per: (A) arginina vasopressina (AVP), e: (B) uno per volta dei VGF peptidi studiati, si evidenziò un'ampia co-localizzazione, ancorchè di vario grado. Tale colocalizzazione risultava particolarmente ampia per peptidi correlati a VGF C-termino, circa il 70% dei pericari neuronali risultando doppiamente marcati (Fig.21). Peptidi correlati a NAPP-19 e QQET-30 furono riscontrati in popolazioni più circoscritte: circa il 20% ed il 12% dei neuroni, rispettivamente, dei neuroni ad AVP. Le proteine Parvalbumina e Calretinina, notoriamente circoscritte a sottopopolazioni di neuroni del *Core* dell'SCN, non risultarono co-localizzate con alcun VGF-peptide.

Fig. 21: Colocalizzazione VGF C-terminus e anti-AVP



I VGF peptidi in tale nucleo mostrarono differenti risposte. Analizzando la porzione C-terminale di VGF (Fig. 22 pagina 82), risultarono brillantemente immunocolorati moltissimi assoni, fibre nervose ed anche pericari neuronali, senza che si potessero rilevare chiare differenze tra i gruppi studiati.

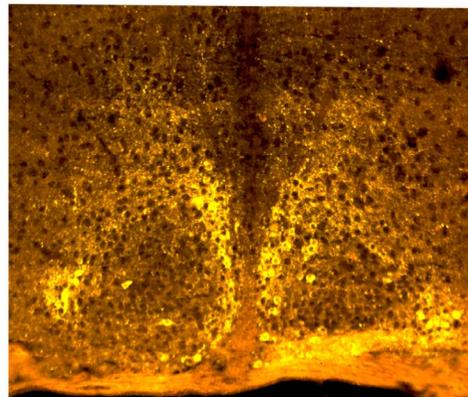
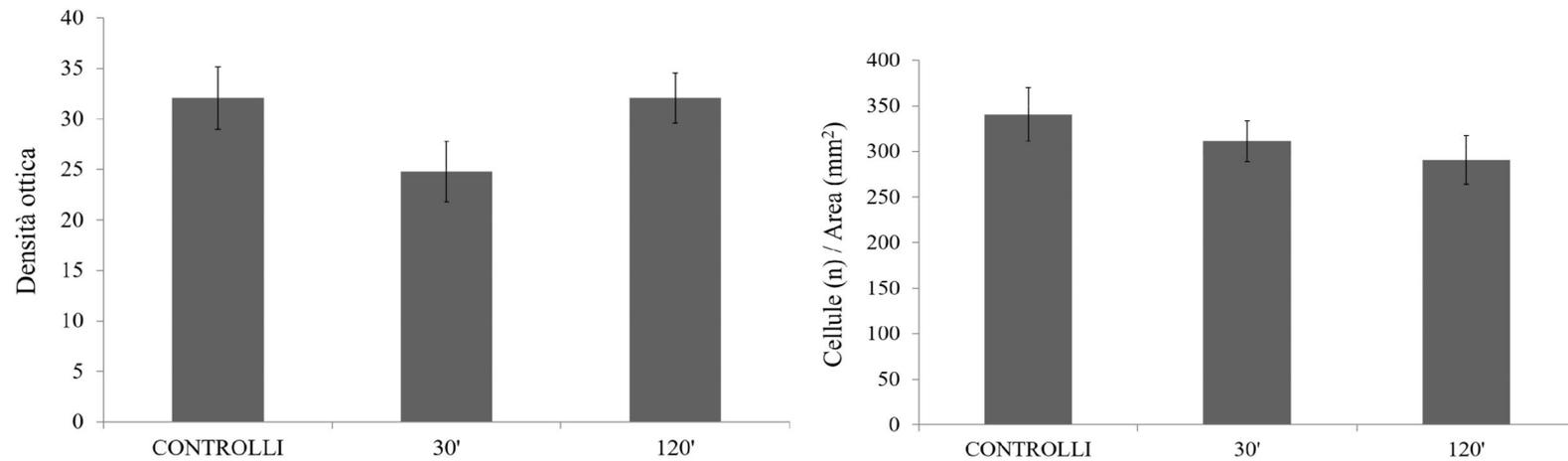
Occorre qui rilevare che non mi sono ad oggi indirizzata a rendicontare possibili shifts tra le popolazioni nervose marcate. Ad esempio, l'osservazione immunomicroscopica ha qui suggerito che la popolazione assonale e/o neuronale fosse più densamente

marcata negli animali del Gruppo 1b (120 minuti dopo carico di glucosio) si trovi nella porzione superiore dello *Shell*, mentre negli altri due gruppi: 1a ed 1c (rispettivamente: senza carico di glucosio, ovvero 30 minuti dopo) i pericari maggiormente immunopositivi si trovino in tutto il perimetro dello *Shell*. Questo tipo di osservazioni richiederà congruo approfondimento, anche in rapporto a studi precedenti che dimostrarono evidenti shifts tra neuroni ad NPY e neuroni a POMC nel Nucleo Arcuato in rapporto a digiuno / alimentazione. Ciò valeva sia per l'espressione di VGF mRNA, sia per la localizzazione di suoi peptidi correlati al C-termino (Hahm et al., 2002; Sadari et al., 2012).

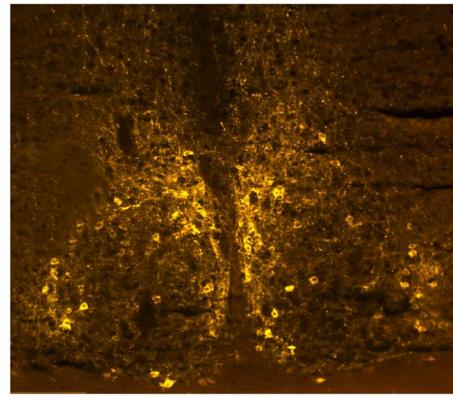
Fig. 22– vedi Pag. 82 (pagina seguente)

Fig. 22: Immunocolorazione per peptide/i correlati all'estremo C-terminale di VGF ((pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

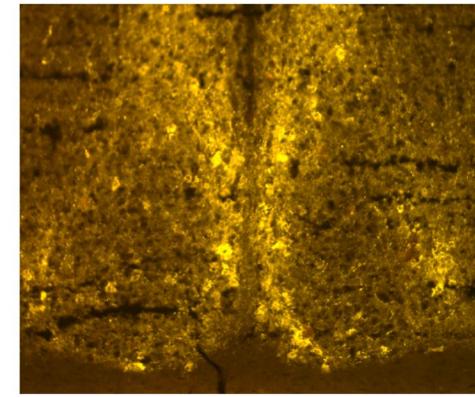
Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura: Cy3.



Controlli



Glucosio e sacrificio
a 30'



Glucosio e sacrificio
a 120'

Tra i VGF peptidi studiati, quelli correlati a NAPP-19, e quelli correlati a QQET-30 (immunoreattività ERVW) mostrarono differenze significative in rapporto al carico di glucosio. L'anticorpo anti-NAPP immunocolorò meno i nuclei SCN appartenenti agli animali che avevano subito l'iniezione del glucosio, tale decremento in densità ottica raggiunse valori significativi dopo 120 minuti dal carico di glucosio (Fig. 23, pagina 82). Questo risultato suggerirebbe che i peptidi relativi a NAPP tenderebbero ad essere in qualche modo rilasciati dopo il carico di glucosio.

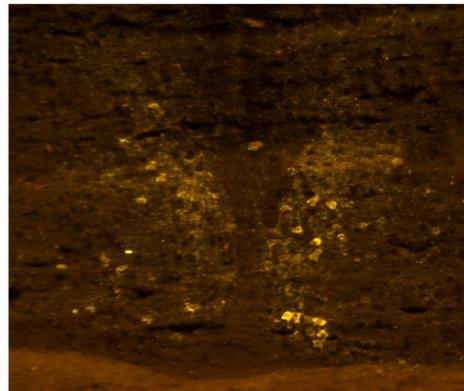
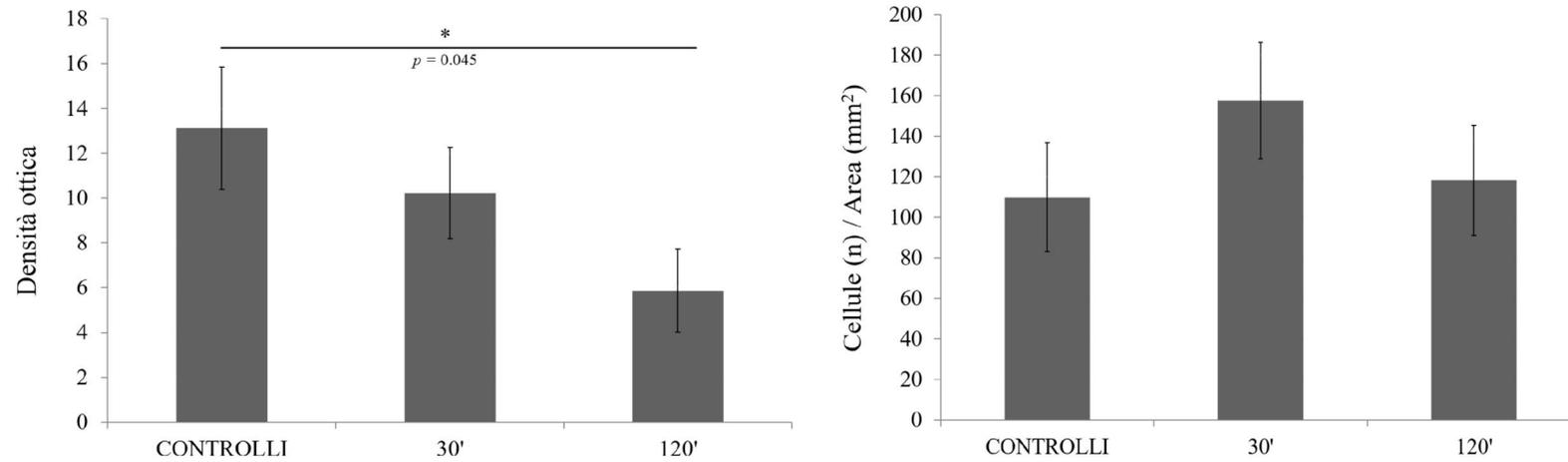
L'immunomarcatura per ERVW (sequenza C-terminale del peptide QQET-30) delineò una ridotta immunocolorazione, con decremento della densità di area immunoreattiva dopo il carico di glucosio, soprattutto dopo 120 minuti (Fig. 24 pagina 83).

In condizioni di controllo, infatti, erano presenti brillanti pericari marcati nella porzione alta ventrale dello *Shell*, mentre a 30 minuti tale popolazione era quasi totalmente scomparsa, per poi ricomparire con marcatura assai lieve a 120 minuti.

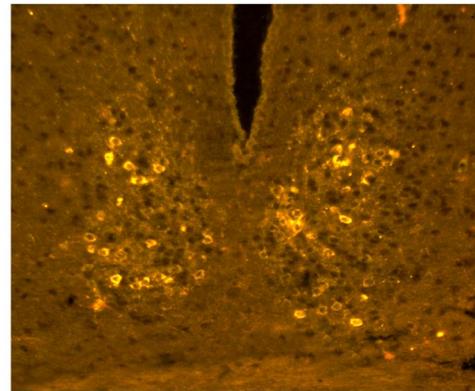
Fig. 23-24 – vedi Pagg. 82 e 83 (due pagine seguenti)

Fig. 23: Immunocolorazione per NAPP peptide/i (pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura: Cy3; *: differenza significativa.



Controlli



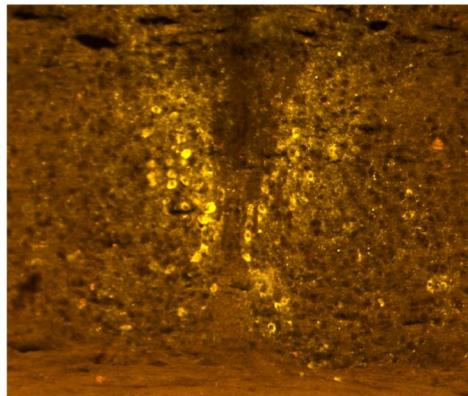
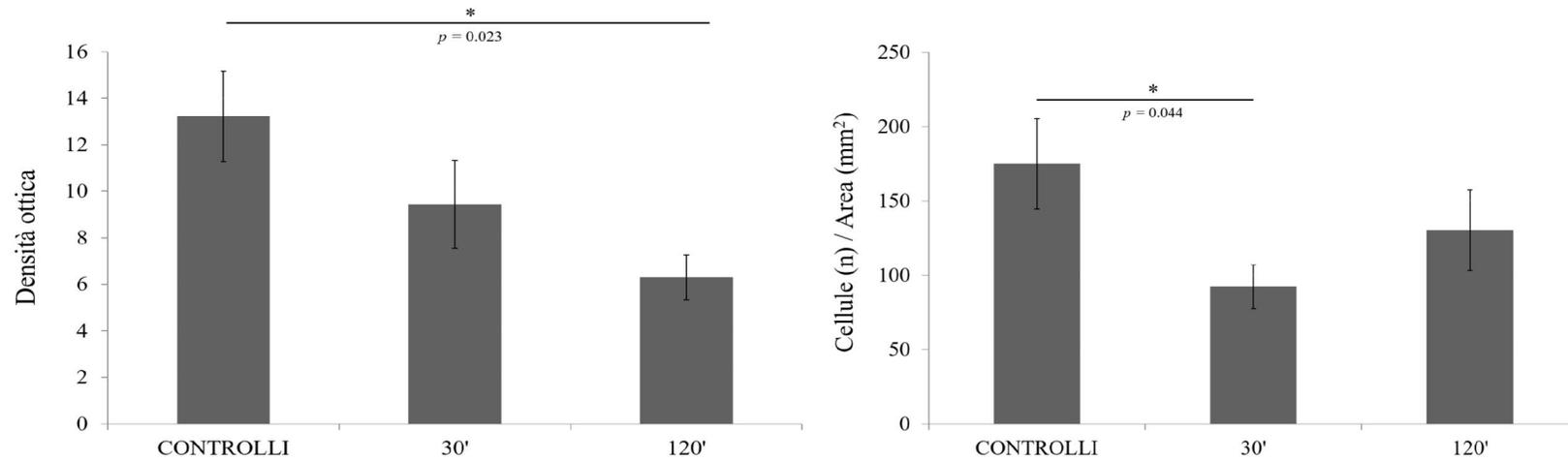
Glucosio e sacrificio
a 30'



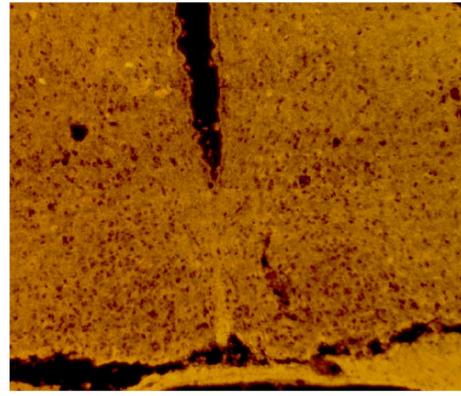
Glucosio e sacrificio
a 120'

Fig. 24: Immunocolorazione per ERVW (pannelli inferiori), e relativa quantificazione.

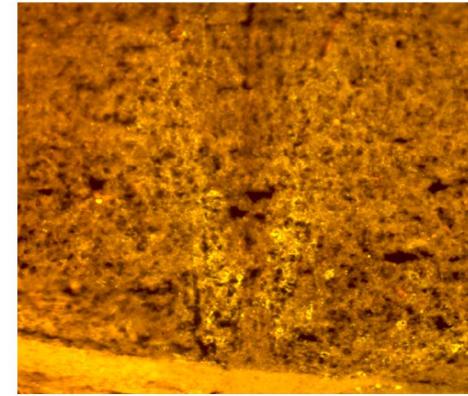
Pannelli superiori - SINISTRO: densità ottica (espressa in scala di valori arbitrari); DESTRO: cellule per area. Controlli: iniezione di salina; immunomarcatura: Cy3; *: differenza significativa.



Controlli



Glucosio e sacrificio
a 30'



Glucosio e sacrificio
a 120'

5. DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI

5.1 Discussione generale

5.1.1 Purificazione per affinità ed immunoistochimica

I risultati ottenuti tramite l'utilizzo della metodica della purificazione per affinità hanno reso possibile un efficace utilizzo di alcuni degli anticorpi scelti per questo studio. In particolare, in precedenza i nostri anticorpi contro NAPP peptidi e contro QQET-30 peptidi (anticorpi prodotti contro la relativa sequenza C-terminale: ERVW) producevano un'immunocolorazione insufficientemente distinta e poco utilizzabile nelle sedi e tessuti di interesse per questo studio. Dopo la congrua purificazione per affinità condotta, è divenuto possibile usarli in modo riproducibile, come i relativi risultati dimostrano.

Per quanto riguarda anticorpi contro peptidi "TLQP", ovvero i peptidi identificati *in vivo* e dotati di rilevante attività biologica e ruoli: TLQP-21 e TLQP-62 (e correlati), la messa a punto di strategie di purificazione per affinità sequenziale e differenziale ha consentito primari avanzamenti nella caratterizzazione su fine base molecolare delle loro immunoreattività. È stato possibile distinguere con valido fondamento alcuni dei nostri anticorpi che riconoscono anche la sequenza "embedded" all'interno del precursore o di sequenze estese: riscontro questo di nullo significato ai sensi delle azioni di TLQP peptidi noti. Di contro, altri nostri anticorpi si confermano invece specifici per TLQP peptidi autentici clivati.

Tale lavoro di messa a punto ha condotto tra l'altro ad una fondata spiegazione circa la mancata colorazione in aree ipotalamiche (SCN) per la sequenza N-terminale di TLQP-21 (TLQPPASSRR; peptide bioattivo). Infatti, in tale sede i peptidi corrispondenti parrebbero non essere tra i prodotti effettivamente clivati, e quindi disponibili per il *release* e lo svolgimento qui di qualcuna delle loro azioni biologiche.

Non sfugge come l'approccio descritto sia ampiamente applicabile a diverse problematiche e contesti, che richiedano un grado elevato di "capacità di risoluzione molecolare" nella determinazione di prodotti peptidici presenti in cellule e tessuti, specie se derivati da complessi e variabili patterns di clivaggio o altra processazione post-traduzionale.

Importante infine sottolineare come l'approccio qui applicato si fondi sulla definizione delle reattività anticorpali in condizioni "non competitive", nelle quali volta a volta un solo antigene / peptide reagisce dinamicamente con gli anticorpi in causa. Infatti, specialmente in immunistochemica si opera in condizioni di questo tipo, tali da esitare in un riscontro positivo (immunocolorazione positiva) anche in presenza di bassa affinità degli anticorpi per l'antigene presente. Negli usuali controlli di specificità (assorbimento su vetrino, usando eccesso di peptide in soluzione), invece, ci si trova in condizioni opposte di natura competitiva. Basterà che gli anticorpi in causa "preferiscano" l'antigene in soluzione, peraltro usualmente presente in eccesso molare rispetto a quello legato nella sezione, perché l'immunocolorazione sia impedita. Ciò che, nel caso descritto, potrà ben condurre ad una fuorviante conclusione a favore della presenza nel tessuto di esattamente l'antigene / il peptide usato per allestire il controllo per assorbimento.

5.1.2 VGF peptidi nel plasma

Nel plasma, alcuni VGF-peptidi hanno mostrato una risposta parallela (es.: TLQP peptidi), o con andamento inverso rispetto alla risposta glicemica (NAPP-ir, ERVW-ir e VGF C-t- ir: vedi Fig.25, pagina 88, per una visione d'insieme). Gli andamenti osservati corrispondono a quelli visti in precedenza (D'Amato et al., 2015), con la sola eccezione dei peptidi correlati al C-termino di VGF. Numerosi VGF peptidi hanno in comune tale

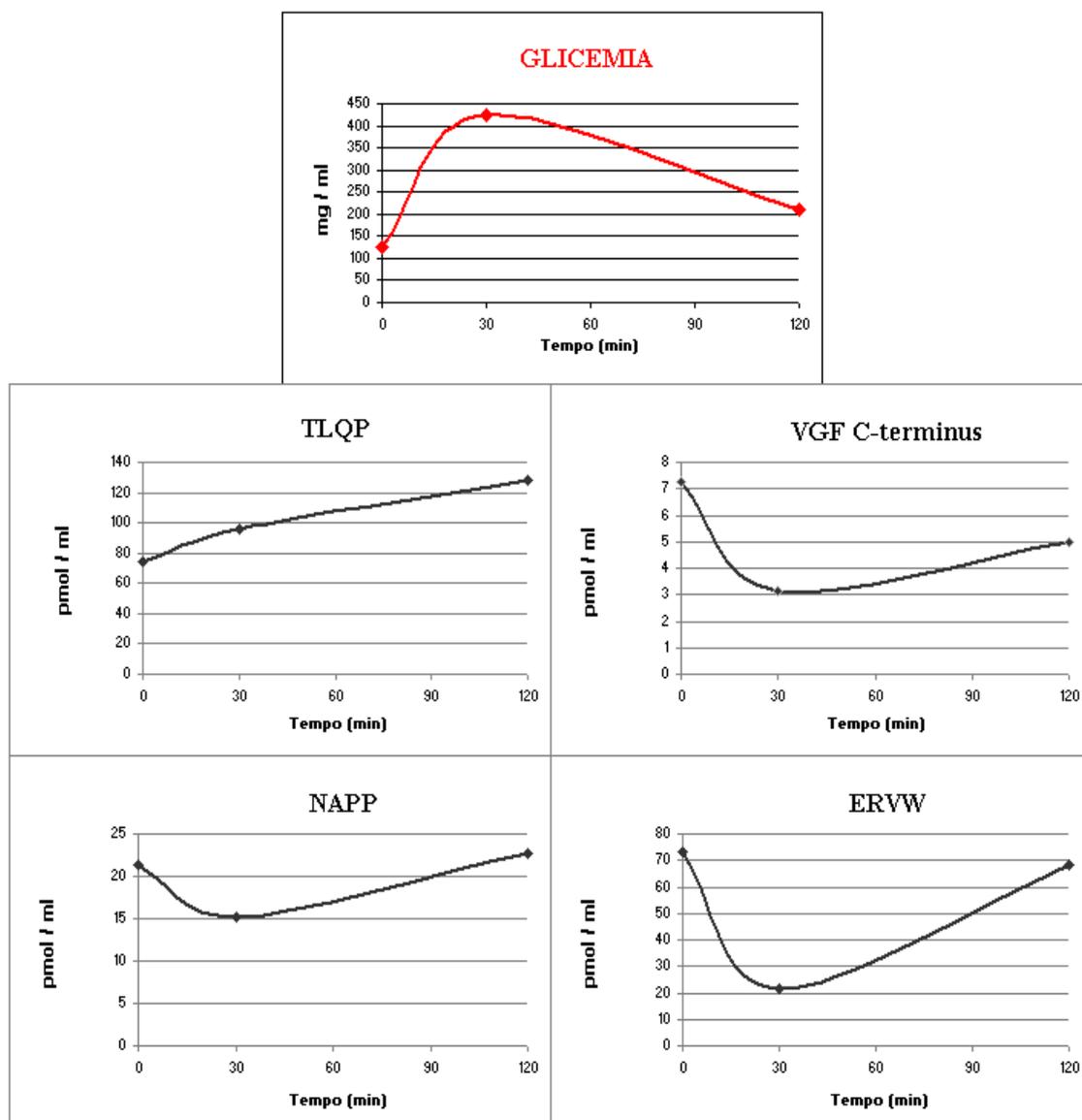
regione C-terminale (Trani et al, 1995, 2002), suggerendo che una complessa modulazione di forme diverse possa essere alla base dei risultati ottenuti.

Poichè alcuni TLQP peptidi sono capaci di incrementare la secrezione di insulina (Stephens et al., 2012; Petrocchi-Passeri et al., 2015), l'andamento suddetto potrebbe suggerire un ruolo di tali peptidi nella risposta integrata al glucosio *in vivo*. Ad oggi, per gli altri peptidi sopra citati non si conoscono ruoli biologici relativi al metabolismo glucidico, nè ad altri specifici nutrienti. Sono ad oggi circoscritti i dati su possibili azioni e ruoli di peptidi correlati a QQET-30, tanto meno quelli focalizzati sulla porzione C-terminale del peptide riconosciuta dagli anticorpi anti-ERVW da noi utilizzati. Il medesimo peptide QQET-30 potrebbe invece essere coinvolto nella regolazione dell'equilibrio idrico, tramite modulazione dei livelli di vasopressina plasmatica: QQET-30 parebbe avere effetto stimolatorio sulla liberazione in circolo di vasopressina (Fujihara et al., 2012), che sarebbe invece inibita da altri VGF peptidi (NERP-1 e NERP-2; Yamaguchi et al., 2007). La vasopressina, peraltro, è stata studiata in rapporto al metabolismo glucidico e potrebbe avere azione modulatoria sui livelli di glucosio nel sangue (Wideman and Murphy 1993; Murphy et al., 1994). Quindi è possibile ipotizzare che le variazioni riscontrate nei livelli plasmatici di peptidi correlati a QQET-30 (immunoreattività ERVW) possano riflettersi su modulazioni della vasopressina in rapporto al metabolismo glucidico.

Per quanto riguarda NAPP peptidi, le informazioni disponibili sono assai scarse. Tra le poche disponibili, una recente pubblicazione del nostro laboratorio (D'Amato et al., 2015) ha messo in evidenza che tale peptide/i si ritrova/no ridotto/i in condizioni di obesità, sia a livello plasmatico che nel tessuto adiposo bianco e bruno.

Vale la pena di notare che analisi proteomiche hanno identificato la presenza di peptidi correlati a NAPP-19 in estratti di corteccia prefrontale di topo, con marcata riduzione in topi obesi Cpe^{fat/fat} (Lim et al., 2006; Zhang et al., 2008).

Fig. 25: Sommario schematico dell'andamento dell'immunoreattività plasmatica per VGF-peptidi rispetto alla glicemia. VGF C-terminus: peptidi correlati al C-termino di VGF precursore; ERVW: immunoreattività C-terminale per il peptide QQET-30.



5.1.3 VGF peptidi nel pancreas

A 30 minuti dopo carico di glucosio, nelle isole pancreatiche risulta manifestarsi una riduzione dell'accumulo / immunocolorabilità di peptidi correlati a TLQP, parallela ad un incremento dei medesimi peptidi nel plasma che si prolunga anche a 120 minuti quindi oltre la fase di ri-accumulo intratessutale correlabile a nuova sintesi di VGF e di TLQP peptidi. Nel pancreas, la risposta di peptidi correlati al C-termino di VGF appare

simile, mentre nel plasma risultò una diminuzione persistente a 30 e 120 minuti. Come accennato in precedenza, si potrebbe speculare ad una forte stimolazione dei meccanismi di processazione, con *release* preferenziale di un subset di prodotti clivati di VGF (es.: TLQP peptidi), e non di altri (ad esempio quelli contenenti VGF C-termino).

Nell'insieme, tra i diversi VGF peptidi studiati si nota come il profilo di quelli correlati a TLQP, e loro verosimile secrezione nel plasma, mostri una risposta comparativamente parallela a quella dell'insulina. Cautelativamente, occorre considerare come anche l'emivita plasmatica di TLQP peptidi sia implicata nel determinismo delle concentrazioni plasmatiche: essa non è ad oggi determinata. Ovviamente, le immunoreattività plasmatiche dei vari VGF peptidi possono riconoscere diverse sedi d'origine. Oltre alle insule pancreatiche, tra i principali organi da cui VGF-peptidi possono essere liberati si trovano in particolare: la midollare surrenale, vari tipi di cellule endocrine dello stomaco, l'ipofisi, e (per quanto in minor misura attesa) l'eminenza mediana (Cocco et al., 2007; D'Amato et al., 2008; Brancia et al., 2010; D'Amato et al., 2012). La massiva degranolazione di TLQP peptidi a 30 minuti dopo glucosio nelle insule pancreatiche argomenta comunque a favore di un ruolo significativo delle insule stesse quale sede d'origine delle variazioni plasmatiche.

Lo studio pilota su campioni di pancreas del Gruppo 2 ha delineato la possibilità che TLQP peptidi siano maggiormente accumulati nelle cellule insulari di topi obesi. Parallelamente, viene a mancare la corrispondente risposta / variazione plasmatica dopo carico di glucosio, sia nei topi obesi suddetti, sia in pazienti diabetici (D'Amato et al., 2015).

Su tali basi, pare logico suggerire che vi sia un'inibizione del *release* di TLQP peptidi nell'obesità e/o nel diabete. A sua volta, tale inibizione potrebbe implicare un ridotto ruolo insulinotropo di tali peptidi nelle malattie descritte (Petrocchi-Passeri et al., 2015)

D'altra parte, studi precedenti (Andrikopoulos et al., 2008) hanno mostrato che in topi obesi (da dieta iper-lipidica) l'insulina plasmatica risulta più alta di base, come in risposta a glucosio intraperitoneale. Questi dati suggeriscono che i topi obesi possano essere caratterizzati da insulino-resistenza, come si riscontra nel Diabete di tipo 2 nell'uomo. Ad oggi, non risultano evidenze di un'implicazione di TLQP o altri VGF peptidi in meccanismi di insulino sensibilità o insulino resistenza. Infine, non si può ad oggi escludere che le variazioni di VGF peptidi e della loro risposta siano almeno in parte secondarie ad alterazione del *release* e/o dell'azione periferica dell'insulina.

5.1.4 VGF peptidi nell'ipotalamo

Il SCN è conosciuto come il principale “*pacemaker* endogeno” dei ritmi circadiani, esso infatti contiene l'orologio biologico centrale, che mantiene la ciclicità di vari processi fisiologici, come i cicli sonno-veglia, le fasi di assunzione alimentare e molti altri.

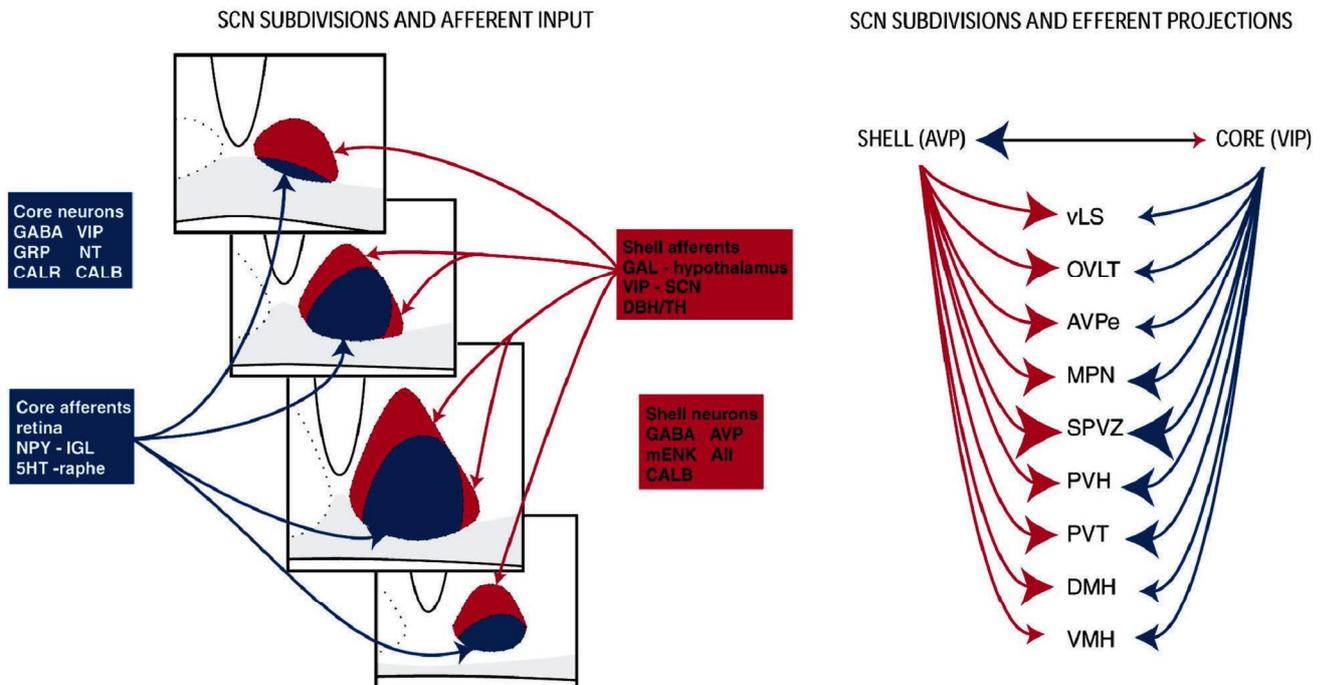
L'SCN è un nucleo bipartito, localizzato nell'ipotalamo anteroventrale, in vicinanza fisica del chiasma ottico. Nel topo, esso contiene un totale di circa 10 000 neuroni per lato, di natura GABAergica (Rietveld, 1992; Moore and Speh, 1993; Strecker et al., 1997; Welsh et al., 2010). La struttura del nucleo è suddivisa in due regioni: la regione centrale detta “*Core*” e la regione perimetrale detta “*Shell*”.

Il *Core* contiene un migliaio di neuroni per lato che esprimono il peptide Vasoactive Intestinal Peptide (VIP: ~10% di tutte i neuroni del SCN), come pure altri neuroni che esprimono Calretinina (~900 per lato), Gastrin Releasing Peptide (GRP, ~500 per lato). È variamente embricata nelle suddette popolazioni l'espressione di calbindina, e/o neurotensina (Abrahamson and Moore, 2001; Welsh et al., 2010).

Nella porzione dello *Shell* sono descritti neuroni contenenti Arginina Vasopressina (AVP, ~2100 per lato, ~20% di tutti i neuroni del SCN), Angiotensina II (~1100 per

lato), e/o met-Enkefalina (~500 per lato, si veda schema in Fig. 26, da: Abrahamson and Moore, 2001; inoltre: Welsh et al., 2010).

Fig. 26: Nucleo Soprachiasmatico: schema di input/output (Abrahamson and Moore, 2001).



Nel nostro studio, il Nucleo Soprachiasmatico mostrò una distinta risposta al carico di glucosio per quanto riguarda i peptidi correlati a NAPP-19 ed a QOET-30 (immunoreattività ERVW), con riduzione della densità di colorazione dopo il carico di glucosio. L'analisi con l'anticorpo contro VGF C-termino non evidenziò differenze significative, nè per densità ottica, nè per i conteggi neuronali. Nell'insieme, si può ipotizzare quindi un aumentato *release* selettivo dei peptidi clivati suddetti dalle sottopopolazioni neuronali in cui vengono specificamente prodotti / sintetizzati, con mantenimento dell'espressione di VGF precursore. Comprensibilmente, non è possibile escludere che intervenga anche una ridotta biosintesi / clivaggio dei peptidi di minore peso molecolare a partire dal precursore stesso.

Un'analisi accessoria è stata compiuta su alcune sottopopolazioni di neuroni / assoni del SCN: (i) neuroni esprimenti AVP (vedi sopra); (ii) assoni esprimenti NPY, in larga parte provenienti dal complesso genicolato laterale del talamo (Intergeniculate Leaflet, vedi: Saderi et al., 2013); e: (iii) assoni esprimenti α -MSH, che paiono controllare il comportamento alimentare e la risposta metabolica giornaliera tramite proiezioni verso il Nucleo Arcuato che controlla il comportamento alimentare (Guzman-Ruiz et al., 2013).

Peraltro, nel Nucleo Soprachiasmatico medesimo anche espressione ed immunocolorabilità di α -MSH ed AVP mostrarono variazioni in rapporto al carico di glucosio. In particolare, assoni ad α -MSH risultarono più evidenti e densamente colorati a 30 minuti, con nuova riduzione a 120 minuti verso i valori basali. Ciò suggerisce che lo *storage* di α -MSH sia relativamente modesto a riposo in detti assoni, con rapida nuova biosintesi in risposta al glucosio (30 min). Parrebbe quindi seguire un aumentato *release* con ritorno a livelli basali in poche ore (120 minuti). Tale risposta dei neuroni ad α -MSH ben si accorda con un ruolo di tale peptide nella regolazione del metabolismo glicidico, evidenziata da vari gruppi (Knudtson, 1984; Brennan et al., 2003; Cline et al., 2008). Di contro, i neuroni ad AVP risultarono mostrarono una rapida e persistente riduzione di immunocolorazione / accumulo di peptide immunoreattivo dopo il carico di glucosio, in rapporto a verosimile *release*. Anche in questo caso, la risposta ben distinta evidenziata ben si accorda con il ruolo suggerito per AVP nella regolazione del metabolismo glicidico (Wideman and Murphy 1993; Murphy et al., 1994).

Come brevemente discusso (vedi sezione: RISULTATI E COMMENTI, pag, 79), resta da verificare la possibilità di shifts dell'espressione / localizzazione di questo o quel peptide tra le diverse popolazioni neuronali del Nucleo tra la condizione di digiuno e quella post carico di glucosio. Come già menzionato, infatti, simili shifts sia di VGF mRNA (Hahm et al., 2002), che di peptidi correlati al C-termino di VGF (Saderi et al.,

2012) sono stati dimostrati nel Nucleo Arcuato, con espressione prevalente di mRNA e peptide in neuroni ad NPY nel digiuno, ed invece in neuroni a POMC in fase post-prandiale.

5.2 Conclusioni

In base alle analisi condotte, VGF e specificamente alcuni VGF peptidi da esso derivati mostrano una risposta / coinvolgimento in meccanismi di risposta fisiologica al glucosio, sia in sede periferica (pancreas e plasma), che nel sistema nervoso centrale (nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo).

La rilevanza di tale coinvolgimento pare ulteriormente sottolineata dal riscontro di alterazioni marcate in presenza di obesità e/o diabete sia nel modello sperimentale, che in pazienti (D'Amato et al., 2015).

Per comprendere i meccanismi che sottointendono queste alterazioni, ed ancor più il loro effettivo rilievo nella fisio-patologia o nell'evoluzione di condizioni di malattia sono necessari ulteriori studi, anche focalizzati in senso clinico.

Sono attualmente in fase di sviluppo, presso il nostro laboratorio ed in cooperazione con altri gruppi, esperimenti indirizzati ad evidenziare possibili variazioni della glicemia dopo somministrazione di VGF-peptidi, qui dimostratisi più distintamente modulati (es.: TLQP-21 e/o TLQP-62).

Per quanto riguarda il descritto approccio avanzato alla purificazione di anticorpi e loro caratterizzazione di reattività su base molecolare, alcuni degli anticorpi così "ottimizzati" sono in fase di testing per allestire saggi ELISA sandwich, volti a misurare specificamente questo o quel peptide TLQP (es.: TLQP-21, separatamente da TLQP-62, ecc.). Un tale sviluppo consentirà di meglio comprenderne specifiche risposte / espressioni / regolazioni differenziali in vari contesti e modelli sperimentali, come pure in varie patologie del metabolismo, o del sistema nervoso centrale anche dell'uomo. Analogamente, esso consentirà di approcciare le problematiche di interazione con i relativi recettori, ad oggi dimostrati per TLQP-21. Trattasi di recettori accoppiati alla proteina G, e denominati: (i) *Complement Component 3a*

Receptor 1 (C3aR1), nonché: (ii) *Globular C1q Receptor (gC1qR)*. Del tutto recentemente, il recettore C3aR1 è stato suggerito quale bersaglio prioritario per lo sviluppo di trattamenti contro l'obesità e/o il diabete mellito (Cero et al., 2016).

6. RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo percorso ci tengo a ringraziare:

Tutti membri del Dip. di scienze Biomediche, in cui ho svolto il mio dottorato di ricerca. In particolare vorrei ringraziare:

Il mio Tutor: Gian-Luca Ferri, per avermi dato la possibilità di compiere questo percorso di dottorato. Perché, nonostante tutti gli alti e bassi riscontrati durante il mio percorso, mi ha saputo aiutare e mi ha fatto crescere rendendomi una persona più forte di quello che ero.

Cristina Cocco: mi è stata molto vicino, mi ha dato preziosissimi consigli e per questo la considero a tutti gli effetti il Co-tutor di questa tesi. Si è dimostrata sempre presente e sempre disponibile. È una persona eccezionale! GRAZIE!!!

Filomena D'Amato: l'assegnista che mi ha incoraggiato ad andare avanti anche quando la via sembrava oscura. Lei con tanta pazienza mi ha insegnato la metodica dell'ELISA. GRAZIE!!!

Carla Brancia: Assegnista che mi ha sempre aiutato dandomi preziosi consigli durante tutto lo svolgimento del dottorato. Soprattutto per la parte relativa all'analisi fotografica. La vorrei ringraziare perché mi è sempre stata vicina. Non lo dimenticherò GRAZIE!!!

Barbara Noli: Assegnista che ha sempre saputo mettermi di buon umore. Nonostante abbia lavorato poco assieme a lei il suo buon umore mi ha sempre contagiato positivamente. GRAZIE!!!

Laura Angioni, Roberta Pilleri e Paola Coni: le dottorande del XXVIII ciclo che per due anni hanno accompagnato i miei giorni in Lab. Preziose, Simpatiche, sempre presenti, vere amiche! GRAZIE!!!

Laura Muredda: La dottoranda con cui, anche se in sedi diverse, ho compiuto questo percorso.

Vari membri del Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico Legali dell'Apparato Locomotore dell'Università la Sapienza a Roma, ed in particolare:

Professor Fabio Naro: per la sua disponibilità e per il prezioso contributo in questa tesi, senza di lui non ci sarebbero stati gli animali che sono stati necessari per questo studio.

Ringrazio lui e tutto il suo gruppo in quanto, anche se non ero nella mia università, i suoi collaboratori hanno saputo farmi sentire a “casa”.

Manuela Pellegrini: la collaboratrice più presente nelle mie “spedizioni” romane per prendere i campioni. Mi sono trovata davvero bene con lei, che è solare e sempre amichevole. È stato meraviglioso lavorare al suo fianco per qualche giorno.
GRAZIE!!!

7. BIBLIOGRAFIA

Abrahamson E.E., Moore R.Y. 2001 Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain research* 916: 172-191.

Alder J., Thakker-Varia S., Bangasser D.A., Kuroiwa M., Plummer M.R., Shors T.J., Black I.B. 2003 Brain-derived Neurotrophic Factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in Hippocampal Synaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience* 23(34): 10800-10808.

Andrikopoulos S., Blair A.R., Deluca N., Fam B.C., Proietto J. 2008 Evaluating the glucose tolerance test in mice. *J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295: E1323-E1332.

Baybis M., Salton S.R. 1992 Nerve Growth Factor rapidly regulates VGF gene transcription through cycloheximide sensitive and insensitive pathways. *FEBS lett.* 308(2): 202-206.

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., Severini C., Mignogna G., Giorgi A., Schininà M.E., Elia G., Brancia C., Ferri G.L., Conti R., Ciani B., Pascucci T., Dell'Olmo G., Muller E.E., Levi A., Moles A., 2006 TLQP-21, a VGF-driver peptide, increases energy expenditure and prevents the early phase of diet-induced obesity. *PNAS* Vol. 103 N° 39: 14584-14589.

Bartolomucci A., Bresciani E., Bulgarelli I., Rigamonti A.E., Pascucci T., Levi A., Possenti R., Torsello A., Locatelli V., Muller E.E., Moles A. 2009 Chronic

intracerebroventricular injection of TLQP-21 prevents high fat diet induced weight gain in fast weight-gaining mice. *Genes.Nutr.* 4:49-57.

Bonni A., Ginty D.D., Dudek H., Greenberg M.E., 1995 Serine133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signal. *Mol. Cell. Neurosci.* 6: 168-183.

Bozdagi O., Rich E., Tronel S., Sadahiro M., Patterson K., Shapiro M.L., Alberini C.M., Huntley G.W., Salton S.R.J. 2008 The neurotrophin-inducible gene Vgf regulates hippocampal function and behavior through a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *J Neurosci.* 2008 Sep 24;28(39):9857-69.

Brancia C., Cocco C., D'Amato F., Noli B., Sanna F., Possenti R., Argiolas A., Ferri G.L. 2010 Selective expression of TLQP-21 and other VGF peptides in gastric neuroendocrine cells and modulation by feeding. *Journal of Endocrinology* 207: 329-341.

Brennan M.B., Costa J.L., Forbes S., Reed P., Bui S., Hochgeschwender U. 2003 Alpha-melanocyte stimulating hormone is a peripheral, integrative regulator of glucose and fat metabolism. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 994: 282-287.

Cero C. Razzoli M., Han R., Sahu B. S., Patricelli J., Guo Z., Zaidman N. A., Miles J. M., O'Grady S.M., Bartolomucci A. 2016 The neuropeptide TLQP-21 opposes obesity via C3aR1-mediated enhancement of adrenergic-induced lipolysis. *Molecular metabolism* 399: 1-11.

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.

Carrette O., Demalte I., Scherl A., Yalkinoglu O., Corthals G., Burkhard P., Hochstrasser D.F., Sanchez J.C. 2003 A panel proteomics of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics* 3: 1486-1494.

Cline M.A., Nandar W., Bowden C., Hein P.P., Denbow D.M., Siegel P.B., 2008 Differential feeding response to central alpha-melanocyte stimulating hormone in genetically low and high body weight selected lines of chickens. *Life Sci* 83: 208-213.

Cocco C., Melis G.V., Ferri G.L., 2003 Embedding media for cryomicrotomy: an applicative reappraisal. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 11: 274-280.

Cocco C., Brancia C., Pirisi I., D'Amato F., Noli B., Possenti R., Ferri G.L. 2007 VGF-metabolic related gene: distribution of its derived peptides in mammalian pancreatic islets. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 55(6): 619-628.

D'Amato F., Noli B., Brancia C., Cocco C., Flore G., Collu M., Nicolussi P., Ferri G.L. 2008 Differential distribution of VGF-derived peptides in the adrenal medulla and evidence for their selective modulation. *Journal of Endocrinology* 197: 359-369.

D'Amato F., Cocco C., Noli B., Cabras T., Messina I., Ferri G.L. 2012 VGF peptides upon osmotic stimuli: changes in neuroendocrine regulatory peptides 1 and 2 in the hypothalamic-pituitary-axis and plasma. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 44: 57-65.

D'Amato F., Noli B., Angioni L., Cossu E., Incani M., Messina I., Manconi B., Solinas P., Isola R., Mariotti S., Ferri G.L., Cocco C. 2015 VGF peptide profiles in type 2 Diabetic patients' plasma and in obese mice. *PLoS ONE* 10(11).

Dmitrieff E.F., Wilson J.T., Dunmire K.B., Bavis R.W. 2011 Chronic hyperoxia alters the expression of neurotrophic factors in the carotid body of neonatal rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 175: 220- 227.

Ebling F.J.P., Barrett P. 2008 The regulation of seasonal changes in food intake and body weight. *Journal of Neuroendocrinology* 20:827-833.

Ferri G.L., Papadia C., Cocchia D., Polak J.M., 1987 Aluminium foil moulds for cryostat blocks. *Stain Technol.* 62: 59-60.

Ferri G.L., Levi A., Possenti R. 1992 A novel neuroendocrine gene product: selective *vgf8a* gene expression and immuno-localization of the VGF protein in endocrine and neuronal populations. *Molecular Brain Research* 13: 139-143.

Ferri G.L., Gaudio R.M., Cossu M., Rinaldi A.M., Polak J.M., Berger P., Possenti R. 1995 The "VGF" protein in rat Adenohypophysis: sex differences and changes during the estrous cycle and after Gonadectomy. *Endocrinology* vol.136 N°5.

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, Noli B., Brancia C., D'Amato F., Cocco C. 2011 VGF: An inducible gene product, precursor of a diverse array of neuroe-endocrine peptides and tissue-specific disease biomarkers. *J.of Chem. Neuroanatomy* 42: 249-261.

Fujihara H., Sasaki K., Mishiro-Sato E., Ohbuchi T., Dayanithi G., Yamasaki M., Minamino N. 2012 Molecular characterization and biological function of neuroendocrine regulatory peptide-3 in the rat. *Endocrinology* 153 (3): 1377-1386.

Girgenti M.J., Hunsberger J., Duman C.H., Sathyanesan M., Terwilliger R., Newton S.S. 2009 Erythropoietin induction by electroconvulsive seizure, gene regulation and antidepressant-like behavioral effects. *Biol. Psychiatry* 66(3): 267-274.

Guzman-Ruiz M., Saderi N., Cazarez-Marquz F., Guerrero-Vargas N.N., Basualdo M.C., Acosta-Galvan G., Buijs R.M. 2013 the suprachiasmatic nucleus changes the daily activity of the arcuate nucleus α -MSH neurons in male rats. *Biol. Psychiatry* 66(3): 267-274.

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., 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. *Endocrinology*.

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., 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.

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.

Herrera-Moro Chao D., Leon-Mercado L., Foppen E., Guzman-Ruiz M., Basualdo M.C., Escobar C., Bujis R.M. 2007 the suprachiasmatic nucleus modulates the sensitivity of arcuate nucleus to hypoglycemia in the male rat. *Endocrinology*.

Hernandez-Vargas H., Rodriguez-Pinilla S.M., Julian-Tendero M., Sanchez-Rovira P., Cuevas C., Anton A., Rios M.J., Palacios J., Moreno-Bueno G. 2007 Gene expression profiling of breast cancer cells in response to gemcitabine: NF-kB pathway activation as a potential mechanism of resistance. *Breast Cancer Res. Treat.* 102(2): 157-172.

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 J.T., Leweke F.M., Oxley D., Wang L., Harris N., Koethe D., Gerth C.W., Nolden B.M., Gross S., Schreiber D., Reed B., Bahn S. 2006 Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset of psychosis. *PLoS Med.* 3 e428.

Huang J.T., Leweke F.M., Tsang T.M., Koethe D., Kranaster L., Gerth C.W., Gross S., Schreiber D., Ruhrmann S., Schultze-Lutter L., Klosterkötter J., Holmes E., Bahn S. 2007 CSF metabolite and proteomic profiles in patients prodromal for psychosis. *PLoS One* 2 e756.

Hunsberger J.G., Newton S.S., Bennett A.H., Duman C.H., Russell D.S. Salton S.R., Duman R.S. 2007 Antidepressant action of the exercise-regulated gene VGF. *Nature Medicine* Vol.13 N°12 1476-1482.

Jethwa P.H., Warner A., Nilaweera K.N., Bramenld J.M., Keyte J.W., Carter W.G., Bolton N., Bruggraber M., Morgan P.J., Barrett P., Ebling F.J.P. 2007 VGF-derived peptide, TLQP-21, regulates food intake and body weight in Siberian Hamsters. *Endocrinology* 148(8): 4044-4055.

Jethwa P.H., Ebling F.J.P. 2008 Role of VGF-derived peptides in the control of food intake, body weight and reproduction. *Neuroendocrinology.* 88(2):80-87.

Kalsbeek A., La Fleur S., Fliers E. 2014 Circadian control of glucose metabolism. *Mol. Metab.* 3(4): 372-383.

Kanemasa, K, Okamura H, Kodama T, Iбата 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.

Knudtson J. 1984 Alpha melanocyte stimulating hormone increases plasma levels of glucagon and insulin in rabbits. *Life Sci.* 34: 547-554.

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 Angeletti, P.U. 1968 The nerve growth factor. *Physiol. Rev.*48:534-569.

Lim J., Berezniuk I., Che F-Y., Parikh R., Biswas R., Pan H., Fricker L.D. 2006 Altered neuropeptide processing in prefrontal cortex of $Cpe^{fat/fat}$ mice: implications for neuropeptide discovery. *Journal of Neurochemistry* 96: 1169-1181.

Lombardo A., Rabacchi S.A., Cremisi F., Pizzorusso T., Cenni M.C., Possenti R., Barsacchi G., Maffei L. 1995 A developmentally Nerve Growth Factor-induced gene, *vgf*, is expressed in geniculocortical afferents during synaptogenesis. *Neuroscience* Vol. 65: 997-1008.

Liu J. W., Andrews P.C., Mershon J.L., Yan C., Allen D.L., Ben-Jonatan N. 1994 Peptide V: a VGF-derived neuropeptide purified from bovine posterior pituitary. *Endocrinology* 135: 2742-2748.

Liu Z.F., Chen C.Y., Tang W., Zhang J.Y., Gong Y.Q., Jia J.H. 2006 Gene expression profiles in gastric epithelial cells stimulated with spiral and coccoid *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology* 55: 1009-1015.

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.

Mahata M., Hortnagl H., Mahata S.K., Fisher-Colbrie R, 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.

Mitra A., Fillmore R.A., Metge B.J., Rajesh M., Xi Y., King J., Ju J., Pannell L., Shevde L.A., Samant R.S. 2008 Large isoform of MRJ (DNAJB6) reduces malignant activity of breast cancer. *Breast Cancer research* Vol.10 N°2.

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.

Moin A.S., Yamaguchi H., Rhee M., Kim J-W., Toshinai K., Waise T.M.Z., Naznin F., Matsuo T., Sasaki K., Minamino N., Yoon K-H., Nakazato M. 2012

Neuroendocrine regulatory peptide-2 stimulates glucose-induced insulin secretion *in vivo* and *in vitro*.

Moore R.Y., Speh J.C. 1993 GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* 150:112-116.

Moran-Ramos S., Baez-Ruiz A., Bujis R.M., Escobar C. 2016 When to eat? The influence of circadian rhythms on metabolic health: are animal studies providing the evidence? *Nutrition research Reviews* 1-14.

Muoio D.M., Newgard C.B. 2008 Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3:193-205.

Murphy H.M., Babey E.M., Wideman C.H. 2008 Vasopressin deficiency and blood glucose interactions on passive avoidance behavior. *Peptides* vol15 N°8 1335-1341.

Noli B., Brancia C., D'Amato F., Ferri G.L., Cocco C. 2014 VGF Changes during the Estrous Cycle: A Novel Endocrine Role for TLQP Peptides? *PLoS ONE*. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108456>

Okamura H., Abitbol M., Julien J.F., Dumas S., Berod A., Geffard M., Kitahama K., Bobillier P., Mallet J., Wiklund L. 1990 Neuron containing messenger RNA encoding glutamate decarboxylase emphasis on cell groups in medial preoptic area, anterior hypothalamic area and dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 39: 675-699.

Petrocchi-passeri P., Cero C., Cutarelli A., Frank C., Severini C., Bartolomucci A., Possenti R. 2015 The VGF-derived peptide TLQP-62 modulates insulin secretion and glucose homeostasis. *Journal of Molecular Endocrinology* 54: 227-239.

Pinilla L., Pineda R., Gaytan F., Romero M., Garcia-Galiano D., Sanchez-Garrido M.A., Ruiz-Pino F., Tene-Sempere T., Aguilar E. 2011 Characterization of the reproductive effects of the anorexigenic VGF-derived peptide TLQP-21: *in vivo* and *in vitro* studies in male rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 300: 837-847.

Possenti R., Eldridge J.D., Paterson B.M., Grasso A., Levi A. 1989 A protein induced by NG in PC12 cell is stored in secretory vesicles and *release* through the regulated pathway. *EMBO J.* 8: 2217-2223.

Possenti R., Di Rocco G., Nasi S., Levi A. 1992 Regulatory elements in the promoter region of *vgf*, a nerve growth factor-inducible gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 3815-3819.

Possenti R., Rinaldi A.M., Ferri G-L., Borboni P., Trani E., Levi A. 1999 Expression, processing and secretion of the neuroendocrine VGF Peptides by INS-1 Cells. *Endocrinology* Vol 140 n. 8 3727-3735.

Rietveld W.J. 1992 Neurotransmitters and the Pharmacology of the Suprachiasmatic Nuclei. *Pharmac. Ther.* Vol 56 119-130.

Rizzi R., Bartolomucci A., Moles A., D'Amato F., Sacerdote P., Levi A., La Corte G., Ciotti M.T., Possenti R., Pavone F. 2008 The VGF-derived peptide TLQP-21: a new modulatory peptide for inflammatory pain. *Neuroscience Letters* 441: 129-133.

Sadahiro M., Erickson C., Lin W-J., Shin A.C., Razzoli C.J., Fargali S., Gurney A., Kelley K.A., Buettner C., Bartolomucci A., Salton S.R. 2015 Role of VGF-derived Carboxy-terminal peptides in energy balance and reproduction: analysis of “humanized” Knockin Mice Expressing full-length or truncated VGF. *Endocrinology* 5: 1724-1738.

Saderi N., Salgado-Delgado R., Avedano-Pradel R., Basualdo M., Ferri G.L., Chavez-Macias L., Olvera Roblera J.E., Escobar C., Bujis R.M. 2012 NPY and VGF Immunoreactivity Increased in the arcuate nucleus of the tractus solitarius, of type-II diabetic patients. *PLoS ONE* Vol 7 Issue 7.

Saderi N., Cazarez-Marquez F., Bujis F.N., Salgado-Delgado R. C., Guzman-Ruiz M., Basualdo M.C., Escobar C., Bujis R.M. 2013 The NPY intergeniculate leaflet projections to the suprachiasmatic nucleus transmit metabolic conditions. *Neuroscience* 246: 291-300.

Saderi N., Cazarez-Marquez F., Bujis F.N., Salgado-Delgado R. C., Guzman-Ruiz M., Basualdo M.C., Escobar C., Bujis R.M. 2014 A role for VGF in the hypothalamic Arcuate and Paraventricular nuclei in the control of energy homeostasis. *Neuroscience* 265: 184-195.

Salton S.R.J., Fischberg D.J. 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 S.R.J., Ferri G.L., Hahm S., Snyder S.E., Wilson A.J., Possenti R., Levi A. 2000 VGF: A novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance. *Front. Neuroendocrinol.* 21:199-219.

Schisler J.C., Jensen P.B., Taylor D.G., Becker T.C., Knop F.K., Takekawa S., German M., Weir G.C., Lu D., Mirmira R.G., Newgard C.B. 2005 The Nkx6.1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet β -cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:7297-7302.

Schisler J.C., Fueger P.T., Babu D.A., Hohmeier H.E., Tessem J.S., Lu D., Becker T.C., Naziruddin B., Levy M., Mirmira R.G., Newgard C.B. 2008 Stimulation of human and rat islet β -cell proliferation with retention of function by the homeodomain transcription factor Nkx6.1. *Mol. Cell. Biol.* 28:3465-3476.

Severini C., La Corte G., Improta G., Broccardo M., Agostini S., Petrella C., Sibilio V., Pagani F., Guidobono F., Bulgarelli I.; Ferri G.L., Brancia C., Rinaldi A.M., Levi A., Possenti R. 2009 *In vitro* and *in vivo* pharmacological role of TLQP-21, a VGF-derived peptide, in the regulation of rat gastric motor functions. *British Journal of pharmacology* 157(6): 984-993.

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., Peng B., Pintar J.E., Salton S.R.J. 2003 Expression of VGF mRNA in developing neuroendocrine and endocrine tissues. *Journal of Endocrinology* 179: 227-235.

Stark M., Danielsson O., Griffiths W. J., Jornvall H. and Johansson J. (2001) Peptide repertoire of human cerebrospinal fluid: novel proteolytic fragments of neuroendocrine proteins. *J. Of Chromatog.* 754: 357–367.

Stephens S.B., Schisler J.C., Hohmeier H.E., An J., Sun A.Y., Pitt G.S., Newgard C.B. 2012 A VGF-Derived peptide attenuates development of type 2 diabetes via Enhancement of Islets β -cell survival and function. *Cell Metabolism* 16: 33-43.

Strecker G.J., Warin J.P., Dudek F.E. 1997 GABA(A) mediated local synaptic pathways connect neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neurophysiol.* 78: 2217-2220.

Succu S., Cocco C., Mascia M.S., Melis T., Melis M.R., Possenti R., Levi A., Ferri G-L., Argiolas A., 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.

Succu S., Mascia M.S., Melis T., Sanna F., Melis M.R., Possenti R., Argiolas A. 2005 Pro-VGF-derived peptides induce penile erection in male rats: Involvement of paraventricular nitric oxide. *Neuropharmacology* 49: 1017-1025.

Thakker-Varia S., Jernstedt Krol J., Nettleton J., Bilimoria P.M., Bangasser D.A., Shors T.J., Black I.B., Alder J. 2007 The neuropeptide VGF produces antidepressant-Like behavioral effect and enhances proliferation in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 30(28): 9368-9380.

Toshinai K., Yamaguchi H., Kageyama H., Matsuo T., Koshinaka K., Sasaki K., Shioda S., Minamino N., Nakazato M. 2010 Neuroendocrine regulatory peptide-2 regulates feeding behavior via the orexin system in the hypothalamus. *American Journal of Physiology Endocrinology and metabolism* 299: 394-401.

Trani E., Ciotti T., Rinaldi A.M., Canu N., Ferri G.L., Levi A., Possenti R. 1995 Tissue-specific processing of the neuroendocrine protein VGF. *Journal of Neurochemistry* 65: 2441-2449.

Trani E., Giorgi A., Canu N., Amadoro G., Rinaldi A.M., Halban P.A., Ferri G.L., Possenti R., Schininà M.E., Levi A. 2002 Isolation and characterization of VGF peptides in rat brain. Role of PC1/3 and PC2 in the maturation of VGF precursor. *Journal of Neurochemistry* 81: 565-574.

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.

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

Watson E., Seung H., Mizuno T.M., Windsor J., Montgomery C., Scherer P.E., Mobbs C.V., Salton S.R.J. 2005 Vgf ablation block the development of hyperinsulinemie and hyperglycemia in several mouse models of obesity. *Endocrinology* 146(12): 5151-5163.

Welsh D.K., Takahashi J.S., Kay S.A. 2010 Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual Rev. Physiol.* 72: 551-577.

Wideman C.H., Murphy H.M. 1993 Modulatory effects of Vasopressin on Glucose and protein Metabolism During Food-restriction Stress. *Peptides* Vol.14 259-261.

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.

Yamaguchi H., Sasaki K., Satomi Y., Shimbara T., Kageyama H., Mondal M.S., Toshinai K., Date Y., Gonzales L.J., Shioda S., Takao T., Nakazato M., Minamino N. 2007 Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 282 N°36: 26354-26360.

Xia W., Mruk D.D., Lee W.M., Cheng C.Y. 2007 Unraveling the molecular targets pertinent to junction restructuring events during spermatogenesis using the Adjuvin-induced germ cell depletion model. *Journal of Endocrinology* 192: 563-583.

Zhang X., Che F-Y., Berezniuk I., Sonmez K., Toll L., Fricker L.D. 2008 Peptidomics of Cpe^{fat / fat} mouse brain region: implication for neuropeptide processing. *Journal of Neurochemistry* 107: 1596-1613.