



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Morfologiche e Funzionali

Ciclo XXVIII

VGF e stress ossidativo: alterazioni cellulari e modulazione nella Sclerosi Laterale Amiotrofica

Settore scientifico disciplinare di afferenza BIO/16

Presentata da: Dott.ssa Roberta Pilleri

Coordinatore Dottorato: Prof.ssa Valeria Sogos

Tutor: Prof. Gian Luca Ferri, Dott.ssa Brancia Carla

Esame finale anno accademico 2014 – 2015



La presente Tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di Dottorato in Scienze Morfologiche e Funzionali dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a 2013/2015- XXVIII Ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. Sardegna F.S.E. 2007-2013 – Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 “Finanziamento corsi di Dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

“Roberta Pilleri gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 – Axis IV Human Resources, Objective I.3, Line of Activity I.3.1.)”

INDICE

Abstract

1.INTRODUZIONE	1
1.1. VGF	1
1.2. Stress ossidativo	11
1.3. Stress ossidativo e funzionalità mitocondriale	13
1.4. Sclerosi laterale amiotrofica (SLA)	14
1.5. Linea cellulare motoneuronale di topo NSC-34	16
1.6. Colture primarie di Fibroblasti umani	16
2. MATERIALI E METODI	18
2.1. Linea cellulare moto neuronale di topo NSC-34	18
2.2. Stress ossidativo	18
2.3. Immunocitochimica	19
2.3.1. Anticorpi anti-VGF peptidi, anti-HUR I e anti- recettore del TLQP-21	19
2.4. Microscopia ed acquisizione di immagini	21
2.5. Estrazione campioni per ELISA e cromatografia	21
2.6. ELISA	22
2.7. Cromatografia	23
2.8. Estrazione campioni per Western Blot	24
2.9. Western blot	24
2.10. Test di vitalità cellulare (MTT)	25
2.11. FLUO-4	25
2.12. EnVision	27
2.13. Coltura primaria di fibroblasti umani	27
3. SCOPO DEL LAVORO	29
4. RISULTATI	31
5. DISCUSSIONI	49
Bibliografia	53

VGF and oxidative stress: cellular alterations and modulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis.

The VGF gene encodes a protein precursor (617/615 AA rat/man, respectively), which is processed *in vivo* to various low MW peptides with different biologic activities. These include attenuation of excitotoxic injury on spinal motor neurons from G93A-SOD-1 mice, upon overexpression of the VGF precursor, or an anti-apoptotic action of the VGF peptide TLQP-21 on cerebellar granules. Recently, the C3a and gC1q have been identified as TLQP-21 receptors. Using the mouse motoneuronal cell line NSC-34 and the primary human fibroblast cell culture, we studied the expression and modulation of certain VGF peptides (VGFp) in ALS and oxidative stress and their possible neuroprotective effect. Oxidative stress was induced with Na Arsenite (SA: 0.5mM, 30/60 min) while the MTT test was used to assess cell viability. Antibodies used (for either ICC or ELISA) were specific for: the N/C-terminus of the VGF precursor, NERP-1, rat PGH, NAPPE-19 and TLQP-21, and for the C3a/gC1q TLQP receptors. Both antibody receptors were also used for ICC and western blot analysis.

In NSC-34, almost all VGFp were selectively localized in the growth cones, perinuclear region, and/or in a specific paranuclear region. Upon oxidative stress, most cells showed a rounded morphology, with loss of growth cones, while almost all VGFp were found mainly in a paranuclear region compatible with the Golgi apparatus.

In ELISA, untreated cellular extracts showed the presence of the majority VGFp with a significant reduction in TLQP and NERP-1 levels *versus* untreated cells (58% and 65% of reduction, respectively) after SA treatment, while the culture medium showed a marginal increase of the same peptides. Cell viability studies showed a significant protective action of TLQP-21 on stressed neurons (SA alone: 74.7% \pm 0.08, SA and TLQP-21 together: 82.1% \pm 0.08 of untreated controls, $p \leq 0.018$), with no detectable effect for NERP-1.

Results from immunocytochemistry showed the presence in NSC-34 of gC1q receptor only, confirmed also by western blot analysis.

In human fibroblasts, VGFp were selectively localized in cytoplasmic and paranuclear region morphologically related to the membranous cellular system, without obvious differences between healthy and ALS subjects (with TARDBP^{A382T} and without known mutation). In ELISA, N-terminus and NERP-1 showed a significant reduction in both groups of ALS patients (TARDBP^{A382T}: 30% and 61% of reduction, respectively; ALS without known mutation: 37% and 62% of reduction, respectively) *versus* healthy controls, while TLQP-21 and C-terminus showed a reduction only in certain ALS patients (TLQP-21: 37% of reduction, for ALS without known mutation; C-term: 62% of reduction, only for ALS TARDBP^{A382T}) *versus* healthy cells.

In conclusion, the VGFp studied are present in NSC-34, but only TLQPp are modulated and secreted after oxidative stress, with a potential neuroprotective role. In fibroblasts, VGFp showed a significant reduction in ALS cell extracts. Hence, the research in the VGF field using NSC-34 could open new perspectives for potential therapeutic tools, while the results obtained through fibroblasts could be helpful for diagnostic purposes.

1.INTRODUZIONE

1.1. VGF

Il gene *vgf*

vgf è il nome dato da Andrea Levi (1985) a un gene scoperto nella linea di feocromocitoma di ratto (PC12), quando tali cellule venivano convertite ad un fenotipo neuronale dall'esposizione al Nerve Growth Factor (NGF). Tale differenziamento portava all'aumento di espressione di una serie di geni tipicamente neuronali e a questi geni ad induzione "delayed-early" appartiene proprio *vgf*. Studi successivi hanno poi dimostrato che VGF è regolato in maniera molto simile anche da altre neurotrofine (BDNF e NT-3).

Il gene, presente in singola copia, è localizzato sul cromosoma 7q22 nell'uomo (Canu et al., 1997) e nel cromosoma 5 nel topo (Hahm et al., 1999). La regione promotrice contiene motivi consenso per i regolatori trascrizionali, come il CCAAT box, vari siti di legame SP-1 e AP-2, una regione palindroma di 14 paia di basi in posizione -80 (CRE), sito di induzione attraverso c-AMP e legame del fattore di trascrizione CREB (Possenti et al., 1992), una regione silenziante a -400. E' inoltre stato rilevato un sito di legame CREB importante per l'espressione di VGF indotta da BDNF (Bozdagi et al., 2008). La regione codificante è formata da un singolo esone ed un unico introne che si trova in posizione 5' (Salton et al., 1991; Hawley et al., 1992; Possenti et al., 1992), il gene da origine a due differenti trascritti primari che non coinvolgono la porzione codificante. Il sequenziamento del gene *vgf* ha rivelato che esso codifica per un prodotto primario del peso di 68kDa (Possenti et al., 1989).

La proteina VGF

La sequenza primaria derivante dalla traduzione del gene *vgf* è una proteina chiamata proVGF o proteina VGF (non acronimo) costituita da 617 aa nel ratto/topo e da 615 aa nell'uomo (Fig.1), con omologia dell'85% tra le due specie.

Figura 1: VGF RAT sequence from: Salton SRJ; J Neurochem 1991; 57: 991-996 versus VGF HUMAN sequence from: Waterstone

RAT	MKTFTLPASV	LFCFLLLRG	LGAAPPGRSD	VYPPPLGSEH	NGQVAEDAVS	50
HUM	--ALR-S--A	--_----N--	-----PE	AQ----S---	KEP--G---P	49
RAT	RPKDDSVPEV	RAARNSEPQD	QGELFQGVDP	RALAAVLLQA	LDRPASPPAV	100
HUM	G---G-A---	-G-----	E-----	-----	-----_	98
RAT	PAGSQQGTPE	EAAEALLTES	VRSQTHSLPA	SEIQASAVAP	PRPQTQDNDDP	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	AYQSLSAFPF	KVRRLEGSFL	GGSEAGERLL	300
HUM	-----	---A-A----	---GVA----	-A--P-SAL-	-----	297
RAT	QQGLAQVEAG	RRQAEATRQA	AAQEERLADL	ASDLLLQYLL	QGGARQRDIG	350
HUM	-----	-----	-----	-----	-----G--	347
RAT	GRGLQETQQE	RENER_EEEAE	QERRGGGEDE	VGEEDEEAAE	AEAEAEAEER	400
HUM	-----AAE-	--SA-E-----	-----E-_R	-----	-----	398
RAT	ARQNALLFAE	EEDGEAGAED	KRSQEEAPGH	RRKDAEGTEE	GGEEDDDEE	450
HUM	-----	-----	-----T--	---E-----	----E_----	447
RAT	MDPQTIDSLI	ELSTKLHLPA	DDVVSIIIEV	EEKRRKKNA	PPEPVPPPRA	500
HUM	-----	-----	-----	-----	-----	497
RAT	APAPTHVRSP	QPPPPAP_A_RD	ELPDWNEVLP	PWDREDEVF	PPGPYHPFPN	550
HUM	-----	-----APA--	-----	-----Y	-----	548
RAT	YI ^{RR} TLQPP	ASS ^{RRR} HFHH	ALPPARHHPD	LEAQA ^{RR} AOE	EADAEE ^{RR} LQ	600
HUM	-----	SAL----Y--	----S--Y-G	R-----	--E-----	599
RAT	EQEELNYIE	HVLLHRP				617
HUM	-----	----R--				615

Tale sequenza amminoacidica presenta alcune caratteristiche degne di nota:

- una sequenza leader di 22 amminoacidi con una regione idrofobica nella regione aminoterminale, che promuove la traslocazione all'interno del reticolo endoplasmatico
- numerosi stretches contenenti due o più residui basici (Arg / Lys, ovvero R / K in notazione a singola lettera), o sequenze simili (Arg-Pro-Arg, o RPR in posizione 555): essi rappresentano potenziali siti di clivaggio proteolitico ad opera di specifici enzimi di processazione
- Tra i suddetti siti, inoltre, uno (Ala-Gly-Arg-Arg, o AGRR) mostra un residuo di glicina immediatamente a monte di un sito di potenziale clivaggio: tale sequenza è suggestiva della possibile produzione di un peptide amidato al suo C-termino. Come noto, una larga parte dei peptidi ormonali e neuropeptidi bioattivi presenta amidazione al suo C-termino, tanto che la messa a punto di uno specifico approccio all'isolamento di peptidi amidati al C-termino (Tatemoto and Mutt, 1980) consentì nei primi anni 80 la scoperta di numerosi peptidi di grande importanza, come NPY e PYY.
- alto contenuto di prolina (11%), una caratteristica in qualche modo simile a quanto riscontrato in una classe di proteine neuroendocrine conosciute come secretogranine o cromogranine
- alto contenuto di acido aspartico (14%) e glutammico in una ristretta zona della molecola che conferiscono acidità al dominio

Sulla base della sua sequenza primaria, la proteina VGF non presenta similitudini con altri prodotti noti: ciò conferma la peculiarità del prodotto, che rappresenta il precursore di una famiglia di peptidi bioattivi solo in parte oggi conosciuti.

Infatti, un attento studio della sequenza primaria ha mostrato la presenza di differenti siti di potenziale clivaggio che appaiono conservati in ratto e umano e che rappresentano siti specifici per l'azione di particolari enzimi proteolitici chiamati proconvertasi (PC2 o PC1/3). L'azione di tali enzimi determina un processamento della proteina VGF in frammenti di più basso peso molecolare (Trani et al., 2002). I peptidi che si vengono a formare dal selettivo clivaggio vengono trasportati all'interno di vescicole di secrezione o accumulate in queste per essere secrete in seguito alla depolarizzazione cellulare attraverso una via secretoria regolata (Possenti et al., 1989; Laslop et al., 1994; Benson et al., 1996).

Distribuzione tissutale

VGF e i suoi peptidi derivati mostrano una localizzazione tessuto e tipo cellulare altamente specifica. In modo particolare sono stati riscontrati in vari tipi di cellule endocrine dell'ipofisi, nella midollare del surrene, nell'intestino e nel pancreas (Ferri et al., 1992) e popolazioni neuronali del sistema nervoso centrale e periferico (Van der Pool et al., 1989; Ferri et al., 1992).

Nel sistema nervoso centrale l'immunoreattività per VGF è stata rilevata nell'ipotalamo mediale, in maniera specifica nel nucleo arcuato, nel nucleo soprachiasmatico e nelle cellule parvocellulari e magnocellulari dei nuclei paraventricolari e dei nuclei sopraottici (Van der Pool et al., 1989). VGF mRNA è ampiamente sintetizzato dai neuroni del cervello (Van den Pool et al., 1989, 1994) dove è stato ritrovato particolarmente abbondante nella corteccia cerebrale, in varie aree incluso l'ippocampo. Inoltre la sua espressione è particolarmente abbondante nell'ipotalamo, nel bulbo olfattorio, nei nuclei talamici e nel tronco encefalico (Snyder and Salton, 1998), così come nel midollo spinale e nel sistema nervoso periferico in particolare in gangli spinali, gangli trigeminali, gangli simpatici (Ferri et al., 1992).

L'mRNA di *vGF* viene espresso durante lo sviluppo embrionale nelle cellule del Purkinje nel cervelletto (Snyder *et al.*, 1998), inoltre immunoreattività per VGF è stata osservata nella zona paraventricolare del talamo (in particolare nel setto laterale e mediale) e nella regione dell'amigdala (Van den Pol *et al.*, 1994) in motoneuroni delle corna dorsali e ventrali del midollo spinale (Ferri *et al.*, 1992; Salton *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda la zona ipotalamica è stata evidenziata un'alta densità di neuroni contenenti VGF nel nucleo paraventricolare, nel nucleo sopraottico ed arcuato ed inoltre una elevata espressione nei nuclei soprachiasmatico e tuberomamillare (Van den Pol *et al.*, 1989; Wisor *et al.*, 1997). In particolare è stata evidenziata immunoreattività per alcuni frammenti C-terminali di VGF nel nucleo arcuato (Chakraborty et al., 2006). Nell'eminenza mediana si osserva un'alta densità di neuroni immunoreattivi per VGF soprattutto nella zona superficiale. Anche nella zona interna sono presenti alcuni neuroni di passaggio che esprimono VGF in relazione al transito di pathways da alcuni nuclei quali paraventricolare e sopraottico, importanti in quanto connessi con il bilancio osmotico e diretti all'ipofisi posteriore (Fujihara et al., 2012).

Nel sistema nervoso periferico, la proteina proVGF viene espressa in neuroni sensitivi primari dei gangli spinali e trigeminali, nella colonna intermedio-laterale del midollo spinale a livello toraco-lombare, è inoltre presente in neuroni simpatici dei gangli para e pre-vertebrali ed altri dell'innervazione autonoma afferente.

Nel sistema endocrino VGF si trova in numerose popolazioni endocrine del tubo digerente (Ferri et al., 1992); nello stomaco, VGF-peptidi appaiono variamente localizzati in cellule secernenti serotonina, gastrina, grelina ed in altre popolazioni (Branca et al., 2010). Nelle isole di Langerhans del pancreas immunoreattività per la porzione C-terminale di VGF è stata accertata in cellule contenenti insulina e nelle relative linee tumorali (Possenti et al., 1999), inoltre un'ampia e selettiva localizzazione di VGF e dei suoi prodotti è stata riscontrata anche in altre popolazioni di cellule contenenti somatostatina o glucagone (Cocco et al., 2007). Nel surrene VGF è localizzata unicamente in cellule della porzione midollare, in particolare mostra una distribuzione selettiva e differenziale in cellule adrenergiche o noradrenergiche, rispettivamente (D'Amato et al., 2008). Nell'ipofisi, VGF è stata riscontrata durante lo sviluppo nel ratto (Snyder et al., 2003), mentre nell'adulto, in particolare nei ratti femmina, un anticorpo diretto contro la porzione C-terminale della molecola mostra un'ampia immunoreattività in cellule gonadotrope ed in qualche misura in cellule lattotrope in rapporto ai vari stadi del ciclo estrale (Ferri et al., 1995) ed in corrispondenza del ciclo stagionale nella pecora (Branca et al., 2005).

Modulazione del gene VGF

Vari lavori hanno indicato una rimarchevole modulabilità del gene in aree del Sistema Nervoso Centrale. E' stata evidenziata una modulazione dell'espressione di VGF a seguito della stimolazione elettrica di alcune aree talamiche (Hawley et al., 1992). Allo stesso modo è stata riscontrata una differente modulazione di VGF mRNA nell'ipotalamo in risposta all'alimentazione e al digiuno (Hahn et al., 1999, 2002), come anche variazioni durante i ritmi circadiani (Wisor and Takahashi, 1997) e i ritmi stagionali (Ebling and Barrett, 2008).

Ulteriori evidenze di differente modulazione del VGF mRNA sono state riscontrate nell'ipofisi dove varia nelle diverse fasi del ciclo estrale, con elevati valori nella mattina dopo l'estro (Ferri et al., 1995).

Recentemente, analisi su array di geni hanno mostrato cambiamenti nell'espressione del gene *vgf* in diverse condizioni: l'mRNA era indotto nel cervello mediante trattamento con eritropoietina (Girgenti et al., 2009), nelle cellule epiteliali gastriche dopo l'infezione con *Helicobacter pylori* (Liu et al., 2006) e nei testicoli dopo la deplezione delle cellule germinali, comparati con i normali livelli, estremamente bassi, dello stesso organo (Xia et al., 2007). Al contrario una ridotta espressione di VGF mRNA è stata ritrovata nel corpo carotideo in seguito ad iperossia cronica (Dmitrieff et al., 2011) e nelle linee cellulari di tumore al seno (Hernandez-Vargas et al., 2007; Mitra et al., 2008), con una associata riduzione dei prodotti di VGF (Mitra et al., 2008).

VGF peptidi e loro attività biologica

Il processamento proteolitico della proteina VGF determina la formazione di differenti VGF peptidi con diverse attività biologiche, molte delle quali ancora in fase di studio.

I peptidi derivanti dalla porzione **C-terminale di proVGF** sono stati i primi scoperti a mostrare attività biologica *in vivo*. L'iniezione nei nuclei ipotalamici paraventricolari di alcuni di questi peptidi di varia lunghezza, determinava l'erezione in ratti in seguito all'eccitazione mediata dall'ossido nitrico attraverso una via ossitocinergica (Succu et al., 2004, 2005). Il TLQP-62 induce il potenziamento sinaptico in sezioni di ippocampo dipendente dalla via TrkB/BDNF; topi mutanti per VGF manifestano una serie di anomalie associate con la deficienza di BDNF (Liu et al., 2004; Heldt et al., 2007; Bozdagi et al., 2008) suggerendo che VGF possa avere funzioni nell'ippocampo modificando la disponibilità di BDNF. Evidenze su un possibile ruolo di VGF nella regolazione della plasticità sinaptica sono state dimostrate mediante trattamento delle cellule PC12 con il peptide C-terminale AQEE-30 o con infusione di questo peptide nel giro dentato dell'ippocampo di ratti. In entrambi i casi tale peptide induce l'espressione di alcuni geni che sono coinvolti nella sinaptogenesi, nel rimodellamento sinaptico o nella stimolazione di fattori di crescita (Hunsberger et al., 2007). Altri studi hanno determinato che i peptidi C-terminali (TLQP-62 e AQEE-30) stimolano il potenziamento elettrico e la secrezione di BDNF (Bozdagi et al., 2008), l'attività sinaptica (Alder et al., 2003), la proliferazione di progenitori ippocampali (Thakker-Varia et al., 2007) e l'espressione dei geni ippocampali (Hunsberger et al., 2007). La produzione di VGF era ridotta

nell'ippocampo in modelli animali di depressione e l'iniezione di TLQP-62 riduceva l'entità dello stato depressivo inducendo peraltro neurogenesi (Thakker-Varia et al., 2007). Inoltre il trattamento cronico con VGF aumenta la proliferazione di markers neuronali espressi nelle cellule progenitrici ippocampali sia *in vivo* che *in vitro* (*ibidem*).

Uno dei VGF peptidi oggetto di numerosi studi è il **TLQP-21** nel quale TLQP indica la sequenza dei primi quattro amminoacidi all'N-termino (Thr-Leu-Gln- Pro), e il numero 21 indica gli amminoacidi del peptide della sequenza.

Iniezioni intracerebroventricolari di TLQP-21 nel topo aumentano il consumo di energia, l'adrenalina circolante e la temperatura corporea e prevengono l'obesità indotta dalla dieta iperlipidica senza nessun effetto sull'assunzione di cibo (Bartolomucci et al., 2006; 2009). Nei Siberian Hamsters, viene confermato il ruolo catabolico ma con una riduzione dell'assunzione di cibo imitando una componente centrale dello stato catabolico tipica di questa specie quando si trovano in letargo durante il periodo invernale (Jethwa et al., 2007; Jethwa and Ebling, 2008).

L'importante ruolo metabolico di VGF era stato peraltro già evidenziato con lo studio sui topi VGF-knockout nei quali l'assenza di tale proteina svolge un ruolo fondamentale nel controllo del metabolismo: tali topi risultano più magri e più piccoli rispetto al gruppo di controllo, sono ipermetabolici, iperattivi, con un ridotto peso corporeo e una forte riduzione del grasso corporeo (Hahm et al., 1999) inoltre sono infertili e con una marcata riduzione dei livelli di leptina (Salton et al., 2000). Questi topi assumono il 50% delle calorie in più per grammo di peso corporeo e consumano il doppio dell'ossigeno, nonostante gli ormoni tiroidei ridotti e un normale tono cardiaco (Hahm et al., 1999). Inoltre i topi VGF Knock-out mostrano un incremento della sensibilità all'insulina in associazione con ridotti depositi di glicogeno nel fegato (Watson et al., 2015). In aggiunta il TLQP-21 ha mostrato altre numerose attività biologiche: *in vitro* induce contrazione gastrica della zona fundica, mediata dal rilascio di prostaglandine, mentre in seguito ad iniezione intracerebroventricolare, riduce il riempimento gastrico di circa il 40% (Severini et al., 2009).

Iniezioni periferiche di TLQP-21 portano ad iperalgesia in un modello di dolore infiammatorio, mentre la sua somministrazione a livello centrale produce un effetto analgesico (Rizzi et al., 2008). Più recentemente, diverse azioni del TLQP-21 sono state

viste a differenti livelli nell'asse riproduttivo di ratti maschi, infatti la somministrazione a livello centrale di tale peptide induceva un'acuta risposta attraverso la secrezione dell'ormone di rilascio della gonadotropina (GnRH). *In vitro* lo stesso peptide induce la secrezione dell'ormone luteinizzante (LH) nell'ipofisi di ratti maschi in età puberale ma non negli adulti (Pinilla et al., 2011). Uno studio svolto da Severini e collaboratori nel 2008 dimostrò l'azione antiapoptotica dose dipendente del peptide TLQP-21 su una sottopopolazione di cellule di granuli cerebellari in seguito alla morte cellulare indotta dalla privazione di siero e K^+ .

Due frammenti di VGF sono stati identificati nelle cellule TT del carcinoma umano tiroideo e sono stati denominati "Neuro Endocrine Regulatory Peptide" 1 e 2 o semplicemente **NERP-1** e **NERP-2** (Yamaguchi et al., 2007).

La localizzazione di questi peptidi è stata confermata nel cervello di ratto, in maniera specifica nel nucleo sopraottico, ipotalamico e paraventricolare. In seguito all'iniezione intracerebroventricolare di questi peptidi è stata riscontrata una soppressione del rilascio di vasopressina, mentre gli anticorpi contro questi due peptidi prevengono, nel sangue, la riduzione della vasopressina in risposta alle variazioni di acqua, suggerendo un possibile ruolo di questi peptidi nel fisiologico controllo dell'omeostasi dell'acqua. (Yamaguchi et al., 2007).

Inoltre il peptide NERP-2 determina un incremento nell'assunzione di cibo, dell'attività locomotoria, della temperatura corporea e del consumo di cibo in seguito a iniezione intracerebroventricolare in ratti (Toshinai et al., 2010). E' stato dimostrato l'incremento dei livelli dei peptidi NERP-1 e 2 in parallelo con la loro simultanea riduzione nel plasma in seguito a stimolo osmotico, dimostrando un'attività simil ormonale in relazione con l'omeostasi dei fluidi (D'Amato et al., 2012).

VGF nelle malattie psichiatriche e neurodegenerative

Da diversi anni ormai numerosi lavori indicano il coinvolgimento e possibile ruolo di VGF e dei suoi peptidi nelle malattie neurodegenerative e psichiatriche. Nei disordini bipolari VGF mRNA risulta ridotto nelle regioni CA1b e CA2 ippocampale come anche nell'area 9 di Brodmann della corteccia prefrontale (Thakker-Varia et al., 2010). Nella corteccia

umana di malati di Alzheimer e Parkinson si è vista una riduzione differente di taluni VGF peptidi (C ed N-terminali, PGH e NERP1) con cambi selettivi nelle due condizioni patologiche (Cocco et al., 2010). Differenti Studi proteomici hanno evidenziato la modulazione di selettivi VGF peptidi nel liquido cerebrospinale di pazienti con malattie psichiatriche e neurodegenerative di considerevole rilievo sociale tra cui Morbo di Alzheimer e di Parkinson, SLA, schizofrenia e demenza frontotemporale con possibili alterazioni specifiche per le differenti patologie (Carrette et al., 2003; Selle et al., 2005; Pasinetti et al., 2006; Huang et al., 2006; Ruetschi et al., 2005) questo farebbe supporre che VGF e suoi selettivi peptidi possano avere un ruolo cruciale nelle funzioni cerebrali.

Nel liquido cerebrospinale di pazienti con demenza frontotemporale alcune proteine sono state ritrovate espresse in maniera differente (aumentate o ridotte) comparate con i gruppi di controllo. Una di queste proteine, corrispondente a 26-62 aa all' N-termino della proteina VGF umana, è risultata significativamente ridotta (Ruetschi et al., 2005). Nel fluido cerebrospinale di pazienti con schizofrenia non trattata, un frammento di quaranta amminoacidi dell'estremo N-terminale di VGF ha mostrato un incremento di circa tre volte rispetto al gruppo di controllo. Inoltre campioni di cervelli post-mortem di analoghi pazienti mostrano un incremento generale del precursore di VGF (Huang et al., 2006).

Nelle malattie neurodegenerative un primo lavoro riguardante la malattia di Alzheimer descrive l'analisi del fluido cerebrospinale, mediante spettroscopia di massa (SELDI-TOF-MS), evidenziando la selettiva riduzione di 4 differenti proteine tra cui un peptide di 4.8kDa derivante da una porzione di proVGF (porzione 378-417) (Carrette et al., 2003). Uno studio più ampio rivolto su pazienti con malattia di Alzheimer, rispetto ad altre forme di demenza (tra cui la demenza vascolare, la demenza frontotemporale e il morbo di Parkinson) e in pazienti di controllo senza deterioramento cognitivo, ha portato alla scoperta di una riduzione di diversi frammenti di VGF nei malati Alzheimer rispetto ai controlli, e uno di questi frammenti mostra differenze significative tra la malattia di Alzheimer e le altre demenze studiate (Selle et al., 2005).

Successivamente Pasinetti e collaboratori nel 2006 hanno identificato nel liquido cerebrospinale di pazienti SLA rispetto ad un gruppo di controllo la riduzione di un peptide di 4.8kDa riconducibile in parte al frammento di VGF già evidenziato da Carrette nel 2003. Nella sclerosi laterale amiotrofica in modelli animali (topi G93ASOD1), è stata riscontrata una riduzione di VGF immunoreattività (full length) in liquor CS, motoneuroni SMI-32

positivi, e siero, come anche nel liquor di pazienti sin dalle fasi relativamente precoci della malattia (Zhao et al. 2008). Per contrapposto, l'iperespressione di un costrutto full-length di VGF in colture primarie di neuroni spinali determina riduzione del danno eccitotossico indotto da agonisti del glutammato (Zhao et al., 2008).

Più recentemente VGF sembra mediare l'azione neuroprotettiva in seguito a stress del reticolo endoplasmatico questo tipo di stress sembra essere implicato nella patogenesi della SLA (Shimazawa et al., 2010).

Recettori per il TLQP-21

Nonostante i numerosi ruoli fisiologici descritti per alcuni VGF peptidi poco si conosce dei meccanismi d'azione ad essi associati. Un primo passo è stato quello d'identificare possibili recettori leganti specifici VGF peptidi e tra questi il TLQP è sicuramente quello di maggior interesse; tali ricerche hanno portato alla recente scoperta di due differenti recettori che sembrano attivati dal legame col VGF peptide TLQP-21. Una prima esistenza di una classe di recettori specifici leganti il TLQP è stata mostrata da Possenti nel 2012 nella membrana degli adipociti, tali recettori sembrano attivati dal legame del TLQP-21, presente nella terminazione del WAT, determinando un effetto modulatore pro-lipolitico (Possenti et al., 2012).

Nel 2013 Chen e collaboratori utilizzando cellule di macrofagi hanno identificato mediante la spettroscopia di massa l'attivazione del recettore gC1q in seguito a trattamento con TLQP-21, nel quale causa una ipersensibilità meccanica associata a danno del nervo sciatico.

Nei ratti tale recettore del complemento è espresso nelle cellule di microglia del sistema nervoso centrale ed è indispensabile per l'adipogenesi e l'insulin signaling (review Lewis, 2015).

Hannedouche e collaboratori (2013) hanno poi messo in evidenza l'attivazione, sempre da parte del TLQP-21, di un altro recettore del complemento accoppiato a Proteina G chiamato C3aR-1. Questo recettore sembra mediare l'azione del TLQP in due differenti linee cellulari (CHO-K1 e O-342). Tuttavia, è stato successivamente dimostrato che questo ormone ha anche un ruolo nel cancro, nella neurogenesi, e nel rilascio di ormoni

dall'ipofisi. L'attivazione di entrambi i recettori, da parte del TLQP-21, determina all'interno della cellula un aumento dei livelli di calcio intracellulare.

La scoperta di questi recettori rappresenta l'inizio dell'identificazione di specifici meccanismi d'azione nei quali il TLQP-21 ed altri VGF peptidi potrebbero essere coinvolti.

1.2. Stress ossidativo

Lo stress ossidativo è un meccanismo di danno cellulare determinato da un eccesso di sostanze chimiche chiamate radicali liberi. I radicali liberi si formano come inevitabile sottoprodotto di molti processi biochimici cellulari normalmente attivi in tutti gli organismi, come la riduzione dell'ossigeno molecolare durante la respirazione aerobica, dall'ossidazione delle catecolammine, dall'attivazione della cascata dell'acido arachidonico, dall'endotelio vascolare.

I radicali liberi sono specie chimiche che contengono un elettrone spaiato e l'energia creata da questa configurazione instabile viene liberata attraverso reazioni con le molecole adiacenti, come sostanze organiche e inorganiche, proteine, lipidi, carboidrati e acidi nucleici, le quali vengono a loro volta trasformate in radicali liberi propagando la catena del danno.

Alcune di queste molecole sono altamente instabili e decadono spontaneamente, quando questo non accade le cellule attuano diversi meccanismi per rimuovere i radicali liberi e minimizzare il danno:

- Antiossidanti che inattivano o bloccano la formazione dei radicali liberi e riducono il danno (es. vitamina E e A)
- Legame degli ioni alle proteine di deposito e di trasporto come transferrina, ferritina o lattoferrina che limitano la formazione di radicali OH
- Enzimi che agiscono come sistemi di disinnescamento dei radicali liberi (es. catalasi, superossido dismutasi e glutazione perossidasi)

Se questi sistemi enzimatici non dovessero essere sufficienti a limitare il danno cellulare allora la cellula interviene attivando i sistemi di riparazione del DNA, arrestando il ciclo cellulare oppure bloccando tutti i processi di trascrizione/traduzione dell'mRNA per la formazione di nuove proteine, in modo che queste non subiscano dei danni.

Un fattore di stress ossidativo è rappresentato dalla sodio arsenite che è il sale sodico dell'acido arsenioso. In letteratura è ben noto che l'esposizione all'arsenico e ai suoi derivati produce ROS e specie reattive dell'ossigeno come perossido di idrogeno (H₂O₂), radicale idrossile (HO•), ossido nitrico (NO•) o anione superossido (O₂•⁻).

Evidenze epidemiologiche hanno dimostrato che una esposizione cronica a lungo termine all'arsenico è associata con un incremento di rischio di tumore al fegato, alla pelle, alla vescica e ai polmoni. L'esposizione all'arsenico porta ad un aumento della diffusione di diabete, malattie cardiovascolari e ipertensione. Inoltre numerosi lavori associano lo stress ossidativo al danno che si può riscontrare nei neuroni in numerose malattie neurodegenerative quali morbo di Parkinson, malattia di Alzheimer, sclerosi laterale amiotrofica e sclerosi multipla. Nonostante ciò i meccanismi con cui l'arsenico indurrebbe tali effetti patologici non sono ancora stati delineati. La formazione di ROS e specie reattive dell'ossigeno è stato quindi proposto come un possibile meccanismo d'azione del danno indotto dall'esposizione all'arsenico e alla sodio arsenite come suo derivato.

Come già accennato in precedenza quando la cellula è sottoposta ad uno stress (ossidativo, radioattivo, termico) reagisce bloccando i processi di traduzione di RNA messaggeri al fine di risparmiare l'energia necessaria alla sopravvivenza cellulare. Il risultato di tale operazione determina la formazione di granuli da stress cioè complessi macromolecolari citoplasmatici che contengono le proteine che legano l'RNA (RNA binding protein) e trascritti di mRNA, organizzati a formare dei granuli attraverso interazioni proteina-proteina, mediate dei domini ricchi in glicina. Questo fenomeno di citoprotezione è reversibile, i trascritti vengono protetti dentro questi ammassi proteici e al cessare dell'attività stressogena i granuli regrediscono e la sintesi proteica potrà riprendere.

È stato visto che mutazioni a carico delle proteine che legano l'RNA, implicate nella formazione dei granuli da stress e coinvolte in patologie neurodegenerative come la SLA, aumentino la propensione di queste proteine ad aggregarsi nel citoplasma e a formare questi granuli (Liu-Yesucevitz et al, 2010). Probabilmente la maggior tendenza delle forme mutate di queste proteine a formare aggregati citoplasmatici, romperebbe l'equilibrio che caratterizza l'aggregazione proteica nei granuli da stress, un processo finemente regolato; inoltre la formazione di duraturi, stabili aggregati proteici citoplasmatici potrebbe servire da 'focolaio' per un'ulteriore aggregazione di granuli da stress, attraverso il legame con

altre proteine che legano l'RNA. Questo porterebbe ad una attivazione eccessiva del processo che conduce alla formazione dei granuli da stress, che caratterizzerebbe alcune patologie come ad esempio il morbo di Alzheimer.

Quindi possiamo dire che le cellule necessitano dei granuli da stress per poter rispondere allo stress, ma una formazione eccessivamente attiva di questi (come si verifica in caso di mutazioni della TDP-43 nella SLA) interferirebbe con le normali funzioni cellulari, attraverso un prolungato silenziamento dei trascritti di mRNA, che priverebbe la cellula di importanti proteine, necessarie per la sua sopravvivenza (Wolozin B., 2012).

1.3. Stress ossidativo e funzionalità mitocondriale

I mitocondri sono le "centrali energetiche" della cellula; producono l'energia necessaria per molte funzioni cellulari e contengono gli enzimi necessari per le reazioni chimiche che recuperano l'energia contenuta negli alimenti e l'accumulano in speciali molecole di adenosintrifosfato (ATP). I mitocondri sono importanti bersagli di tutti gli stimoli lesivi compreso lo stress ossidativo. Il danno cellulare si accompagna frequentemente a variazioni morfologiche mitocondriali, spesso si manifesta con la formazione del cosiddetto poro di transizione di permeabilità mitocondriale (MPTP), a livello della membrana mitocondriale interna. Sebbene reversibile nelle sue fasi iniziali, questo poro diventa permanente se lo stimolo persiste, precludendo il potenziale di membrana mitocondriale. Oltre a ciò, in alcune patologie si verificano alterazioni del numero, delle dimensioni e della forma dei mitocondri. Un eccesso di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) o dell'azoto (RNS) sembra il principale responsabile della lesione iniziale e dell'alterazione bioenergetica anche se si ritiene che possa anche fornire lo stimolo per un eventuale ripresa funzionale. Negli anni numerosi studi hanno dimostrato un coinvolgimento dei mitocondri nelle malattie neurodegenerative come ad esempio il morbo di Parkinson, dove è stato accertato un deficit del complesso I nei mitocondri della substantia nigra, e nel morbo di Alzheimer, dove il deficit riguarda il complesso IV. Inoltre la disfunzione mitocondriale è una caratteristica patologica tipica della SLA. Nei modelli murini SOD1-dipendente, alterazioni della morfologia mitocondriale, alterazioni bioenergetiche, della regolazione del calcio, del trasporto e della dinamica mitocondriale si verificano prima della morte cellulare, evidenziando l'importanza di tali disfunzioni nella patogenesi di questa malattia (Dal Canto and Gurney, 1994; Doi et al., 2008; Higgins et al.,

2002, 2003; Sasaki et al., 2005). Simili alterazioni sono state osservate in tessuti derivanti da pazienti SLA (Sasaki and Iwata, 1996, 2007). Numerosi studi hanno già messo in luce il ruolo della SOD-1 mutante nel promuovere una degenerazione mitocondriale, mentre solo pochi studi recenti hanno evidenziato un possibile ruolo tossico della TDP-43 sulla funzionalità mitocondriale.

1.4. Sclerosi laterale amiotrofica

La Sclerosi laterale amiotrofica o SLA è una malattia neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni cioè le cellule nervose che permettono i movimenti della muscolatura volontaria. I motoneuroni centrali sono classificati in 1° motoneurone a livello della corteccia cerebrale che trasportano il segnale nervoso attraverso prolungamenti che dal cervello arrivano al midollo spinale e in 2° motoneurone a livello del tronco encefalico e del midollo spinale che trasportano il segnale ai muscoli. La SLA è caratterizzata dal fatto che sia il primo che il secondo motoneurone vanno incontro a progressiva degenerazione nel corso di mesi o pochi anni. Le conseguenze di questa malattia sono la perdita progressiva e irreversibile della normale capacità di deglutizione (disfagia), dell'articolazione della parola (disartria) e del controllo dei muscoli scheletrici con una paralisi che può avere un'estensione variabile, fino alla morte per insufficienza respiratoria dopo 3-5 anni dalla diagnosi. L'incidenza è di 2-3 casi ogni 100.000 individui, di questi circa il 90-95% dei casi sono sporadici, mentre il 5-10% rappresentano casi di SLA familiare. Numerosi meccanismi patogenetici sono stati proposti come possibile causa di questa patologia (Musarò A., 2010):

- Eccesso di glutammato: è un aminoacido usato dalle cellule nervose come segnale chimico, quando il suo tasso è elevato ne determina un'iperattività che può risultare nociva
- Stress ossidativo: il danno dovuto ai radicali dell'ossigeno ed ad altre sostanze tossiche che si accumulano fisiologicamente all'interno della cellula, potrebbe portare alla morte dei motoneuroni
- Alterazioni mitocondriali
- Accumulo di proteine anomale all'interno della cellula
- Carezza di fattori di crescita neuromuscolari

- Meccanismi di eliminazione di proteine intracellulari deficitari: attraverso alcuni meccanismi di detersione della cellula, i motoneuroni eliminano i prodotti anomali (autofagia, lisosomi ecc...) nella SLA questi meccanismi potrebbero essere alterati
- Neuroinfiammazione: oltre al motoneurone esiste una sofferenza delle cellule gliali, che si trovano in uno stato infiammatorio nocivo per le cellule. E' dibattuto se questo stato infiammatorio sia una concausa oppure una conseguenza del danno motoneuronale.
- Alterazione dei meccanismi di trasporto intraneuronale: alcune mutazioni genetiche rare codificano per proteine che sono implicate nel trasporto assonale (il trasporto di sostanze tra nucleo e periferia della cellula)

Come altre malattie neurodegenerative, la SLA è una malattia multifattoriale determinata dal concorso di più meccanismi sopracitati riconducibili a due fattori:

- fattori tossico-ambientali: l'esposizione a sostanze quali metalli pesanti e pesticidi in grado di determinare una progressiva neuro-degenerazione dei motoneuroni (associazione ancora in fase di studio)
- presenza di mutazioni genetiche: sono stati individuati oltre 20 geni associati con lo sviluppo della patologia

A partire dagli anni '90 sono infatti stati scoperti numerosi geni responsabili della SLA: due mutazioni estremamente importanti associate alla patogenesi della SLA sono quelle che coinvolgono i geni SOD-1 e TARDBP. Il gene SOD-1 è responsabile di circa il 20% dei casi di SLA familiare ed è il gene che codifica per l'enzima superossido dismutasi Cu/Zn o SOD-1 che ha funzione antiossidante in quanto riduce i livelli di anione superossido O_2^- . Il malfunzionamento di questo enzima comporta un accumulo di specie reattive dell'ossigeno portando ad una alterazione di proteine, membrane e DNA.

Il gene TARDBP è responsabile di circa il 4% dei casi di SLA familiare ed è il gene che codifica per la proteina TDP-43. Tale proteina svolge un ruolo fondamentale nel processamento degli mRNA. In condizioni normali la TDP-43 è localizzata nel nucleo, mentre la forma mutata si accumula nel citoplasma neuronale con conseguente perdita della sua funzione e/o acquisizione di proprietà tossiche. Nonostante questa mutazione sia

responsabile del 4% dei casi di SLA a livello mondiale in realtà in Sardegna è responsabile di circa il 33% dei casi di SLA familiare e sporadica.

La diagnosi della SLA si raggiunge ancora relativamente tardi, circa 12 mesi dopo la comparsa dei primi sintomi anche a causa della totale assenza di biomarcatori. Per questo numerosi studi sono indirizzati alla ricerca di specifiche proteine che potrebbero essere utili per una diagnosi precoce della malattia.

1.5. Linea cellulare motoneuronale di topo NSC-34

Preparati di colture primarie di motoneuroni mostravano bassi rendimenti limitando la corretta e intensiva applicazione di tecniche molecolari e biochimiche che potessero aiutare a comprendere la loro unica e complessa biologia cellulare e poter quindi studiare appieno i diversi fattori che causano la degenerazione motoneuronale implicata in numerose patologie.

La disponibilità di una linea cellulare uniforme e immortale ha permesso di superare le numerose difficoltà inerenti l'uso di colture cellulari motoneuronali primarie. La linea cellulare NSC-34 (neuroblastoma X spinal cord cell) è il risultato della fusione di cellule di neuroblastoma (N18TG2) con cellule di midollo spinale di topo ed esprimono una varietà di caratteristiche associate con i motoneuroni primari (Cashman et al., 1992; Matusica et al., 2008):

- esprimono la colina acetil-transferasi (ChAT)
- esprimono meccanismi di sintesi, conservazione e rilascio di acetilcolina
- formano sinapsi
- esprimono proteine del citoscheletro tipiche dei motoneuroni

1.6. Fibroblasti umani e SLA

I fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee di pazienti SLA sono stati recentemente utilizzati in un lavoro di Sabatelli e collaboratori del 2015 per valutare alterazione cellulari determinate da mutazioni TARDBP nella SLA. Tali cellule rappresentano un prezioso modello per studiare i meccanismi correlati alla SLA, in modo specifico in quei meccanismi legati alla mutazione della proteina TDP-43. Infatti, alterazioni cellulari

riscontrate in queste cellule sembrano essere analoghe a quelle viste in cellule nervose nella SLA.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Linea cellulare motoneuronale di topo NSC-34

La linea cellulare NSC-34 è stata mantenuta in coltura nel terreno DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium – 4500 mg/l di glucosio, Sigma) al quale sono stati aggiunti: siero di bovino (10%), con complemento inattivato (52-56°C per 30 minuti); L-glutammina (1%); antibiotici penicillina e streptomina (0.1%). Le cellule sono state espanse in fiasche da 75 cm² e mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera controllata di CO₂ al 5%. Per ottimizzare il legame delle cellule con il substrato abbiamo utilizzato una soluzione di polilisina (1:5) e gelatina (1:12) in PBS. La soluzione così ottenuta è stata filtrata con filtro di 0.45 µm e utilizzata per pretrattare (5 min) i vetrini per l'immunocitochimica e i pozzetti delle multiwell per i test di vitalità cellulare. Successivamente le cellule sono state seminate alla concentrazione 30.000 cell/ml per immunocitochimica in piastre petri (35 mm di diametro) contenenti vetrini da 13 mm di diametro, precedentemente sterilizzati; mentre per i test di vitalità cellulare la semina è stata effettuata a 50.000 cell/ml in multiwell da 24 oppure 10.000 cell/ml in multiwell da 96; le cellule così espanse sono state utilizzate il giorno successivo alla semina.

2.2. Stress ossidativo: Sodio arsenite

Lo stress ossidativo applicato alle nostre cellule prevede l'utilizzo di una soluzione di Sodio Arsenite (NaAsO₂) alla concentrazione finale di 0.5 mM. Tale composto è stato aggiunto al terreno di coltura normalmente utilizzato e il trattamento protratto per 30 minuti per effettuare analisi d'immunocitochimica o 60 minuti per i test vitalità cellulare (MTT) e le estrazioni cellulari (per ELISA, cromatografia e western blot).

2.3. Immunocitochimica (ICC)

Le immunocolorazioni sono state eseguite utilizzando metodiche indirette. I primi esperimenti si sono basati su colorazioni singole, per individuare la presenza dei vari peptidi VGF-immunoreattivi. Dopo 48 h di incubazione i vetrini sono stati trasferiti in piastre da 24 pozzetti per essere fissate e permeabilizzate come segue:

- paraformaldeide al 4% + saccarosio al 4% (finale 2%) per 15 minuti
- metanolo freddo (-20°C) per 10 minuti
- lavaggio veloce con PBS 1X
- permeabilizzate con PBS – TRITON 0.1% per 20 minuti

Dopo un ulteriore lavaggio con PBS 1X le cellule sono state incubate con gli anticorpi primari specifici per le nostre sequenze di VGF (tab.1) diluiti nel siero dell'animale donatore del secondario al 3% (solitamente asino) in PBS 1X per 4 ore. Successivamente il primario è stato rimosso con PBS (3 lavaggi x 3 min.) e le cellule sono state incubate con un appropriato anticorpo secondario coniugato con Cyanina 3.18 (Cy3: emette in giallo/rosso) per 1 ora. In seguito quindi a lavaggi finali (in PBS, 3 x 3 min.) i vetrini copri oggetto sono stati montati su vetrini porta campione con PBS/Glicerolo (60/40%) contenente NaN_3 (0.05%) come conservante.

Sono state inoltre effettuate delle immunocolorazioni doppie, per verificare l'avvenuto stress ossidativo identificando i granuli da stress all'interno del citoplasma di cellule trattate con Sodio Arsenite e contemporaneamente identificare l'eventuale colocalizzazione tra prodotti di VGF e tali granuli. In particolare, abbiamo utilizzato miscele che includevano un determinato anticorpo anti-VGF (tabella n.1), e l'anticorpo HuR I (Anti Human Antigen R) rivelati mediante l'uso di anticorpi secondari coniugati con fluorocromi diversi (Cyanina 3: giallo-rosso, Alexa 488: verde).

2.3.1. Anticorpi/Antisieri utilizzati

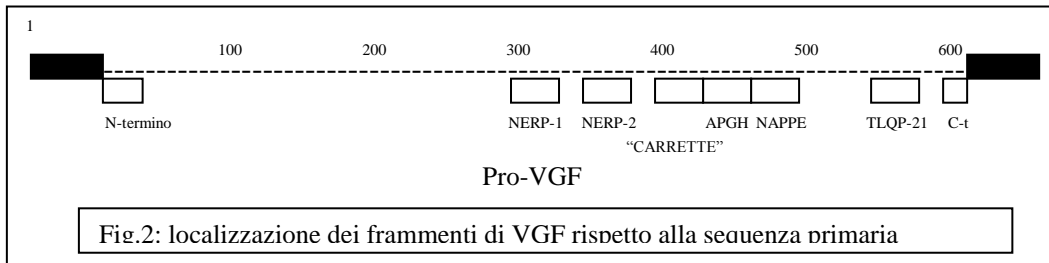
Anticorpi anti-VGF peptidi

Per questo lavoro abbiamo utilizzato differenti antisieri contro specifici peptidi ed epitopi di VGF, creati appositamente nel nostro laboratorio immunizzando conigli, pecore, galline e guinea pig (occasionalmente ratti). Tra i differenti immunogeni usati, numerosi sono stati

prodotti come peptidi sintetici corrispondenti a selezionate regioni della sequenza primaria di VGF, opportunamente coniugati all'estremo desiderato (C- o N-termino).

Nome	Sequenza	Porzione VGF	Specie
N-termino	APPG RSDV YP-c	rVGF ₂₄₋₃₁	Rabbit
C-termino	dY-I EHV L LHRP	rVGF ₆₀₉₋₆₁₇	Rabbit
NERP-2	c-G GARQ RDLG –NH ₂	rVGF ₃₄₂₋₃₅₀	G. Pig
C-t “Carrette”	c-EE DGEA GAED	rVGF ₄₁₁₋₄₂₀	Rabbit
APGH	dY-R SQEE APGH	rVGF ₄₂₂₋₄₃₁	Rabbit
NAPPE	NAPP EPVP P-c	rVGF ₄₈₉₋₄₉₇	Rabbit
TLQP-21	GST-TLQPP ASSRR-c	rVGF ₅₅₆₋₅₇₆	G. Pig
NERP-1	dY-Q QGLA QVEA- NH ₂	rVGF ₃₀₁₋₃₀₉	Rabbit

Tabella 1: VGF peptidi utilizzati per analisi ICC ed ELISA*



Anticorpo anti-HuR I

In questo lavoro, per mettere in evidenza la formazione dei granuli da stress, in seguito allo stress ossidativo, abbiamo utilizzato l'anticorpo anti-HuR I (anti Human Antigen R) specifico per una delle RNA binding protein che vanno a costituire la struttura dei granuli da stress. L'anticorpo anti-HuR I (Santa Cruz) è stato usato alla concentrazione 1:700 in immunocitochimica incubato per 4 ore.

Anticorpo Anti-C3aR-1 e Anti gC1q-R (Recettori per il TLQP-21)

Per identificare i recettori per il TLQP-21 abbiamo utilizzato i due anticorpi conosciuti in letteratura (Chen et al., 2013; Hannedouche et al., 2013).

L'anticorpo anti-C3aR-1 (Abcam) riconosce il recettore C3a del complemento ed è prodotto contro un peptide sintetico di 19 amminoacidi localizzato nella porzione C-terminale della sequenza recettoriale. È stato utilizzato in immunocitochimica alla concentrazione 1:50 incubato per 2 ore e in Western Blot alla concentrazione 1:800.

L'anticorpo anti-gC1q (Abcam) riconosce la testa globulare del recettore gC1q ed è prodotto contro la sequenza 150-200aa della medesima proteina, È stato utilizzato in immunocitochimica alla concentrazione 1:300 overnight a +4°C. Le cellule sono state fissate con metanolo ghiacciato per 5 minuti quindi incubate con PBS-TWEEN 0.1% al quale è stato aggiunto l'1% BSA, il 10% di normal goat serum e 0.3M di glicina per un'ora, per permeabilizzare le cellule e bloccare i possibili siti aspecifici. L'anticorpo è stato utilizzato anche in Western Blot alla concentrazione 1:1500.

2.4. Microscopia ed acquisizione immagini

I preparati sono stati osservati e fotografati mediante l'uso di un microscopio a luce trasmessa a fluorescenza (Olimpus BX60), al quale è connesso un sistema prototipo che permette l'eccitazione multipla di diversi fluorocromi (Ferri et al., 1995). Il microscopio è fornito di un sistema fotografico PM30 (Olimpus, Milano, Italia) e di una fotocamera digitale Fuji S3 PRO (Fujifilm, Milano, Italia) interfacciata ad un PC mediante un software di aggiustamento cromatico Silverfast DC Pro (Lasersoft, Germania).

2.5. Estrazione campioni per ELISA e cromatografia

Le proteine per i saggi ELISA sono state estratte con PBS/PIC (50µl PIC in 10 ml di PBS 1X) utilizzando il seguente protocollo:

- le cellule sono state staccate e centrifugate per 10 minuti a 1500 rpm a temperatura ambiente
- risospese con PBS 1X e centrifugate per 10 minuti a 1500 rpm a temperatura ambiente

- è stato aggiunto PBS-PIC (10 ml per ogni grammo di tessuto) per inibire le proteasi presenti
- le cellule sono state sonicate 3 volte per pochi secondi e lasciate in ghiaccio per 12 minuti
- bollite per 12 minuti e, dopo altri 10 minuti in ghiaccio centrifugate per 15 minuti a 3000 rpm a 4°C
- è stato recuperato il supernatante e trasferito in criovial, mettendo 30µl in una provetta a parte per la conta delle proteine
- conservate a -20°C

I campioni così ottenuti sono stati utilizzati per l'ELISA ma prima è stata valutata la concentrazione di proteine totali utilizzando il metodo Pierce BCA protein assay kit (Thermo scientific).

Oltre agli estratti cellulari per ogni campione cellulare estratto è stato anche raccolto il medium, centrifugato a 3000rpm per 15 min raccolto il supernatante e testato in ELISA.

2.6. ELISA

Gli immunosaggi Elisa sono stati eseguiti mediante una metodica indiretta e competitiva. L'antigene è stato incubato in tampone carbonato/bicarbonato per 4 ore a temperatura ambiente in 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). Dopo il lavaggio (3 volte con tampone PBS contenente 0.05% Tween 20) i possibili siti aspecifici presenti nelle piastre sono stati bloccati con siero normale di asino (da pool, 9% in PBS) per 2 ore a temperatura ambiente. Le piastre sono state quindi lavate e avvolte in fogli di alluminio per essere conservate a -30° C.

Gli antigeni utilizzati per la fase di coating sono peptidi sintetici corrispondenti alle specifiche porzioni di VGF peptidi prese in esame (tab.1).

Le piastre sono state scongelate e si è proceduto con l'incubazione per 4 ore, a temperatura ambiente ed in agitazione costante con la seguente miscela: (i) anticorpo primario, diluito in PBS, contenente siero normale di asino (9%); (ii) campione da testare così da creare competizione tra il campione ed il peptide attaccato alle pareti dei pozzetti per il legame all'anticorpo primario o curva Standard preparata con concentrazioni scalari del medesimo

peptide utilizzato per la fase di coating. Dopo l'incubazione le piastre sono state lavate come già indicato e incubate con un anticorpo secondario coniugato con biotina, diluito in PBS con siero normale di asino al 9% (specie del donatore di tutti i secondari usati) per 2 ore a temperatura ambiente, in agitazione costante. Le piastre sono state nuovamente lavate e incubate con streptavidina coniugata con perossidasi, diluita in BSA 0.1%, per 30 minuti, a temperatura ambiente, in agitazione. Dopo ulteriore lavaggio abbiamo rivelato la presenza dei VGF peptidi mediante incubazione con tetra-metil-benzidina (TMB, Sigma, Italia, oppure Kem-En-Tec Denmark) per 10 minuti, a temperatura ambiente sempre in agitazione e bloccato la reazione con HCl 1mol/L ed effettuato una misurazione densitometrica con lettore multifunzionale (plate chameleon multi label detection platform HIDEX) usato in assorbanza a 450 nm, entro 30 minuti.

2.7. Cromatografia

Per poter caratterizzare le forme molecolari di VGF presenti nelle nostre cellule sono state condotte cromatografie con Sephadex G-50 superfine (Sigma, Italia) tramite una colonna cromatografica 1m x 2cm², collegata ad una pompa a pressione (5 impulsi/min.) e ad un raccoglitore di frazioni (3 ml/frazione). La colonna è stata equilibrata con ammonio bicarbonato 50mM a 4° C. Lo stesso tampone è stato usato anche per far correre i campioni.

Per poter calcolare il peso molecolare dei vari peptidi presenti negli estratti cellulari è stata costruita una curva standard facendo eluire in colonna i seguenti marker molecolari (Sigma, Italia): blu destrano (2000kDa) che rappresenta il volume vuoto (V_0), albumina bovina (66KDa), anidrasi carbonica (29KDa), citocromo C (12.4 KDa), aprotinina (6.5KDa) e vitamina B12 (1.3 KDa).

Per settare inizio e fine corsa cromatografica di ogni singolo campione è stato determinato di volta in volta il volume vuoto V_0 (volume di eluizione del primo picco di proteine: assorbanza a 280 nm) ed il picco di conduttività (volume di eluizione delle molecole più piccole, NaCl ed altri sali: tramite conduttivimetro). Le frazioni raccolte sono state asciugate con evaporatore centrifugo (Eppendorf concentrator 5301) fino ad un volume di circa 200 μ l, indi conservate a -20° C prima di essere testate con saggi ELISA. Il recupero

è stato calcolato sommando i livelli di VGF-peptidi ottenuti nelle singole frazioni e calcolando il rapporto di tale somma con la concentrazione misurata nel campione intero.

2.8. Estrazione campioni per Western Blot

L'estrazione cellulare per il Western Blot è stata effettuata utilizzando l'SDS (sodio dodecil solfato) utilizzando il seguente protocollo:

- rimozione del terreno di coltura e lavaggio con PBS 1X per eliminare eventuali tracce di siero bovino
- aggiunti 650 µl per fiasca (75 cm²) di SDS al 2% e con uno scraper abbiamo proceduto a staccarle e trasferirle in eppendorf da 2 ml
- i campioni sono stati sonicati in ghiaccio per 3 volte per pochi secondi
- successivamente centrifugati a 10.000 rpm per 10 minuti a -4°C
- il supernatante è stato trasferito in criovial e conservato a -20°C
- è stata prelevata un'aliquota da 30 µl per la determinazione delle proteine totali con il metodo Pierce BCA protein assay kit (Thermo scientific).

2.9. Western Blot

All'estratto cellulare è stato aggiunto il loading buffer (75 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glicerolo, 5% 2-mercaptoetanol e 0.001% blu di bromofenolo) e i campioni sono stati portati a 100°C per 3 minuti. Le aliquote (30 µg di proteine totali) di ogni campione sono state seminate in un gel di precasted a gradiente dal 4 al 20% per la corsa elettroforetica.

Le proteine separate sono state trasferite su membrana PVDF (Hybond-P; Amersham) mediante blotting in campo elettrico, bloccate con TBS-T (Tris buffer + 10% Tween-20) con il 5% di latte in polvere senza grassi e incubate con l'anticorpo policlonale specifico (anti-TLQP, anti-C-term, anti-gC1q-R, anti-C3aR) per tutta la notte in camera fredda (4°C). Le membrane sono state quindi lavate e incubate con un anticorpo secondario, specifico per la specie in cui è stato prodotto il primario, coniugato con la perossidasi per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo diversi lavaggi con TBS-T, le membrane sono state incubate con il substrato chemiluminescente (Euroclone), per 5 minuti. Le membrane sono quindi state avvolte con pellicola trasparente e messe a contatto per 1-10 minuti con

una lastra fotografica (Kodak Biomax XAR film) che è stata poi sviluppata in camera oscura.

2.10. Test di vitalità cellulare (MTT)

Il saggio dell'MTT (Sigma-Aldrich M5655) è stato utilizzato per valutare la vitalità cellulare in seguito a trattamento con vari stimoli. La sigla MTT indica il composto 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide - thiazolyl blue, un sale di tetrazolio solubile in acqua che viene convertito dalle deidrogenasi mitocondriali in un sale insolubile chiamato formazano. Tali sali sono solubilizzati utilizzando isopropanolo o DMSO (99.5%) e successivamente misurati spettrofotometricamente valutando l'assorbanza come funzione della concentrazione di colorante convertito. Solo le deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali possono determinare la conversione tetrazolio – formazano quindi maggiore sarà il valore dell'assorbanza, maggiore sarà il numero di cellule vitali.

Per svolgere i nostri esperimenti abbiamo dissolto l'MTT in RPMI-1640 senza rosso fenolo, alla concentrazione 1 mg/ml, e filtrato con un filtro con pori da 0,2 µm. I test di vitalità sono stati effettuati trattando le cellule con: (i) Sodio Arsenite, (ii) Sodio Arsenite + VGF peptidi (iii) solo VGF peptidi utilizzando come controllo cellule non trattate. L'assorbanza è stata letta alla lunghezza d'onda di 570 nm utilizzando l'EnVison (Perkin Elmer).

Analisi statistica

Per ogni saggio o test utilizzato i dati sono stati analizzati mediante test ANOVA (one-way), seguiti da t-test utilizzando il software StatistiXL, i valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

2.11. FLUO-4

Il FLUO-4 è un avanzato indicatore fluorescente utilizzato per la misurazione del calcio intracellulare. Il kit Fluo-4 NW Calcium Assay (Invitrogen F36206) da noi utilizzato è costituito da tre componenti:

- Fluo-4 NW Dye Mix (componente A)
- Probenecid solubile in acqua (componente B) (inibitore di trasportatori anionici di membrana che tendono a eliminare il colorante all'esterno della cellula)
- Assay Buffer (HBSS 1X, HEPES 20mM; component C)

Per la ricostituzione del colorante è necessario aggiungere 10 mL dell'Assay Buffer (componente C) nella boccetta del Fluo-4 (componente A) più 100 µL di probenecid (componente B), preventivamente disciolto in 1 mL di Assay Buffer (componente C). Per eseguire il test abbiamo seguito le istruzioni fornite dal kit per la cellula in adesione:

- Rimosso il terreno di coltura dai pozzetti e lavati con PBS 1X
- Aggiunto 100 µL di Fluo-4 in ciascun pozzetto nelle piastre da 96 o 25 µL nelle piastre da 384 pozzetti
- incubato per 30 minuti a 37°C
- Dopo l'incubazione, senza rimuovere il colorante dai pozzetti, è possibile procedere all'esperimento con le sostanze da testare che andranno disciolte nell'assay buffer fornito dal kit (HBSS e HEPES, componente C).
- Misurato la fluorescenza utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione a 494 nm e una di emissione a 516 nm.

Per i nostri esperimenti le cellule sono state seminate in piastre multipozzetto da 96 pozzetti alla concentrazione di circa 10.000 cell/mL su piastre pretrattate con polilisina e gelatina per 5 minuti. Il giorno successivo alla semina abbiamo lavato con PBS 1X e messo in ciascun pozzetto 100 µL di Fluo-4 ricostituito come da protocollo.

Dopo 30 minuti di incubazione a 37°C le piastre sono state trasferite nell'EnVision per i test con alcuni dei nostri peptidi alle concentrazioni di 1, 10 e 100 nmol/mL. Come controllo positivo è stata utilizzata la ionomicina, un ionoforo prodotto dal batterio *Streptomyces conglobatus* che innalza i livelli di Ca²⁺ intracellulare favorendone il trasporto attraverso le membrane cellulari. L'aumento di Ca²⁺ intracellulare determinerà la conversione del colorante da molecola incolore a molecola fluorescente causando un picco rilevabile strumentalmente.

2.12. EnVision

L'EnVision è un lettore di piastre multi pozzetto (fino a 1536 pozzetti), che permette di effettuare letture con numerose tecnologie:

- Assorbanza (240-950 nm)
- Time-resolved fluorescence (TRF) (240-850 nm)
- Intensità di fluorescenza (240-850 nm)
- Fluorescenza polarizzata (450-750 nm)
- Luminescenza
- AlphaScreen (520-620 nm)
- DELFIA
- LANCE

Le tecnologie da noi utilizzate per i test sono state ASSORBANZA (MTT e Pierce-BCA) e FLUORESCENZA (FLUO-4) in entrambi i casi abbiamo creato degli appositi protocolli di lettura utilizzando per le letture in fluorescenza filtri di eccitazione e di emissione appositamente creati per noi dalla Kodak con dei range di lunghezze d'onda specifici. L'assorbanza è stata utilizzata per la misurazione delle proteine mediante il test Pierce-BCA (562 nm) e la valutazione della vitalità cellulare mediante l'MTT (570 nm), la fluorescenza per il Fluo-4. Inoltre per questo test abbiamo utilizzato il dispensatore a due canali in dotazione con lo strumento che ci ha permesso di dispensare le corrette quantità di peptidi direttamente nei pozzetti da testare per leggere in automatico le possibili variazioni di flussi di Ca^{2+}

2.13. Colture primarie di fibroblasti umani

Colture primarie di fibroblasti umani sono state prelevate dalla cute della medesima zona del braccio di individui e provengono da prelievi di cute di:

- Malati SLA con mutazione TARBDP^{A382T} n=2
- Malati SLA senza mutazioni conosciute n=2
(wild type per SOD-1, C9orf72 e FUS)
- Controlli sani n=3

Tali colture sono state allestite dal Dott. Sandro Orrù, della Sezione di Genetica Medica del Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università di Cagliari e donate al nostro laboratorio per le ricerche in questione.

Sono stati coltivati in DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium – 4500 mg/l di glucosio, Sigma) al quale sono stati aggiunti: siero di bovino fetale (10%), L-glutammina (1%); antibiotici penicillina e streptomina (1%) e mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera controllata di CO₂ al 5%. Per svolgere i diversi esperimenti le cellule vengono staccate dalla piastra petri mediante l'utilizzo di tripsina per 3 minuti in incubatore, inattivata in seguito con medium di coltura completo. Le cellule sono state seminate 30.000 cell/ml nei medesimi supporti utilizzati per la semina delle NSC-34 senza l'utilizzo di polilisina e gelatina. I Fibroblasti sono stati utilizzati in immunocitochimica ed ELISA con i medesimi protocolli descritti nei paragrafi precedenti per le NSC-34.

3. SCOPO DEL LAVORO

I risultati fino ad oggi ottenuti circa la localizzazione e la modulazione di VGF indicano che questa proteina ed i suoi peptidi sono probabilmente implicati in una varietà di processi fisiologici in molteplici sedi anche a livello del sistema nervoso centrale e periferico.

Gli studi precedenti che indicano un coinvolgimento di VGF nella SLA (Carrette et al., 2003; Pasinetti et al., 2006; Severini et al., 2008; Zhao et al., 2008) ci hanno portato ad investigare in maniera più approfondita gli aspetti che riguardano questa patologia e lo stress ossidativo ad essa associato. Inoltre, un aspetto rilevante per il presente lavoro è stata la dimostrazione dell'attività antiapoptotica dose dipendente di un VGF peptide (TLQP-21) su una sottopopolazione di cellule di granuli cerebellari in seguito alla condizione di stress data da privazione di siero e potassio (Severini et al., 2008). Poco ad oggi si sa del ruolo di VGF a livello moto neuronale e come i suoi peptidi possano essere coinvolti nella patogenesi della SLA.

Il progetto da me svolto si inserisce in un contesto più ampio che riguarda la modulazione di VGF peptidi nella sclerosi laterale amiotrofica dove abbiamo messo in evidenza una selettiva riduzione di taluni VGF peptidi in aree motoneuronali spinali in modelli murini di SLA come anche nel plasma umano di pazienti (Brancia, dati non pubblicati).

Sulla base di tali dati siamo andati a studiare più a fondo la distribuzione e la localizzazione di VGF peptidi nella linea cellulare motoneuronale NSC-34 con metodi immunostochimici ed utilizzando un'ampia gamma di anticorpi specifici prodotti nel nostro laboratorio contro ben selezionate regione della proteina VGF.

In parallelo sono stati messi a punto immunosaggi per un'analisi quantitativa di alcune regioni di VGF per identificare una possibile differente modulazione dei peptidi, in seguito allo stress ossidativo. Per caratterizzare aspetti di differente processazione in seguito a stress sono stati utilizzati metodi di separazione molecolare per poter identificare le forme molecolari in causa e le relative proporzioni. In relazione ai risultati ottenuti abbiamo voluto identificare un eventuale effetto neuro protettivo di VGF e dei suoi peptidi.

In parallelo a questo abbiamo lavorato su campioni umani di fibroblasti derivanti da soggetti malati di SLA, sembra infatti che specifiche mutazioni riscontrate nella SLA determinino alterazione cellulari in queste come anche in altri tipi cellulari che rispecchiano le caratteristiche di degenerazione che avvengono nei motoneuroni. Questo

rappresenta senza ombra di dubbio un modello semplice, affidabile ed innovativo per identificare e meglio studiare alterazione cellulari tipiche di alcune forme familiari di SLA aventi un alterato patrimonio genetico.

4. RISULTATI

Immunolocalizzazione di VGF peptidi in NSC-34 naive ed in seguito a stress ossidativo

Un primo gruppo di esperimenti è stato effettuato per individuare la presenza e la distribuzione di differenti VGF peptidi nella linea motoneuronale NSC-34 anche in seguito a stress ossidativo indotto da trattamento con la Sodio Arsenite (30 min.). Abbiamo utilizzato differenti anticorpi primari contro specifiche sequenze di VGF (materiali e metodi Tab. 1). La localizzazione di taluni VGF peptidi appariva selettiva in differenti zone citoplasmatiche (Tabella 2), i risultati sono riassunti nella tabella sottostante:

Peptidi	Cellule naive	Cellule con trattamento Na Arsenite 30min
N-termino	Coni di crescita	Coni di crescita
NERP-1	Perinucleare	Perinucleare
C-t “Carrette”	Coni di crescita	Coni di crescita
APGH	Perinucleare Coni di crescita	Paranucleare Coni di crescita
NAPPE	Perinucleare Coni di crescita	Paranucleare Coni di crescita
TLQP peptidi	Coni di crescita	Perinucleare
TLQP-21	Coni di crescita Citoplasmatica	Coni di crescita Citoplasmatica Paranucleare
C-termino	Perinucleare Coni di crescita Citoplasmatica	Paranucleare Coni di crescita Citoplasmatica

Tabella 2: localizzazione cellulare dei VGF peptidi prima e dopo il trattamento con Sodio Arsenite

Da un punto di vista puramente morfologico le cellule trattate con sodio arsenite risultano perdere la tipica morfologia neuronale per assumere una conformazione tondeggianti. Il trattamento di 30 minuti è stato quindi deciso per cercare di mantenere, il più possibile, la

morfologia neuronale, mentre il trattamento di 60 minuti è risultato, per l'immunocitochimica, eccessivamente aggressivo con una mortalità cellulare elevata.

Alcuni dei VGF peptidi testati sembrano mostrare una localizzazione perinucleare (NERP-1, APGH, NAPPE, C-termino) e in alcuni casi variamente citoplasmatica, mentre alcuni di essi mostrano brillante immunoreattività nei coni di crescita (N-termino, C-t "CARRETTE", APGH, NAPPE, TLQP peptidi, C-termino). In seguito allo stress ossidativo alcuni peptidi sembrano mostrare una localizzazione paranucleare mentre solo alcuni mantengono una localizzazione nei coni di crescita ancora presenti. I frammenti TLQP sembrano cambiare totalmente la loro localizzazione mostrando immunoreattività a livello dei coni di crescita prima del trattamento e nella zona paranucleare in seguito allo stress ossidativo (Fig.3).

Con l'anticorpo anti-HuR I abbiamo valutato l'eventuale formazione dei granuli da stress che attestano l'azione dello stress ossidativo sulle cellule: nelle NSC-34 la sodio arsenite forma pochi granuli da stress molto grandi ed evidenti nel citoplasma, che non sono invece presenti nelle cellule non trattate con la Sodio Arsenite dove si può evidenziare una colorazione solo a livello nucleare (Fig.4).

Doppie immunocolorazioni sono state effettuate per identificare una possibile localizzazione di proVGF e/o dei suoi peptidi nei granuli da stress, selettivamente marcati con l'anticorpo anti-HuR I. VGF non sembra traslocare nei granuli in seguito a stress ossidativo e da una prima analisi morfologica non sembra direttamente coinvolto in questo processo (Fig.5).

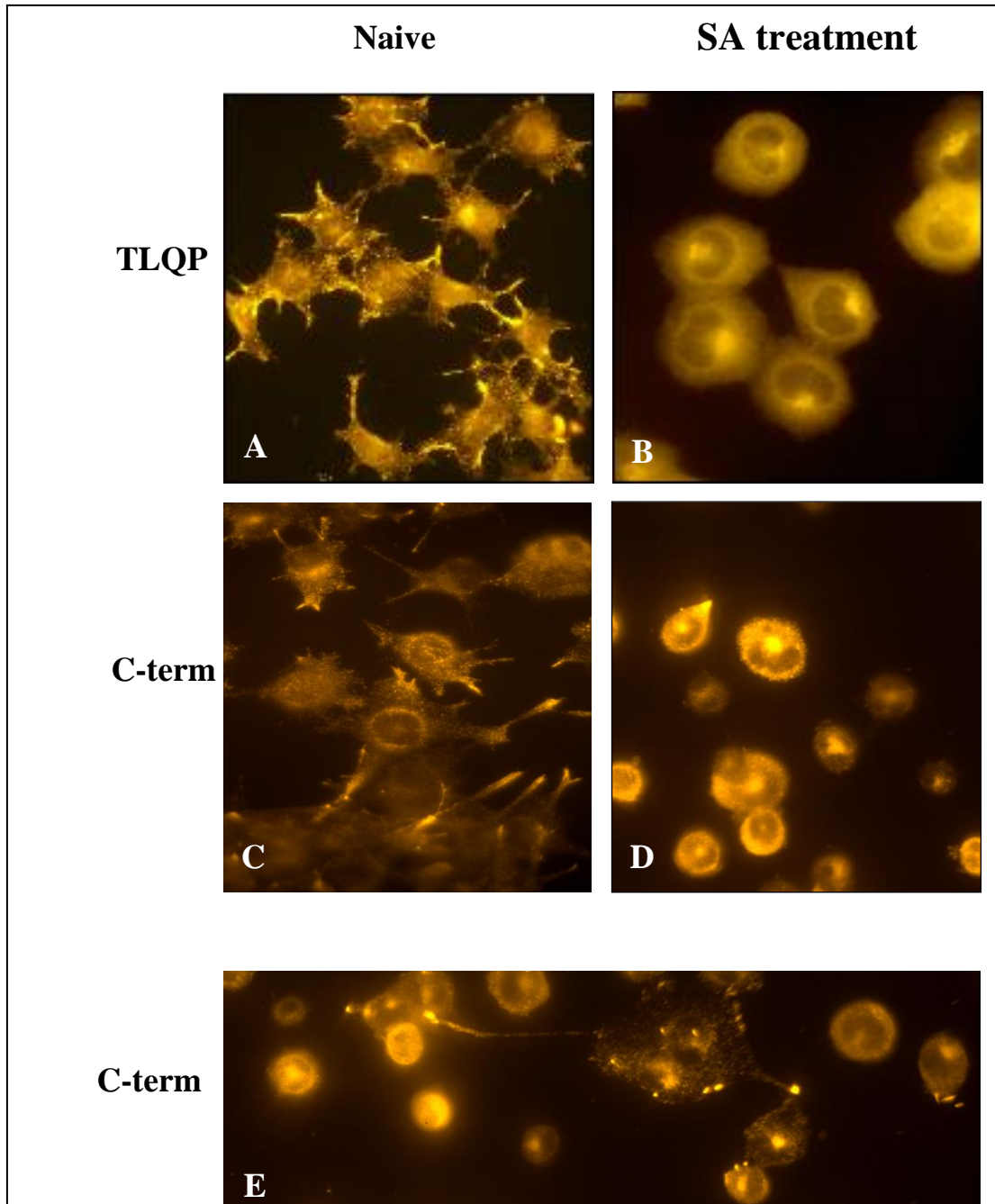


Fig. 3: Localizzazione cellulare dei VGF peptidi prima e dopo il trattamento con la Sodio Arsenite

A: TLQP nei coni di crescita e nel citoplasma

B: TLQP post trattamento prevalentemente nella zona paranucleare

C: VGF C-termino nei coni di crescita, nel citoplasma e nella zona perinucleare

D: VGF C-termino post trattamento nella zona paranucleare e nel citoplasma

E: particolare del VGF C-termino che mostra la localizzazione nei coni di crescita in un'unica cellula che ha mantenuto la morfologia post trattamento

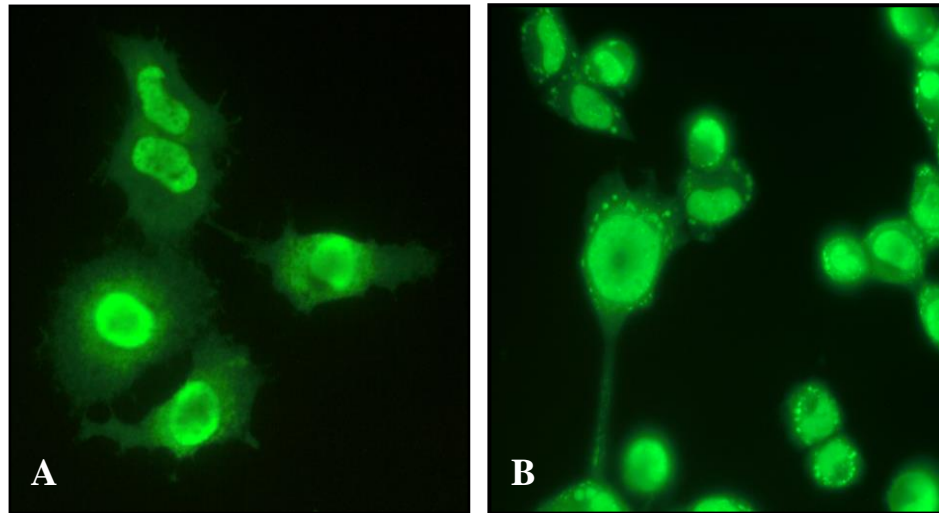


Fig. 4: Localizzazione della RNA binding protein HuR I in cellule naive trattate con sodio arsenite
 A: HuR I localizzato nel nucleo delle cellule naive
 B: cellule trattate con sodio arsenite, HuR I va a localizzarsi anche nei granuli da stress

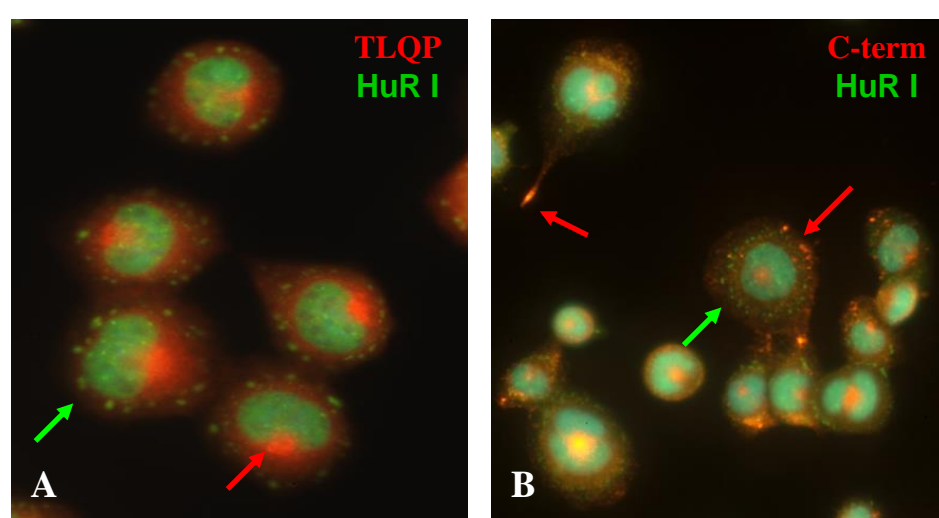


Fig. 5: VGF e i suoi peptidi non sono inclusi nei granuli da stress, come mostrato per i peptidi TLQP (A) e VGF C-term (B)

Modulazione di VGF peptidi e loro caratterizzazione molecolare

Per quantificare i differenti VGF peptidi e la loro modulazione in seguito a stress ossidativo abbiamo effettuato saggi ELISA di selettivi VGF peptidi sui nostri estratti cellulari di NSC-34. La scelta dei saggi da effettuare è stata fatta seguendo tre differenti criteri (I) peptidi di VGF che hanno manifestato una brillante e selettiva immunolocalizzazione in ICC, (II) peptidi citati in letteratura e aventi un effetto neuroprotettivo/antiapoptotico (Severini et al., 2008), (III) frammenti di VGF già visti implicati nella SLA (Zaho et al., 2008). I risultati sono riassunti nella fig.6.

Un primo aspetto interessante riguarda la concentrazione dei VGF peptidi in NSC-34 non trattate: il TLQP-21 mostra infatti una concentrazione da 5 a 200 volte superiore rispetto a tutti gli altri peptidi testati per μg di proteine totali rilevate (Fig.7). In seguito a stress ossidativo vediamo una differente modulazione di questi peptidi con aumento dei frammenti C-ed N terminali; tale aumento appare significativo solo per quest'ultimo frammento (~360% di aumento, $p \leq 0.01$). Di contro peptidi NERP-1 e TLQP-21 hanno manifestato una significativa riduzione (~65% di riduzione, $p \leq 0.007$ e ~58% di riduzione, $p \leq 0.0000031$) mentre, per APGH e NAPPE la riduzione di concentrazione risultava lieve e non significativa.

Altro aspetto considerato è stata la modulazione dei VGF peptidi prima e dopo lo stress nel medium di coltura per valutare il rilascio di tali peptidi in seguito a stimolo selettivo. Nel mezzo di coltura abbiamo rilevato un aumento significativo del peptide N-terminale (~50% di aumento, $p \leq 0.007$), con lieve aumento di NERP-1 e TLQP-21, mentre una riduzione significativa è stata rilevata solo per il NAPPE (~60% di riduzione, $p \leq 0.0003$) (Fig.8). La concentrazione dei peptidi C-terminali nel medium non appariva rilevabile perché al di sotto del valore soglia specifico per questo specifico saggio.

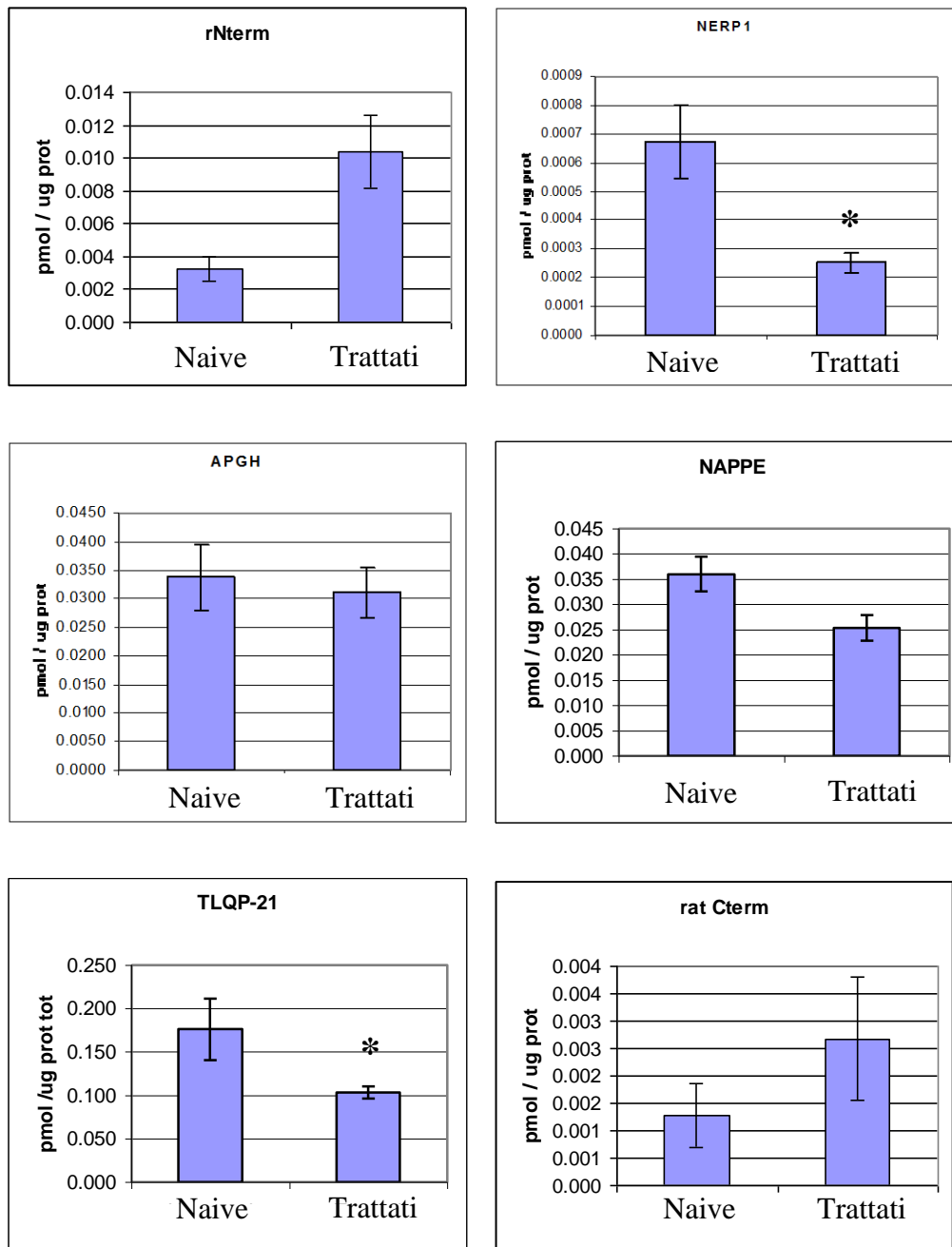


Fig. 6: Concentrazione di VGFp nell'estratto cellulare
 Differente modulazione di VGF peptidi in cellule naive ed in seguito al trattamento con Sodio Arsenite. Due differenti peptidi risultano significativamente ridotti: NERP-1 e TLQP-21 (rispettivamente $p \leq 0.007$ e $p \leq 0.0000031$)

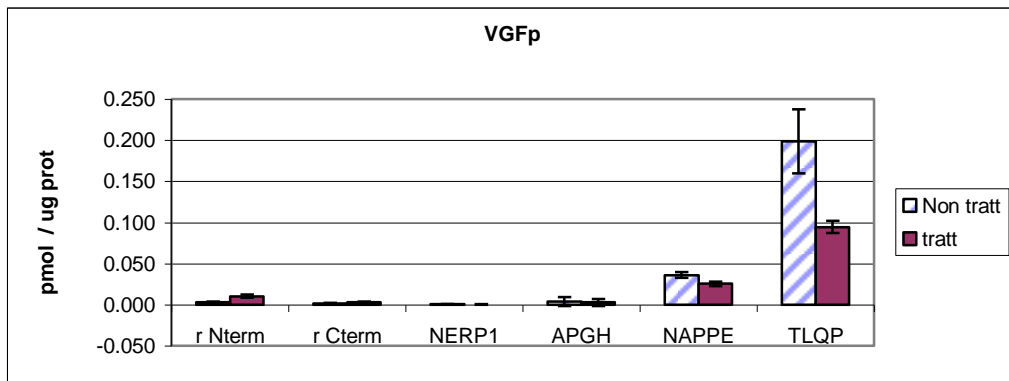


Fig. 7: Concentrazione di TLQP-21 da 5 a 200 volte superiore rispetto agli altri VGF peptidi evidenziato nell'estratto cellulare

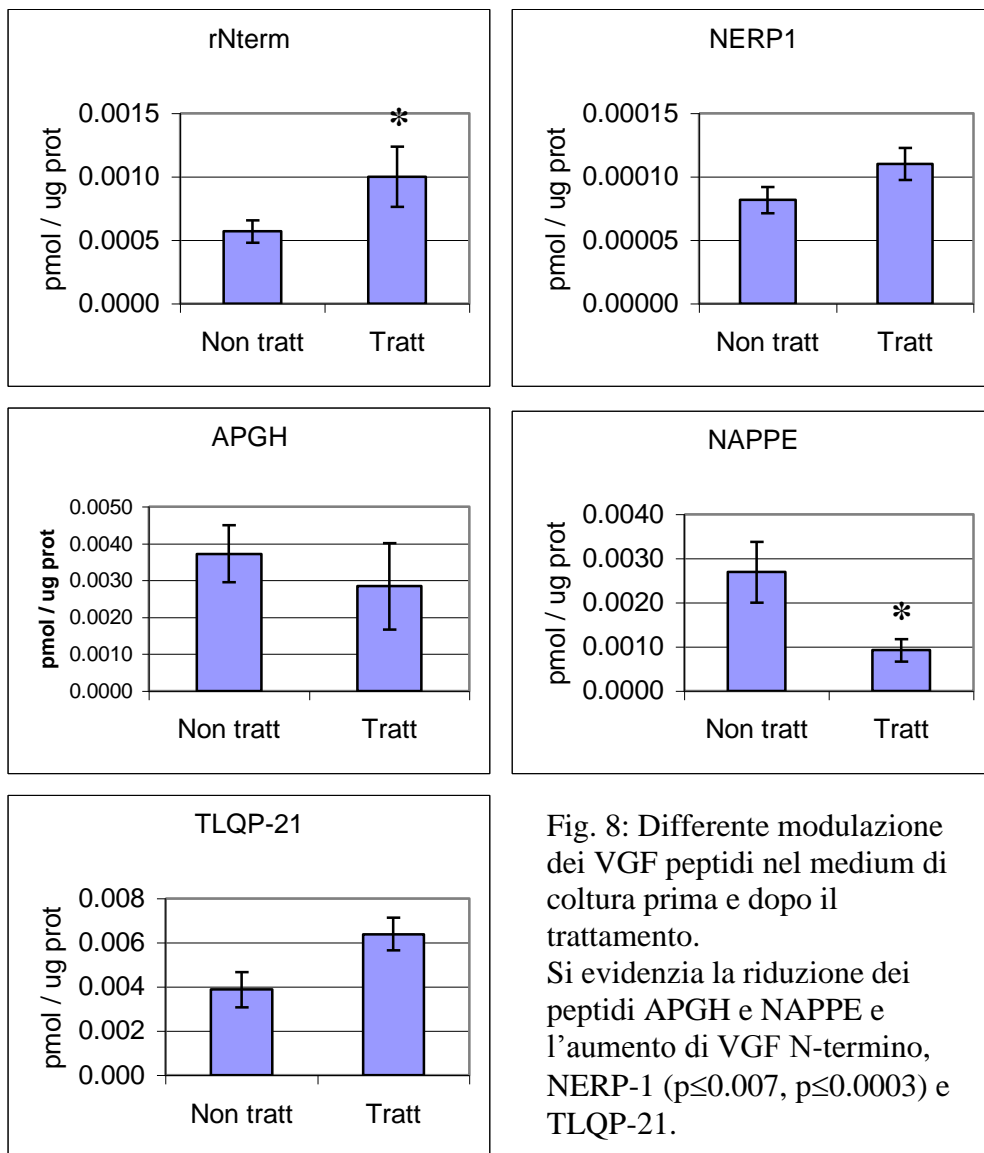
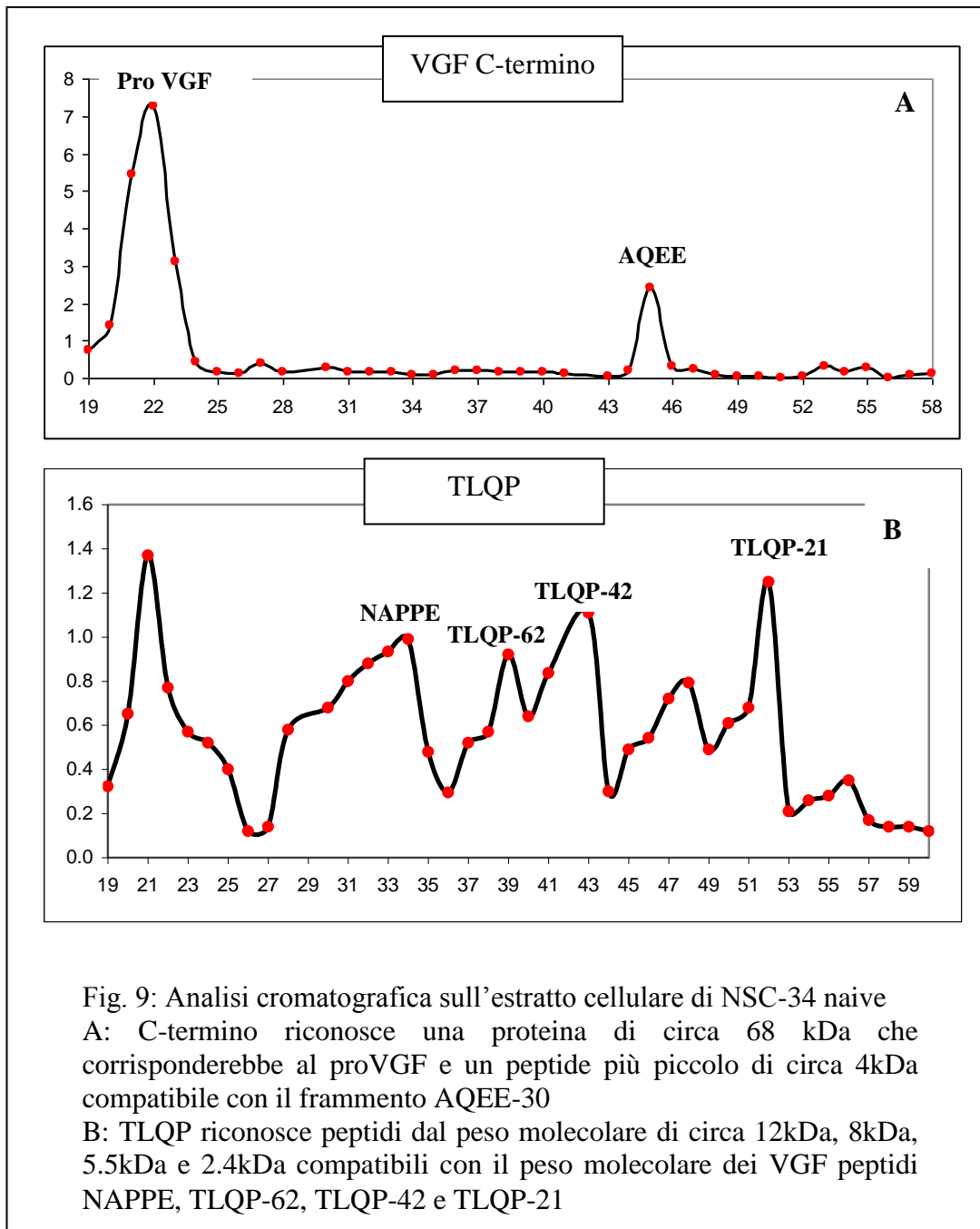


Fig. 8: Differente modulazione dei VGF peptidi nel medium di coltura prima e dopo il trattamento. Si evidenzia la riduzione dei peptidi APGH e NAPPE e l'aumento di VGF N-termino, NERP-1 ($p \leq 0.007$, $p \leq 0.0003$) e TLQP-21.

La cromatografia eseguita sugli estratti cellulari ha consentito di identificare le differenti forme molecolari presenti grazie ad una separazione molecolare in Sephadex G50 superfine e successivo test ELISA delle frazioni ottenute. Per quanto riguarda il C-termino di VGF (Fig.9A) è possibile osservare la presenza di poche forme molecolari nell'estratto cellulare; in particolare una forma ad alto peso molecolare di circa 70kDa compatibile con l'intero precursore pro-VGF e un frammento di circa 4kDa che potrebbe corrispondere al peptide AQEE-30 che sembra essere la forma più rilevante. Per quanto riguarda i TLQP-peptidi (Fig.9B), si possono osservare le alte concentrazioni riscontrate di una varietà di forme molecolari che suggeriscono come tali peptidi siano ben rappresentati nell'estratto in esame. Analizzando i picchi in esame si può notare la presenza di una forma molecolare di circa 70kDa compatibile con il precursore pro-VGF e di altri quattro frammenti di circa 12kDa, 8kDa, 5.5kDa e 2.4kDa che potrebbero corrispondere rispettivamente al NAPPE, al TLQP-62, al TLQP-42 e infine al TLQP-21.

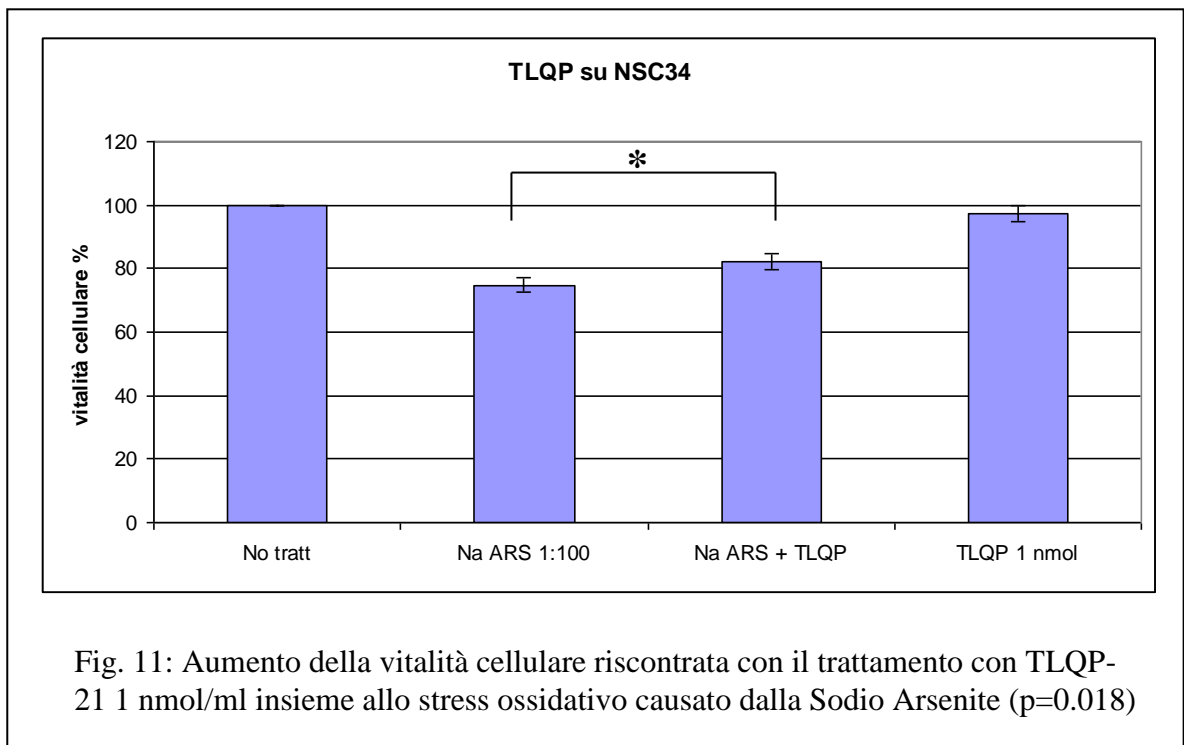
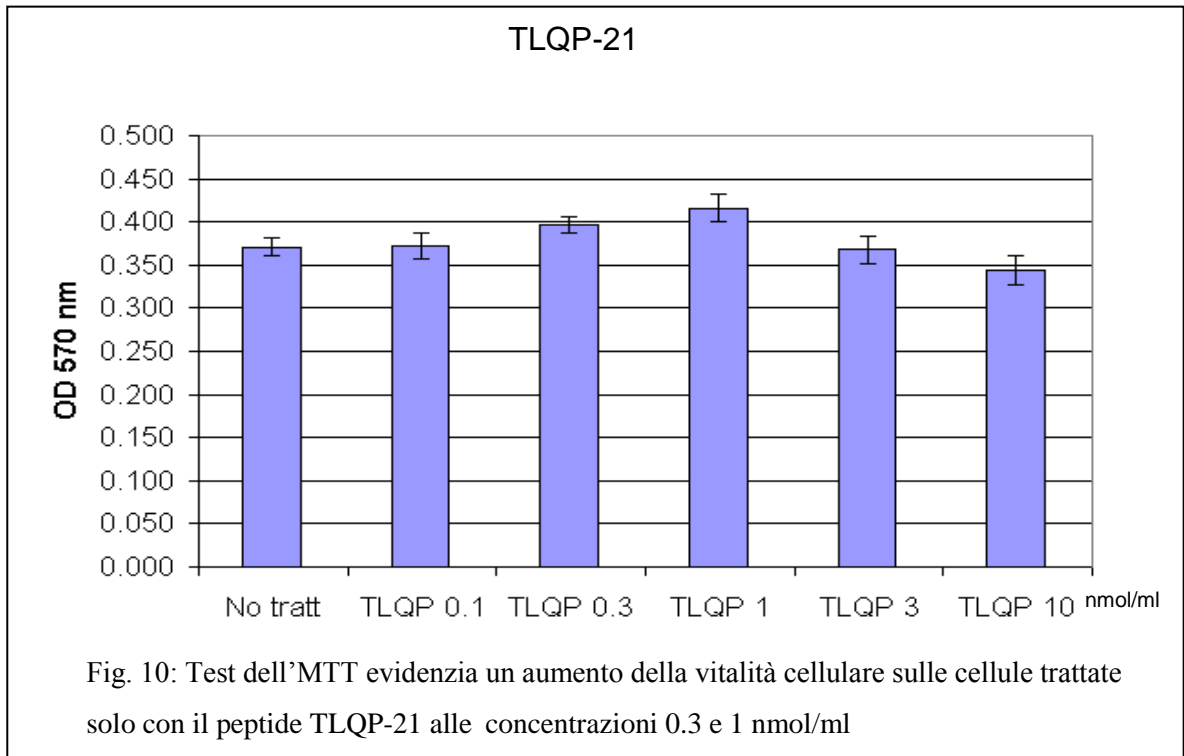


Test di vitalità cellulare: MTT

Partendo dai dati ottenuti nei saggi l'ELISA abbiamo selezionato i peptidi TLQP-21 e il NERP-1 che mostravano riduzione significativa nelle NSC-34 in seguito a stress ossidativo, per valutare un loro possibile effetto neuroprotettivo. Per far questo abbiamo utilizzato il test di vitalità MTT. Prima di procedere ai test di vitalità con i due peptidi scelti abbiamo effettuato alcune prove di vitalità cellulare con l'acido trifluoroacetico (TFA), acido utilizzato nella purificazione dei nostri peptidi, che potrebbe legarsi ai residui NH₂ degli amminoacidi. L'acido infatti, avrebbe potuto interferire con il test di vitalità e/o avere un effetto tossico sulle nostre cellule.

I test di vitalità hanno dimostrato che l'acido trifluoroacetico non determina alcuna alterazione sulla vitalità cellulare che è rimasta invariata rispetto ai controlli, nonostante le concentrazioni elevate (dati non mostrati).

Partendo dai dati forniti da Severini e collaboratori (2008), secondo i quali il TLQP-21 riduceva la morte cellulare per apoptosi indotta dalla privazione di siero e potassio, già alla concentrazione di 1 nmol/ml, abbiamo testato le medesime concentrazioni sul nostro modello cellulare. Primi esperimenti pilota sono stati effettuati su cellule non trattate per valutare l'attività del nostro peptide in condizioni basali. Le prove con il TLQP-21 su cellule senza stress ossidativo, sono state effettuate a differenti concentrazioni (0.1, 0.3, 1, 3 e 10 nmol/ml), di cui quelle a 0.3 e 1 nmol/ml hanno determinato un lieve aumento della vitalità (Fig.10). Basandoci su questi dati abbiamo quindi deciso di utilizzare la concentrazione di TLQP-21 1 nmol/ml sulle cellule trattate con Sodio Arsenite. I risultati di otto test hanno dimostrato l'azione protettiva del TLQP-21 1 nmol/ml sulle cellule trattate con Sodio Arsenite per un'ora (solo Sodio Arsenite 74.7%, Sodio Arsenite +TLQP-21 82.1%, $p \leq 0.018$) (Fig.11). Il peptide NERP-1 invece non ha mostrato alcuna variazione sulla vitalità delle cellule in seguito allo stress ossidativo (Fig.12).



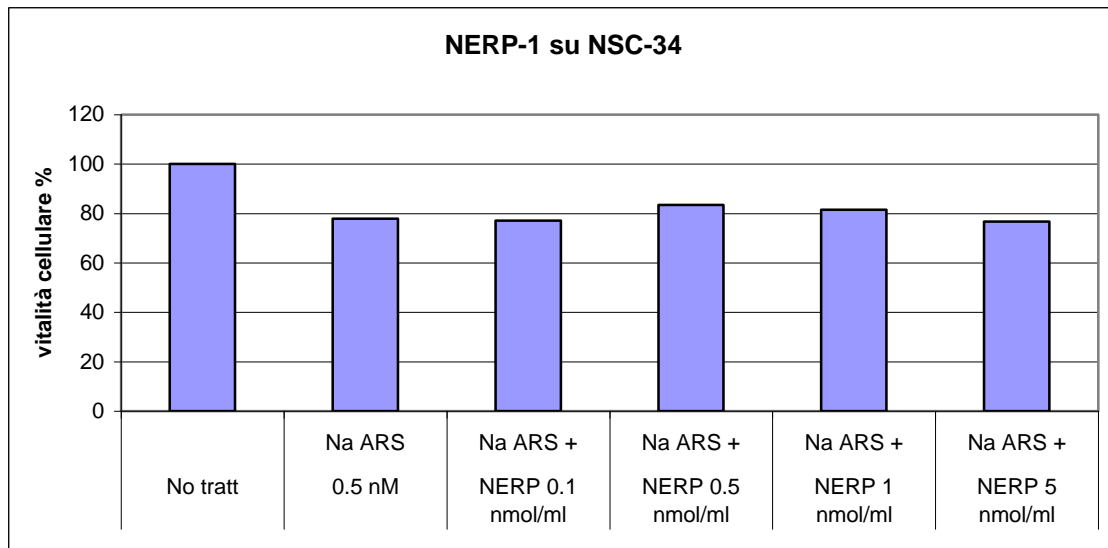
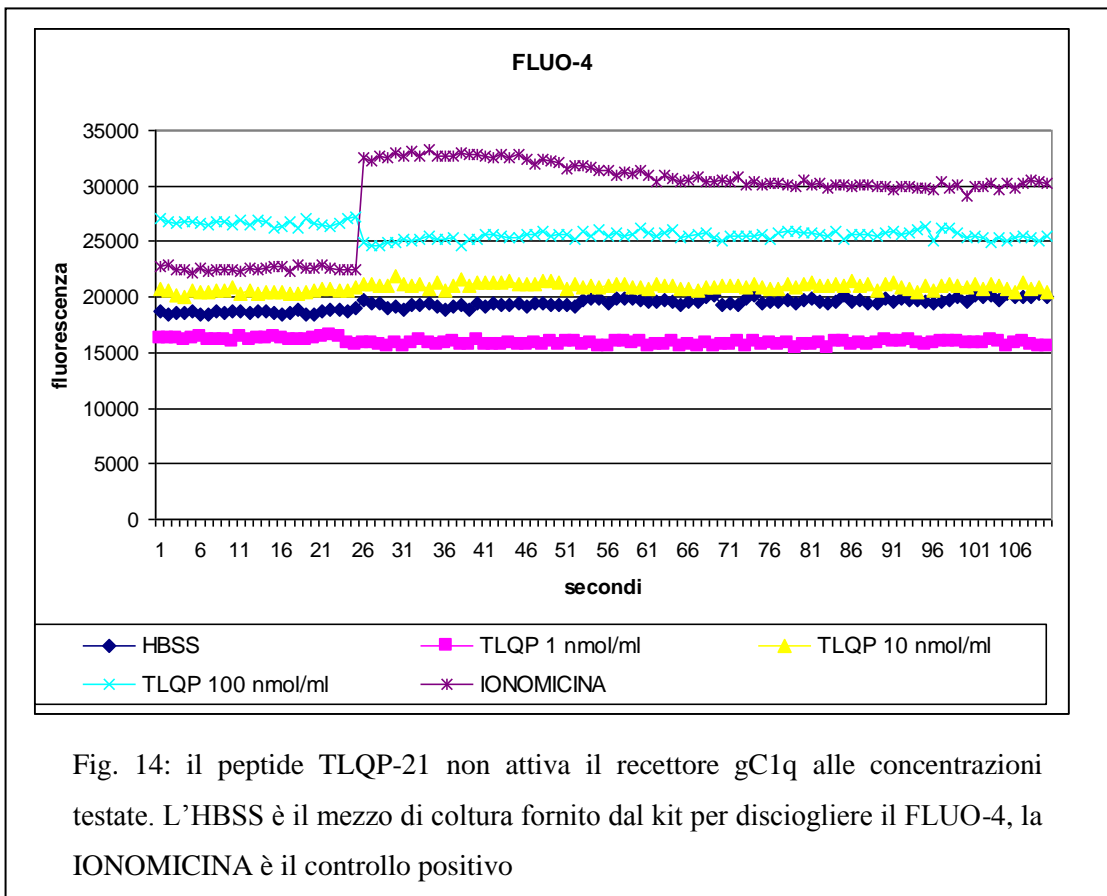
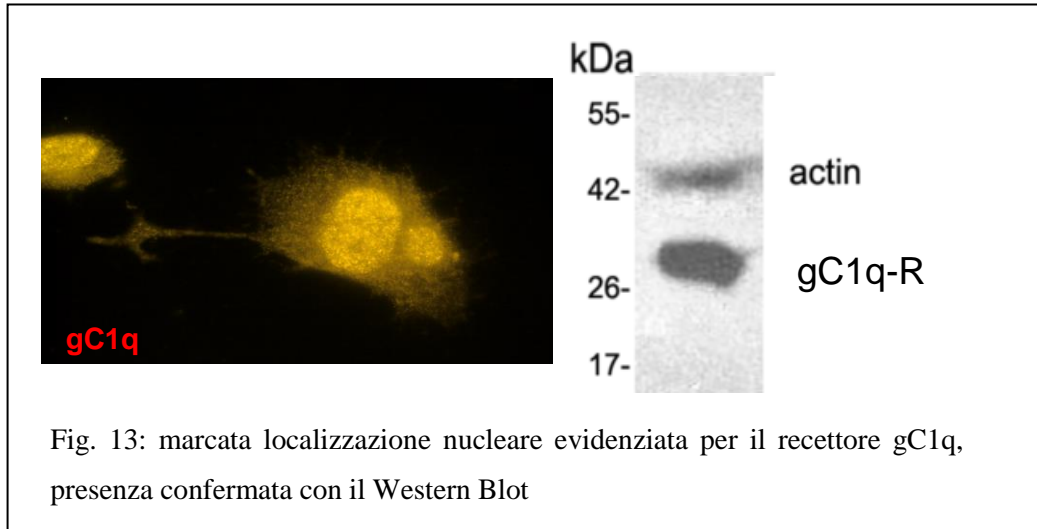


Fig. 12: Il peptide NERP-1 non mostra alcun incremento della vitalità cellulare insieme al trattamento con la Sodio Arsenite

Immunolocalizzazione e attivazione recettoriale

In relazione ai dati ottenuti e data la recentissima scoperta dei due recettori attivati dal legame con il TLQP-21 (Hannedouche et al., 2013; Chen et al., 2013) abbiamo voluto verificare la presenza dei due recettori nelle NSC-34 attraverso in analisi di immunocitochimica. I risultati mostrano una marcata ed evidente immunocolorazione per il recettore gC1q nella membrana nucleare e una minor reattività per il recettore C3a. I dati sono stati confermati mediante analisi in Western Blot nel quale è risultata evidente la presenza del recettore gC1q con una banda di circa 31kDa (Fig.13).

Abbiamo quindi voluto valutare la possibile attivazione di questi recettori da parte del TLQP-21 mettendo a punto il test del FLUO-4 per evidenziare l'aumento di calcio intracellulare in seguito al legame del recettore col suo ligando. Numerosi esperimenti sulla linea cellulare NSC-34, svolti sia nel nostro laboratorio col lettore di piastre EnVision che presso l'università di Valencia mediante citofluorimetro, sembrano dimostrare che il TLQP-21 non attivi nessuno dei due recettori (Fig.14).



Modulazione di VGF peptidi in Fibroblasti umani

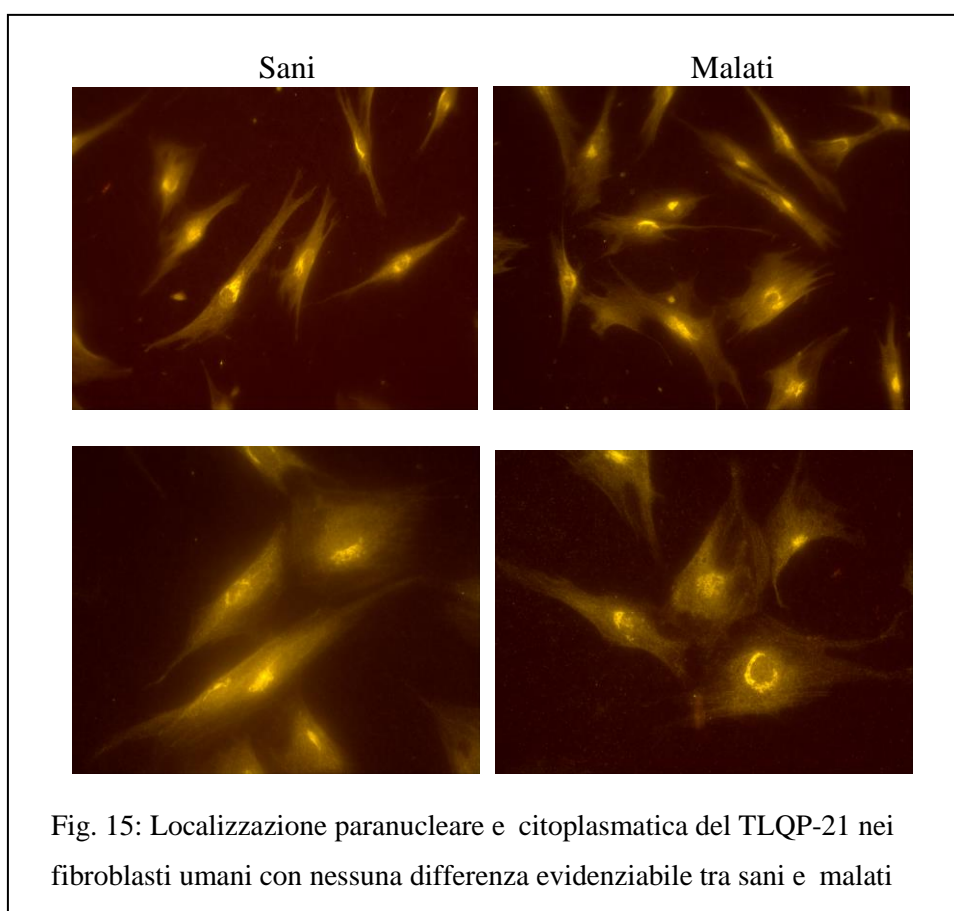
Nei fibroblasti umani immunoreattività per alcuni VGF peptidi è stata evidenziata nel citoplasma in una zona paranucleare morfologicamente riconducibile al sistema membranoso cellulare prevalentemente con il VGF C-termino, il TLQP-21, il NERP-1 e il VGF N-termino senza nessuna evidente differenza tra cellule di soggetti sani e malati (Fig.15).

Abbiamo quindi effettuato saggi ELISA su quattro diversi VGF peptidi sia sull'estratto cellulare che sul medium di coltura per identificare selettive modulazioni di VGF peptidi nei tre gruppi presi in considerazione (sani, malati con mutazione TARDBP e malati senza altre mutazioni conosciute). I dati sono stati analizzati anche considerando solo due gruppi (sani e malati) inserendo nel gruppo dei malati gli SLA con mutazione TARDBP e quelli senza mutazioni conosciute.

I peptidi testati, VGF N-termino, il NERP-1, il TLQP-21 e il VGF C-termino, hanno manifestato una riduzione in entrambi i gruppi SLA rispetto al gruppo di controllo, con alcune differenze: i peptidi VGF N-termino e NERP-1 sono risultati significativamente ridotti sia nel gruppo SLA con mutazione TARDBP (~30% di riduzione, $p \leq 0.05$ e ~61% di riduzione, $p \leq 0.0007$) sia nel gruppo SLA senza altre mutazioni conosciute (~37% di riduzione, $p \leq 0.01$ e ~62% di riduzione, $p \leq 0.0004$), il peptide TLQP-21 è ridotto in entrambi i gruppi ma il dato ha rilevanza solo per il gruppo SLA senza mutazioni conosciute (~37% di riduzione, $p \leq 0.042$) e infine il peptide VGF C-termino è sempre risultato ridotto per entrambi i gruppi ma significativo solo per i campioni SLA con mutazione TARDBP (~62% di riduzione, $p \leq 0.038$) (Fig.16 A,B,C,D). Analizzando insieme i dati relativi a questi ultimi due peptidi (TLQP-21 e VGF C-termino) riguardo ai pazienti SLA (mutazione TARDBP + senza altre mutazioni conosciute) la riduzione risulta significativa per entrambi i peptidi (TLQP ~30% di riduzione, $p \leq 0.031$; C-termino ~50% di riduzione, $p \leq 0.018$) (Fig.16 E).

Nel medium di coltura abbiamo riscontrato le seguenti variazioni: i peptidi TLQP-21 e VGF C-termino non manifestano differenze per il medium delle cellule con mutazione TARDBP rispetto ai controlli, mentre i due peptidi sono risultati significativamente ridotti nel medium delle cellule di pazienti SLA senza mutazioni conosciute (rispettivamente

~30% di riduzione, $p \leq 0.026$; ~30% di riduzione, $p \leq 0.022$). Il peptide VGF N-termino è risultato ridotto in entrambi i gruppi relativi ai malati ma con una significativa riduzione solo per il medium delle cellule con mutazione TARDBP (~30% di riduzione, $p \leq 0.023$). Il peptide NERP-1, invece, mostra un incremento della concentrazione di questo peptide nel medium delle cellule con mutazione TARDBP e una riduzione per il medium delle cellule SLA senza mutazioni conosciute, non significativo in entrambi i casi (Fig.17).



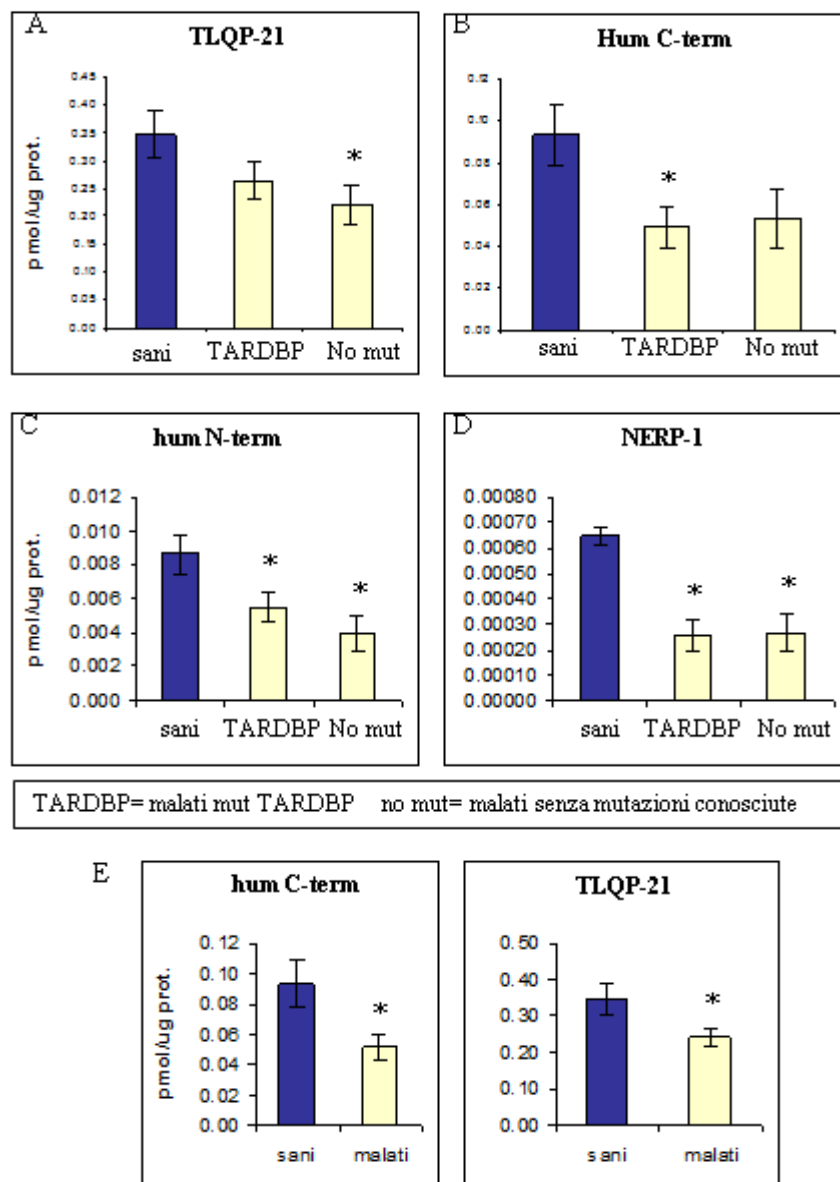


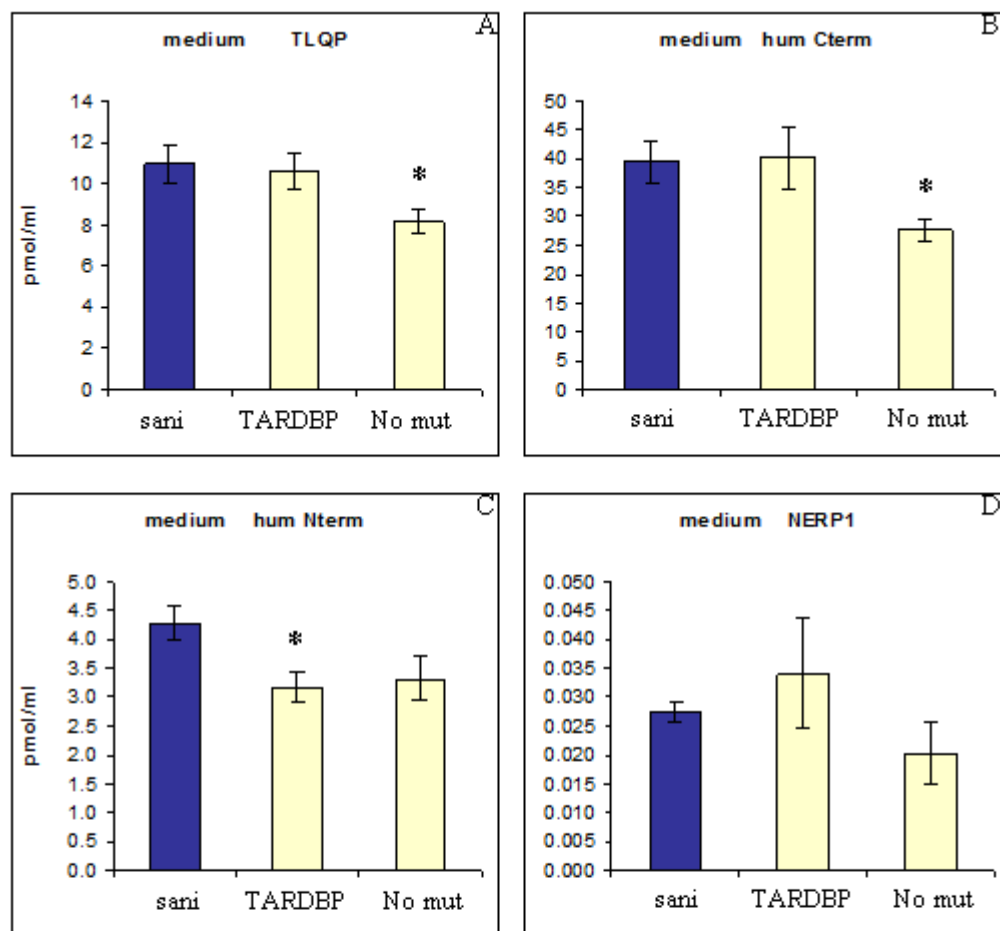
Fig. 16: Differente modulazione di VGF peptidi nei fibroblasti umani sani e malati

A: TLQP significativamente ridotto solo nei malati senza altre mutazioni conosciute ($p \leq 0.042$)

B: VGF C-termino significativamente ridotto nei malati senza altre mutazioni conosciute ($p \leq 0.038$)

C e D: VGF N-termino e NERP-1 significativamente ridotti in entrambi i gruppi di fibroblasti malati (rispettivamente N-term $p \leq 0.05$ e $p \leq 0.01$; NERP-1 $p \leq 0.0007$ e $p \leq 0.0004$)

E: Analizzando insieme i dati relativi ai malati TARDBP e quelli senza altre mutazioni conosciute il TLQP-21 e il VGF C-termino risultano significativamente ridotti nei fibroblasti malati rispetto a quelli sani ($p \leq 0.031$ e $p \leq 0.018$)



TARDBP= malati mut TARDBP no mut= malati senza mutazioni conosciute

Fig.17: Differente modulazione dei VGF peptidi nel medium di coltura delle cellule di pazienti sani e i due gruppi di malati

A e B: TLQP-21 e VGF C-termino significativamente ridotto solo nel medium delle cellule senza mutazioni conosciute (rispettivamente $p \leq 0.026$ e $p \leq 0.022$)

C: VGF N-termino significativamente ridotto solo nel gruppo con mutazione TARDBP ($p \leq 0.023$)

5. Discussione

I nostri risultati mostrano come VGF ed i suoi peptidi siano variamente localizzati e modulati in motoneuroni (NSC-34) in seguito a stress ossidativo, come anche in un modello cellulare di SLA. Inoltre un frammento chiamato TLQP-21 trovato ridotto in entrambi i modelli cellulari è stato somministrato in seguito allo stress ossidativo e sembra aumentare la vitalità dei motoneuroni.

I dati della letteratura ci dicono che VGF e i suoi peptidi sono coinvolti in numerosi processi biologici riguardanti il sistema nervoso, tra questi il danno neuronale (Severini et al., 2008) e il potenziamento sinaptico (Bozdagi et al., 2008), come anche il suo coinvolgimento è stato visto in malattie psichiatriche e neurodegenerative (Huang et al., 2006; Carrette et al., 2003; Selle et al., 2005; Pasinetti et al., 2006; Ruetschi et al., 2005).

La dimostrazione che l'iperpressione di un costrutto di VGF full-length in neuroni spinali determina riduzione del danno eccitotossico (Zhao et al., 2008) e che VGF sembra mediare l'azione neuroprotettiva in seguito a stress del reticolo endoplasmatico fondamentale nella patogenesi della SLA (Shimazawa et al., 2010), suggeriscono un possibile coinvolgimento di VGF nel corretto funzionamento neuronale e una sua attività neuroprotettiva.

Abbiamo voluto quindi approfondire le modulazioni di VGF peptidi nello stress ossidativo in relazione ad alterazioni cellulari nella SLA, mediante l'utilizzo di due differenti modelli cellulari: un modello motoneuronale (NSC-34) a cui abbiamo indotto uno stress ossidativo e colture primarie di fibroblasti umani da malati SLA. Differenti anticorpi primari, prodotti nel nostro laboratorio, contro specifiche sequenze di proVGF peptidi sono stati utilizzati per evidenziare la localizzazione di tali peptidi in neuroni immortalizzati (NSC-34), anche in seguito a stress ossidativo indotto da sodio arsenite, e il loro eventuale coinvolgimento nella formazione dei granuli da stress. I dati rilevati mediante l'ICC hanno messo in evidenza la presenza di diversi VGF peptidi e la loro differente localizzazione in seguito allo stress. Alcuni VGF peptidi come i TLQP peptidi perdevano la loro localizzazione a livello dei coni di crescita per localizzarsi a livello paranucleare riconducibile verosimilmente a zone selettive del sistema membranoso cellulare. Questa differente localizzazione potrebbe essere spiegata con un'alterata formazione delle strutture

citoscheletriche in seguito allo stress ossidativo già riscontrato in differenti modelli cellulari (Huang et al., 2015) e che potrebbe determinare non solo un'alterazione morfologica cellulare, come visto nei nostri risultati, ma anche un modificazione nel trasporto assonale con possibile accumulo di peptidi in altre sedi.

L'identificazione dei granuli da stress in cellule trattate ci ha permesso di verificare che i peptidi di VGF non vengono inglobati in essi e quindi non sembrano direttamente coinvolti nella loro formazione; ulteriori analisi potrebbero invece approfondire un ipotetico ruolo indiretto nella regolazione e formazione di tali granuli come già visto per altre proteine (Tourriere et al, 2003; Kwon et al., 2007).

La differente modulazione di VGF peptidi riscontrata mediante saggi ELISA negli estratti cellulari e nel medium di coltura pre e post trattamento, ci impone alcune considerazioni. Peptidi VGF C-terminali come anche quelli N-terminali in cellule non trattate sono presenti in basse concentrazione, l'analisi cromatografica almeno per il frammento C-terminale sembra confermare il riconoscimento di forme molecolari di elevato peso molecolare riconducibili al precursore. Questo potrebbe indicare un veloce processamento del precursore stesso per formare frammenti di più basso peso molecolare a conferma della processazione di proVGF già osservata in strutture neuronali (Trani et al., 1995); tra questi il frammento AQEE-30, riconosciuto in cromatografia con il C-termino, agisce sulla regolazione della plasticità sinaptica suggerendo un ruolo fisiologico per VGF nella modulazione neuronale (Alder et al., 2003).

Inoltre i risultati ottenuti confermano la presenza di vari prodotti di clivaggio del precursore con un'elevata concentrazione di peptidi TLQP-21 (da 5 a 200 volte superiore agli altri peptidi) che porterebbe a pensare che la proteina proVGF venga clivata per la maggior parte nelle forme riconosciute da questo anticorpo.

In cromatografia infatti il TLQP sembra riconoscere frammenti di differenti forme molecolari (12kDa, 8kDa, 5.5kDa e 2.4kDa) riconducibile a peptidi di conosciuta attività biologica come il NAPPE implicato del diabete di tipo 2 e nell'obesità (D'Amato et al., 2015), il TLQP-62 implicato nel potenziamento elettrico neuronale, nella secrezione di BDNF e nell'attività sinaptica (Bozdagi et al., 2008; Alder et al.,2003), e il TLQP-21 con attività antiapoptotica (Severini et al., 2008). In cellule trattate con Sodio Arsenite per contro abbiamo un aumento della concentrazione di VGF N-termino e C-termino e una

riduzione degli altri peptidi esaminati rispetto ai controlli. Questi dati ci portano a supporre che durante lo stress ossidativo possa avvenire una minor processazione del precursore, tali dati sembrano infatti confermati da una riduzione significativa dei peptidi NERP-1 e TLQP-21; o in parallelo che la cellula aumenti la produzione di proVGF come dimostrato nell'aumento dell'espressione genica di VGF in altri tipi di stress o danno neuronale (Riedl et al., 2009).

La riduzione di specifici VGF peptidi riscontrata (NERP-1 e TLQP-21) ci ha indotto a valutare la loro possibile somministrazione nelle cellule per identificare un possibile effetto neuroprotettivo in seguito allo stress ossidativo.

I risultati ottenuti mediante test di vitalità hanno dimostrato un significativo aumento della vitalità in NSC-34 trattate simultaneamente con Sodio Arsenite (0.5mM) e TLQP-21 (1 nmol/ml) dimostrando un effetto protettivo del TLQP-21 su modelli motoneuronali in seguito a stress ossidativo e confermando l'attività già messa in evidenza da Severini e collaboratori (2008).

La scoperta, durante lo svolgimento di questo lavoro, dell'attivazione di due differenti recettori ad opera del peptide TLQP-21 (Hannedouche et al., 2013; Chen et al., 2013), ci ha portato a voler chiarire se la linea motoneuronale in nostro possesso potesse rispondere all'azione del TLQP-21 attivando questo stesso tipo di recettori. Analisi d'immunocitochimica e Western Blot hanno messo in evidenza la presenza, nelle NSC-34, del solo recettore gC1q, in accordo con il ritrovamento di uno specifico recettore appartenente alla famiglia C1q specificamente espresso nel sistema nervoso centrale (Shimono et al., 2010). L'attivazione dei due recettori, da parte del ligando, determina l'apertura di canali, sulla membrana plasmatica o sulla membrana di organuli cellulari come il reticolo endoplasmatico, facendo fluire nel citoplasma il calcio e determinando quindi un aumento transitorio della sua concentrazione che scatenerà nella cellula una specifica risposta. I dati ottenuti dalla valutazione dei flussi di Ca^{2+} intracellulare mediante il test FLUO-4 ci permettono di dire che il TLQP-21 non sembra attivare il recettore gC1q, nel modello cellulare da noi utilizzato. Potremmo quindi ipotizzare che in queste cellule il TLQP-21 possa agire attivando vie differenti come già dimostrato da Severini (2008). E' possibile che, come nelle cellule di granuli cerebellari, anche in questo tipo cellulare il TLQP-21 attivi una MAP chinasi con una modulazione positiva per la chinasi che regola il

segnale extracellulare (Erk 1/2). La via MAPK-Erk 1/2 è già nota per essere importante nella sopravvivenza neuronale in numerosi sistemi. In particolare in vitro su neuroni determina una protezione mediata da neurotrofine, mentre in vivo la protezione è mediata attraverso la via delle Erk, che comportano la fosforilazione di Erk 1/2 e del substrato Akt o fosfoinositide 3-chinasi in pochi minuti (Han and Holtzman, 2000; Willaime-Morawek et al., 2005).

La scelta dell'utilizzo di un secondo modello cellulare, quali i fibroblasti umani, è stata determinata, come accennato nella parte introduttiva, dalla innovatività del sistema soprattutto dal punto di vista metodologico.

Diversi studi hanno dimostrato che numerose cellule non neuronali, conservano le medesime caratteristiche dei neuroni di pazienti SLA e possono quindi essere utilizzate per studiare i meccanismi patogenetici implicati nella malattia. In tali cellule è stato infatti osservato un cambiamento fenotipico cellulare e funzionale in seguito all'induzione di stress cellulare come quello implicato nella SLA (Yang et al., 2015). I fibroblasti umani rappresentano quindi un modello semplice ed accessibile per studiare meccanismi cellulari coinvolti nella SLA (Sabatelli et al., 2015).

I dati mostrano infatti una decisa riduzione di tutti i frammenti di VGF testati nei malati SLA rispetto ai controlli, alcune di queste riduzioni sembra essere significativa solo per specifiche classi di malati questo potrebbe indurci a pensare che alcuni frammenti di VGF possano essere importanti in specifiche mutazioni genetiche riscontrate nella SLA anche in relazione a specifiche alterazioni cellulari che tali mutazioni determinano in queste cellule.

Tutti questi dati sembrano indicare come VGF venga ampiamente processato in frammenti o prodotti finali differenti all'interno di entrambi i tipi di cellule. Questo sarebbe suggestivo di un quadro decisamente complesso e sfaccettato che indica il possibile ruolo di VGF-peptidi in vari meccanismi associati alla SLA e allo stress ossidativo.

Le differenze di comportamento di peptidi derivati da proVGF riscontrate nel presente lavoro avvalorano la tesi di un unico "precursore multifunzionale" che darebbe luogo a frammenti diversi che nelle medesime cellule potrebbero interpretare ruoli differenti. Tra i ruoli ipotizzabili c'è chiaramente l'attività neuroprotettiva, evidenziata in altri lavori (Severini et al., 2008; Zhao et al., 2008) e confermata con il seguente lavoro e che potrebbe essere messa in evidenza, in futuro, anche per altri peptidi.

Bibliografia

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

Bartolomucci A., La Corte G., Possenti R., Locatelli V., Rigamonti A.E., Torsello A., Bresciani E., Bulgarelli I., Rizzi R., Pavone F., D'Amato F.R., Severini C., Mignogna G., Giorgi A., Schininà M.E., Elia G., Brancia C., Ferri G-L., Conti R., Ciani B., Pascucci T., Dell'Olmo G., Muller E.E., Levi A., Moles A. (2006). TLQP-21, a VGF-deriver peptide, increases energy expenditure and prevents the early phase of diet-induced obesity. *PNAS* Vol.103 NO.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

Benson D.L., Salton S.R.J. (1996). Expression and polarization of VGF in developing hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 96:219-228

Betteridge D.J. (2000). What is oxidative stress? Review. *Metabolism* Vol. 49 NO. 2, 3-8

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 Journal of Neuroscience* 28(39):9857-9869

Brancia C., Nicolussi P., Cappai P., La Corte G., Possenti R., Ferri G-L. (2005). Differential expression and seasonal modulation of VGF peptides in shhep pituitary. *Journal of Endocrinology* 186:97-107

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 dther VGF peptides in gastric neuroendocrine cells and modulation by feeding. *Journal of Endocrinology* 207:329-341

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(2):443-446

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

Cashman N.R., Duhram H.D., Blusztajn J.K., Oda K., Tabira T., Shaw I.T., Dahrouge S., Antel J.P. (1992). Neuroblastoma x spinal cord (NSC) Hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Developmental Dynamics* 194:209-221

Chakraborty T.R., Tkalych O., Nanno D., Garcia A.L., Devi L.A., Salton S.R.J. (2006). Quantification of VGF- and pro-SAAS- derived peptides in endocrine tissues and the brain, and their regulation by diet and cold stress. *Brain Research* 1089:21-32

Chen Y.C., Pristerà A., Ayub M., Swanwick R.S., Karu K., Hamada Y., Rice A.S.C., Okuse K. (2013). Identification of a receptor for neuropeptide VGF and its role in Neuropathic pain. *The J. of Biological Chemistry* Vol. 288 NO. 48, 34638-34646

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

Cocco C., D'Amato F., Noli B., Ledda A., Brancia C., Bongioanni P., Ferri G.L. (2010). Distribution of VGF peptides in the human cortex and their selective changes in Parkinson's and Alzheimer diseases. *Journal of Anatomy* 217(6):683-693

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)

Dal Canto M.C., Gurney M.E. (1994). Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Pathol* 145 (6): 1271-1279

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

Doi K., Nakano T., Kitayama M., Yasui K., Fucada Y. Morino S., Kaidoh T., Nakashima K., Inouè T. (2008). Mitochondrial changes in motor neurons of homozygotes of leucine 126 TT deletion SOD-1 transgenic mice. *Neuropathology* 28 (3):269-276

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., 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 Reserce* 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* 13:2244-2251

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

Hahm S., Mizuno T.M., Wu T.J., Wisor J.P., Priest C.A., Kozak 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 *vGF* gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance. *Neuron* Vol.23: 537-548

Hahm S., Fekete C., Mizuno T.M., Windsor J., Yan H., Boozer C.N., Lee C., Elmquist J.K., Lechan R.M., Mobbs C.V., 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. *The Journal of Neuroscience* 22(16): 6929-6938

Han B.H., Holtzman D.M. (2000). BDNF protects neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *Journal of Neuroscience* 20:5775-5781

Hannedouce S., Beck V., Leighton Davies J., Beibel M., Roma G., Oakeley E.J., Lannoy V., Bernard J., Hamon J., Barbieri S., Preuss I., Lasbennes M.C., Sailer A.W., Suply T., Seuwen K., Parker C.N., Bassilana

F. (2013). Identification of the C3a Receptor (C3aR1) as the target of the VGF-derived peptide TLQP-21 in rodent cells. *The J. of Biological Chemistry* Vol. 288 NO. 38, 27434-27443

Hawley R.J., Scheibe R.J., Wagner J.A. (1992). Induce the expression of “VGF” gene through aa cAMP responsive Element. *J. of Neuroscience* 12:2573-2581

Heldt S.A., Stanek L., Chatwal J.P., Ressler K.J. (2007). Hippocampus specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol. Psychiatry* 12:656-670

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

Higgins C.M., Jung C., Ding H., Xu Z. (2002). Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J. of Neuroscience* 22(6): 215

Higgins C.M., Jung C., Xu Z. (2003). ALS-associated mutant SOD-1 G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD-1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neuroscience* 15:4-16

Huang J.T.J., 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 Psychosis. *PLoS Medicine* Vol.3 No.11: 428-452

Huang X., Chen L., Liu W., Qiao Q., Wu K., Wen J., Huang C., Tang R., Zhang X. (2015). Involvement of oxidative stress and cytoskeletal disruption in microcystin-induced apoptosis in CIK cells. *Aquatic Toxicology* 165:41-50

Hunsberger J.G., Newton S.S., Bennet A.H., Duman C.H., Russell D.S., Salton S.R., Duman R.S. (2007). Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF. *Nature Medicine* Vol. 13 No. 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

Kwon S., Zhang Y., Matthias P. (2007). The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev* 21(24):3381-3394

Laslop A., Mahata S.K., Wolkersdorfer M., Mahata M., Srivastava M., Seidah N.G. (1994). Large dense-core vesicles in rat adrenal after reserpine: levels of mRNAs of soluble and membrane-bound constituents in chromaffin and ganglion cells indicate a biosynthesis of vesicles with higher secretory quanta. *Journal of Neurochemistry* 62:2448-2456

Levi A., Eldridge J.D., Paterson B.M. (1985). Molecular cloning of a gene sequence regulated by Nerve Growth Factor. *Science* 229:393-395

Lewis J.E., Brameld J.M., Jehtwa P.H. (2015). Neuroendocrine role for VGF. Review. *Frontiers in Endocrinology*. Vol. 6 Art.3

Liu I.Y., Lyons W.E., Mamounas L.A., Thompson R.F. (2004). Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *Journal of Neuroscience* 24:7958-7963

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

Liu-Yesucevitz L., Bilgutay A., Zhang Y-J., Vanderwyde T., Citro A., Mehta T., Zaarur N., McKee A., Bowser R., Sherman M., Petrucelli L., Wolozin B. (2010). Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PlosOne* 5 (10): 13250-13265

Matusica D., Fenech M.P., Rogers M-L., Rush R.A. (2008). Characterization and use of the NSC-34 cell line for study of Neurotrophin Receptor Trafficking. *J of Neuroscience Research* 86:553-565

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 NO. 2

Musarò A. (2010). State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis. *World J. Biol Chem* 5:62-68

Pasinetti G.M., Ungar L.H. Lange D.J., Yemul S., Deng H., Yuan X., Brown R.H., Cudkowicz M.E., Newhall K., Peskind E., Marcus S., Ho L. (2006). Identification of potential biomarkers in ALS. *Neurology* 66

- 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 NGF in PC12 cells is stored in secretory vesicles and released 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. USA* Vol. 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 No.8, 3727-3735
- Possenti R.**, Muccioli G., Petrocchi P., Cero C., Cabassi A., Vulchanova L., Riedl M.S., Manieri M., Frontini A., Giordano A., Cinti S., Govoni P., Graiani G., Quaini F., Ghè C., Bresciani E., Bulgarelli I., Torsello A., Locatelli V., Sanghez V., Larsen B.D., Petersen J.S., Palanza P., Parmigiani S., Moles A., Levi A., Bartolomucci A. (2012). Characterization of a novel peripheral pro-lipolytic mechanism in mice: role of VGF-derived peptide TLQP-21. *Biochemistry* 441:511-522
- Riedl M.S.**, Braun P.D., Kitto K.F., Roiko S.A., Anderson L.B., Honda C.N., Fairbanks C.A., Vulchanova L. (2009). Proteomic analysis uncovers novel actions of the neurosecretory protein VGF in nociceptive processing. *The Journal of Neuroscience* 29(42):13377-13388
- 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
- Ruetschi U.**, Zetterberg H., Podust V.N., Gottfries J., Li S., Simonsen H., McGuire J., Karlsson M, Rymo L., Davies H., Minthon L., Blennow K. (2005). Identification of CSF biomarkers for frontotemporal dementia using SELDI-TOF. *Experimental Neurobiology* 196: 273-281
- Sabatelli M.**, Zollino M., Conte A., Del Grande A., Marangi G., Lucchini M., Mirabella M., Romano A., Piacentini R., Bisogni G., Lattante S., Luigetti M., Rossini P.M., Moncada A. (2015). Primary fibroblasts cultures reveal TDP-43 abnormalities in Amyotrophic Lateral Sclerosis patients with and without SOD-1 mutation. *Neurobiology of Aging* Vol.36 No.5, 2005-2013
- Salton S.R.J.**, Fischberg D.J., Dong K.W. (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. *Molecular and Cellular Biology* Vol. 11 NO. 5, 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. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21,199-219

Sasaki S., Warita H., Iwata M. (2005). Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD-1 gene. *Acta Neuropathology* 110 (1): 48-56

Sasaki S. and Iwata M. (1996). Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47(2):535-540

Sasaki S. and Iwata M. (2007). Mitochondrial alteration in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. of Neuropathol. Exp. Neurol.* 66(1): 10-6

Selle H., Lamerz J., Buerger K., Dessauer A., Hager K., Hampel H., Karl J., Kellman M., Lannfelt L., Louhija J., Riepe M., Rollinger W., Tumani H., Schrader M., Zucht H.D. (2005). Identification of novel Biomarker candidates by differential peptidomics analysis of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Combinatorial Chemistry & High throughput Screening* 8:801-806

Severini C., Ciotti M.T., Biondini L., Quaresima S., Rinaldi A.M., Levi A., Frank C., Possenti R. (2008). TLQP-21, a neuroendocrine VGF-derived peptide, prevents cerebellar granule cells death induced by serum and potassium deprivation. *Journal of Neurochemistry* 104: 534-544

Severini C., La Corte G., Improta G., Broccardo M., Agostini S., Petrella C., Sibilina 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

Shimazawa M., Tanaka H., Ito Y., Morimoto N., Tsuruma K., Kadikura M., Tamura S., Inoue T., Yamada M., Takahashi H., Warita H., Aoki M., Hara H. (2010). An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD-1 animal models of familial ALS. *PLoS ONE* Vol. 5, No. 12

Shimono C., Manabe R., Yamada T., Fukuda S., Kawau J., Furutani Y., Tsutsui K., Ikenaka K., Hayashizaki Y., Sekiguchi K. (2010). Identification and characterization of nCPL2, a novel C1q family protein expressed in the central nervous system. *J. Biochem* 147(4):565-579

Snyder S.E., Salton S.R.J. (1998). Expression of VGF mRNA in the adult rat central nervous system. *The Journal of comparative Neurology* 394: 91-105

Snyder S.E., Pinter J.E., Salton S.R.J. (1998). Developmental expression of VGF mRNA in the prenatal and postnatal rat. *The Journal of Comparative Neurology* 394:64-90

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

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. *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

Tatemoto K. and Mutt V. (1980). Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285: 417-8

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 effects and enhances proliferation in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 27 (45): 12156-12167

Thakker-Varia S., Jean Y.Y., Parikh P., Sizer C.F., Ayer J.J., Parikh A., Hyde T.M., Buyske S., Alder J. (2010). The Neuropeptide VGF is reduced in Human bipolar Postmortem Brain and contributes to some of the behavioural and molecular effects of lithium. *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

Tourriere H., Cheblu K., Courselaud B., Blanchard J.M., Bertrand E., Tazi J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *Journal of Cell Biology* 160(6):823-831

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). Journal of Neurochemistry 81:565-574

Van den Pool A.N., Decavel C., Levi A., Paterson B. (1989). Hypothalamic expression of a novel gene product, VGF: immunocytochemical analysis. The journal of neuroscience 9(12): 4122-4137

Van den Pool A.N., Bina K., Decavel C., Ghosh P. (1994). VGF expression in the brain. The journal of comparative Neurology 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

Willaime-Morawek S., Arbez N., Mariani J., Brugg B. (2005). IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt and ERK pathways: is this protection independent of CREB and Bcl-2? Brain Res. Mol. Brain Res. 42:97-106

Wisor J.P., Takahashi J.S. (1997). Regulation of the *vgf* gene in the Golden Hamster Suprachiasmatic Nucleus and by the circadian clock. The Journal of Comparative Neurology 378:229-238

Wolozin B. (2012). Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. Molecular Neurodegeneration 7: 56

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 NO.36, 26354-26360

Yang S., Zhang K.Y., Kariawasam R., Bax M., Fifita J.A., Ooi L., Yerbury J.J., Nicholson G.A. (2015). Neurotox Res. 28:138-146

Xia W., Mruk D.D., Lee W.M., Cheng C.Y. (2007). Unraveling the molecular targets pertinent to junction restructuring events during spermatogenesis usinh the Adjudin-induced germ celle depletion model. Journal of Endocrinoligy 192:563-583

Zhao Z., Lange D.J., Ho L., Bonini S., Shao B., Salton S.R., Thomas S., Pasinetti G.M. (2008). Vgf is a novel biomarker associated with muscle weakness in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), with a potential role in disease pathogenesis. International Journal of Medical Sciences 5(2): 92-99