



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE
CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCA E DI
SERVIZI PER LA BIOLOGIA E LA MEDICINA DELLA
RIGENERAZIONE**

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E MEDICINA
DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRATPIANTI
XXII CICLO

TESI DI DOTTORATO

**STUDIO DI TRAFFICKING E POTENZIALE
NEUROGENICO DELLA PROTEINA
RICOMBINANTE UMANA TAT-OP1**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.mo Prof. Claudio Grandi

Dottorando : Dott. Marco Venturini

Dopo le montagne, altre montagne

(antico proverbio afgano)

A chi dovrà venire

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
ABSTRACT	pag. 4
INTRODUZIONE	pag. 6
1. Proteine Morfogenetiche dell'osso BMP	pag. 6
<i>1.1 BMP ricombinanti</i>	<i>pag. 7</i>
<i>1.2 Le BMP nel Sistema Nervoso Centrale e potenziale neurorigenerativo</i>	<i>pag. 8</i>
<i>1.3 BMP7</i>	<i>pag. 9</i>
<i>1.4 Meccanismo d'azione delle BMP</i>	<i>pag. 12</i>
2. Studio in vitro dei fattori neurogenici mediante il modello cellulare PC12	pag. 13
3. La trasduzione proteica	pag. 14
<i>3.1 Meccanismo di ingresso e trafficking cellulare delle proteine di fusione TAT</i>	<i>pag. 16</i>
4. Rigenerazione neuronale e ingegneria tissutale	pag. 17
SCOPO DELLA TESI	pag. 20
MATERIALI E METODI	pag. 22
1. Preparazione, purificazione e caratterizzazione della proteina ricombinante umana TAT-OP1	pag. 22
2. Coltura di cellule PC12	pag. 22
3. Saggio di vitalità cellulare MTS	pag. 23
4. RT-PCR: Reazione di Retro Trascrizione e Polimerizzazione a catena	pag. 24
<i>4.1 Estrazione di mRNA</i>	<i>pag. 25</i>
<i>4.2 Quantificazione spettrofotometrica di mRNA estratto</i>	<i>pag. 25</i>
<i>4.3 Reazione di RT-PCR</i>	<i>pag. 26</i>

<i>4.4 Elettroforesi su gel di agarosio</i>	<i>pag. 26</i>
5. Studio del trafficking cellulare e della morfogenesi	pag. 27
<i>5.1 Western Blotting</i>	<i>pag. 27</i>
<i>5.1.1 Quantificazione degli estratti cellulari</i>	<i>pag. 28</i>
<i>5.1.2 Sodio Dodecil Solfato Poliacrilamide</i>	
<i>Gel Elettroforesi (SDS-PAGE)</i>	<i>pag. 28</i>
<i>5.1.3 Immunoblotting mediante SNAP i.d.</i>	<i>pag. 29</i>
<i>5.1.4 Rivelazione</i>	<i>pag. 30</i>
<i>5.2 Immunofluorescenza e Microscopia confocale</i>	<i>pag. 30</i>
<i>5.3 Analisi della crescita dendritica</i>	<i>pag. 32</i>
RISULTATI	pag. 33
1. Proteina hTAT-OP1	pag. 33
2. Studio di trafficking cellulare	pag. 35
<i>2.1 Determinazione dell'ingresso di TAT-OP1 in PC12</i>	pag. 35
<i>2.1.1 Western Blotting</i>	<i>pag. 36</i>
<i>2.1.2 Immunofluorescenza</i>	<i>pag. 37</i>
2.2 Determinazione dell'attività biologica di hTAT-OP1	pag. 39
3. Studio del potenziale neurogenico di hTAT-OP1	pag. 40
<i>3.1 Saggio di vitalità cellulare</i>	<i>pag. 40</i>
<i>3.2 Analisi della crescita neuritica</i>	<i>pag. 42</i>
4. Analisi dell'espressione dei neurofilamenti	pag. 45
<i>4.1 Western blotting</i>	<i>pag. 45</i>
<i>4.2 Immunofluorescenza</i>	<i>pag. 46</i>
DISCUSSIONE	pag. 48
BIBLIOGRAFIA	pag. 53
RINGRAZIAMENTI	pag. 66

RIASSUNTO

La proteina osteogenica 1 (OP-1 o BMP-7) è un fattore di crescita multifunzionale di 431 amminoacidi appartenente alla famiglia delle proteine morfogenetiche dell'osso (BMP), un sottogruppo della superfamiglia del TGF- β . Secrete sottoforma di precursori fino a quattro volte più lunghi della forma matura, le BMP presentano all'estremità C-terminale un motivo contenente sette cisteine ..C...CXGXC...CC...CXCX.., che rappresenta la porzione attiva della molecola. Numerosi studi hanno dimostrato che le proteine BMP sono coinvolte non solo nello sviluppo della cartilagine e dell'osso ma anche nella formazione di tessuti di origine non osteogenica quali ad esempio il tessuto nervoso. Esse, infatti, sono coinvolte nelle prime fasi dello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC) e partecipano al processo neurorigenerativo in età adulta. Questo lavoro di tesi si è focalizzato sullo studio della proteina ricombinante umana di fusione hTAT-OP1, precedentemente preparata e caratterizzata su colture di preosteoblasti MC3T3E1. Il costrutto hTAT-OP1 è composto da 162 amminoacidi e comprende all'N-terminale (30 AA) una coda di 6 istidine seguita dalla sequenza TAT, un peptide che deriva dalle proteine del virus dell'HIV-1 ed è comunemente impiegato come dominio di trasduzione proteica, il sito di taglio per una peptidasi specifica (6 AA) e, al C-terminale, il dominio di sette cisteine (126 AA), essenziale per il corretto ripiegamento della proteina. La sua caratterizzazione ha previsto studi di trafficking cellulare, attività biologica come potenziale neurogenico su cellule di feocromocitoma di ratto PC12, una linea cellulare comunemente usata per lo studio *in vitro* del differenziamento neurogenico. Lo studio di trafficking cellulare è stato eseguito mediante l'uso delle tecniche di western blotting e di immunofluorescenza. Dopo il trattamento di 24 ore con hTAT-OP1 (200nM), è

stata dimostrata mediante western blotting la presenza intracellulare della proteina come molecola con peso molecolare di 18,5 kDa durante le prime 6 ore. Mediante l'impiego di anticorpi specifici per le sequenze his-tag e OP1, è stato dimostrato che il costrutto è tagliato in sede citoplasmatica in due peptidi, probabilmente a livello del sito peptidasico inserito nella regione N-terminale. Dopo 24 ore dal trattamento, la presenza di TAT è stata indirettamente determinata mediante il segnale di his-tag a livello nucleare mentre OP1 è stata osservata a livello della membrana citoplasmatica. Inoltre, la fosforilazione del complesso SMAD1/5/8, che agisce come secondo messaggero nella via del segnale BMP, ha confermato l'interazione della sequenza OP1 con i recettori di membrana BMPR, come dimostrato in parallelo per la proteina hBMP7. Successivamente, l'attività biologica come potenziale neurogenico è stata caratterizzata mediante studi di MTS, crescita neuritica ed espressione di neurofilamenti.

Nessun effetto citotossico è stato osservato dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, mentre una ridotta proliferazione cellulare è risultata a partire dalle 72 ore, e l'effetto è stato di tipo concentrazione dipendente. Inoltre, la combinazione di hTAT-OP1 con NGF ha comportato una più marcata riduzione della proliferazione in confronto con i campioni stimolati solo con hTAT-OP1. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i campioni trattati con NGF/hTAT-OP1 e NGF/hBMP7. Sebbene non sia stata osservata crescita neuritica dopo trattamento con la proteina hTAT-OP1 e hBMP7, un effetto precoce e stimolatorio è stato identificato a 24h nei campioni sottoposti al cotrattamento con hTAT-OP1 e NGF diversamente da quanto osservato nel controllo allestito con NGF dove la formazione dei neuriti è risultata in un tempo tardivo (7giorni). Il cotrattamento (hTAT-OP1+NGF) ha dimostrato, inoltre, di stimolare un' alta espressione ed

organizzazione dei neurofilamenti in confronto con le colture trattate solo con NGF. In conclusione, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi evidenziano che esiste una sinergia di azione nel differenziamento neurogenico tra hTAT-OP1 ed il fattore NGF, probabilmente dovuto ad un “crosstalk” tra le due vie di segnale e che tale sinergia comporta una più precoce crescita neuritica. Si intravedono prospettive applicative del costrutto hTAT-OP1 nel campo della rigenerazione ossea e neuronale.

ABSTRACT

Osteogenic protein-1 (OP-1 or BMP-7) is a multifunctional growth factor of 431 amino acids that belongs to the Bone Morphogenic Protein family (BMPs), a member of the Transforming growth factor β (TGF- β) superfamily. BMPs are synthesized starting from a precursor approximately four times longer than the mature form, and share a C-terminal distinctive pattern ..C...CXGXC...CC...CXCX.. containing seven cysteines active domain. Experimental evidences demonstrated BMPs play a key role not only in cartilage and bone development, but also in non osteogenic tissue formation like the nervous one. Indeed, BMPs are involved during the early development of central nervous system (CNS), and participate as neuroregenerative factors to the neuroregeneration occurring in the adult life. The present study is focused on the hTAT-OP1 protein, a recombinant human fusion protein previously prepared and characterized on preosteoblasts MC3T3E1. hTAT-OP1 is a construct of 162 aminoacids, characterized by the N-terminal end including a 6his-tag sequence followed by the HIV-1-derived TAT sequence as a protein transduction domain, and a peptidase specific cleavage site (spanning 6 AA). The C-terminal end contains the OP-1 domain (126 AA) with the seven cysteines motive, essential for the correct protein folding. Cellular trafficking, biologic activity as neurogenic potential were tested on rat pheocromatocytoma derived PC12 cells, a cell line commonly used for neurogenic in vitro differentiation study. Cell trafficking assays were performed by using western blotting and immunofluorescence. By western blotting, the intracellular presence of hTAT-OP1 as a protein of 18,5 kDa was detected by 6 hours after the treatment with hTAT-OP1 (200 nM) performed

for 24 hours. By using specific antibodies directed versus his-tag and OP1 sequence, it was demonstrated that the construct is cleaved within cells presumably at the peptidase site, included at the N-terminal end. After 24 hours from treatment, the presence of TAT sequence was indirectly detected by his-tag signal within the nucleus while OP1 was observed at the plasma membrane. Moreover, the phosphorylation of SMAD1/5/8, that are the second messenger of BMP signalling, confirmed the interaction of OP1 sequence with BMPRs on the plasma membrane, as in parallel detected for hBMP7. The neurogenic potential was then evaluated by studies including MTS assay, neuritic outgrowth, and neurofilaments synthesis. No toxic effect was observed on 24 hours treated cells, while a reduction of cellular proliferation was detected from 72 hours in a concentration dependent manner. The combination of hTAT-OP1 with NGF induced a marked reduced proliferation in comparison with the samples treated with only hTAT-OP1. No significant differences was evaluated in samples treated with NGF/hTAT-OP1 or NGF/hBMP7 co-treatments. Although no neuritic outgrowth was induced by hTAT-OP1 or hBMP7 when used separately, a precocious and stimulator effect was detected at 24h in samples cotreated with NGF and hTAT-OP1 in comparison with the ones treated with NGF showing neurites only after 7 days of treatment. The co-treatments demonstrated also to increase the neurofilaments expression and improved their organization in comparison with NGF treatment. Taken together these data suggest that there is a synergy between hTAT-OP1 and NGF in neurogenic differentiation as an improved and precocious dendritic outgrowth, probably deriving from a crosstalk of factor signal ways. hTAT-OP1 is potentially useful for bone and neural regeneration applications.

INTRODUZIONE

1. Proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs)

Le proteine morfogenetiche dell'osso sono fattori di crescita pleiotropici appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita trasformanti- β (TGF- β) (Chen et al., 2004). Coinvolte in numerosi processi differenziativi a carico di cellule staminali multipotenti, sono state identificate per la prima volta nella matrice extracellulare ossea dal chirurgo ortopedico Marshall Urist, il quale tra gli anni sessanta e settanta ha studiato *in vivo* la potenzialità della matrice ossea decellularizzata per stimolare la formazione ex novo di tessuto. Studi successivi hanno confermato il ruolo determinante delle proteine BMP nei processi di rigenerazione a carico dell'osso (Urist et al., 1973). Da allora l'interesse per questa famiglia di proteine è andato sempre più crescendo e i numerosi studi effettuati ne hanno dimostrato il coinvolgimento in età embrionale nella migrazione, nella proliferazione e nella differenziazione di cellule staminali nei tessuti cardiaco, neuronale, osseo e cartilagineo (Chen et al., 2004). Ad oggi sono stati identificati e caratterizzati circa 40 membri di questa famiglia (Kotoulas et al., 2009), di cui solo sette sono studiati per l'impiego clinico (BMP 2-8). Caratterizzate da un'alta omologia di sequenza aminoacidica con il TGF- β (60%-80%), le BMP vengono sintetizzate come lunghi precursori che, per azione di una proteasi specifica tripsino simile, originano la porzione matura (Celeste et al., 1990), caratterizzata da tre ponti disolfuro e una cisteina libera, essenziale per la formazione del dimero attivo.

1.1 BMP ricombinanti

Per definire il ruolo fisiologico delle BMP e dei loro recettori sono state adottate strategie di studio che hanno previsto o l'impiego di proteine ricombinanti, in forma matura o incompleta, oppure la sovraespressione delle unità recettoriali o dei loro antagonisti. Mediante tali approcci, è stato dimostrato che le BMP regolano la crescita dell'osso in età pre e postnatale, in condizioni fisiologiche o in seguito a traumi (Wozney, 2002), stimolando e differenziando un pool di cellule staminali mesenchimali (Reddi, 2001) richiamate in sede per via chemotattica. Mediante l'utilizzo di animali transgenici è stato confermato il ruolo svolto durante l'embriogenesi da parte delle BMP-2 e 4, la cui mancata espressione porta all'alterato sviluppo dello scheletro e degli annessi placentari (Winnier et al., 1995 – Zhang et al., 1996). Similmente, l'assenza della BMP-7 nella morfogenesi embrionale porta alla morte pretermine dell'organismo per gravi difetti dello scheletro, dei reni e degli occhi (Jena et al., 1997). L'impiego delle proteine ricombinanti ha consentito di caratterizzare le BMP nel loro meccanismo di azione in forma omodimerica e/o eterodimerica (Israel et al., 1996) e di preparare quantità adeguate di prodotto da destinare all'uso clinico in programmi terapeutici di morfogenesi ricostruttiva tessutale.

Infatti, attualmente farmaci a base di BMP 2 e 7 ricombinanti (Israel et al., 1992) sono disponibili e approvati dalla FDA per l'uso clinico nella terapia di fratture ossee lunghe e spinali (Brown A. et al., 2006). Tali farmaci sono preparati in combinazione con carrier biologicamente ottimali quali il collagene di tipo I o polimeri biodegradabili che offrono il vantaggio di localizzare la proteina veicolata nelle sede di impianto, ridurre le perdite per diffusione nel circolo

sanguigno (Wozney, 2002) e favorire la migrazione nella sede di impianto di cellule staminali mesenchimali dell'ospite.

1.2 Le BMP nel Sistema Nervoso Centrale e potenziale neurorigenerativo

Se il ruolo delle BMP nel differenziamento osteogenico ha portato addirittura alla formulazione di farmaci per la rigenerazione ossea, quello neurogenico è ancora in fase di studio. In letteratura è nota l'azione delle BMP durante i primi stadi dello sviluppo embrionale ed in particolar modo nel corretto sviluppo del sistema nervoso centrale, dove promuovono la formazione di astrociti a partire da progenitori multipotenti dell'astroglia (Meheler M.F., et al., 1997), oppure controllano il differenziamento di progenitori neuronali embrionali in neuroni ipotalamici dopaminergici (Ohyama K. et al., 2005). Essenziali per il differenziamento della linea neuronale dalle cellule staminali della cresta neurale (Meheler M.F., et al., 1997), le BMP hanno rivelato una funzione regolatoria anche nelle fasi tardive del differenziamento neuronale, stimolando la neuritogenesi ovvero lo sviluppo di processi neuritogenesi in diverse sottopopolazioni neuronali, quali ad esempio i neuroni simpatici (Lein et al. 1995). Alcune BMP quali BMP2, BMP4 e BMP7 agiscono in sinergia a livello del sistema nervoso per regolare il differenziamento di progenitori neuronali della linea simpaticoadrenergica, modulare l'espressione di neurotrasmettitori e neuropeptidi e, in presenza del fattore NGF, controllare la dendritogenesi (Meheler M.F., et al., 1997). Numerose evidenze hanno messo in luce inoltre che tale azione è concentrazione-dipendente: in particolare, la BMP2 e BMP4 sono attive a basse concentrazioni (10 ng/ml) (Varley et al., 1996) mentre la BMP7 è

attiva unicamente ad alte concentrazioni (500 ng/ml) (Varley et al., 1995). Recentemente, il ruolo della BMP7 nello sviluppo del sistema nervoso è stato ampiamente confermato da numerose evidenze sperimentali che hanno dimostrato la sua espressione nei tessuti neuronali quali ippocampo, corteccia cerebrale e cervelletto (Liu Y. et al., 2001). A livello del sistema nervoso centrale, ha dimostrato di svolgere un'azione di tipo neuroprotettivo, sia su neuroni della sostanza nigra, in un modello di malattia di Parkinson ottenuto per trattamento con 6-idrossidopamina (Harvey B.K. et al., 2004), sia su neuroni dopaminergici della zona nigrostriatale e dell'area ventromesencefalica, dopo trattamento con metanfetamina (Chou J. et al. 2008). Inoltre, dopo occlusione dell'arteria cerebrale media, ha contribuito a ridurre il danno ischemico stimolando la proliferazione di cellule appartenenti alla zona subventricolare e corticale (Chou J. et al., 2005). Tutte queste evidenze sperimentali portano a caratterizzare le BMP ed in particolare la BMP7 come fattori neurotrofici a tutti gli effetti che intervengono subito dopo un danno neuronale e partecipano al processo di morfogenesi riparativa postnatale del tessuto adulto.

1.3 BMP7

La proteina BMP-7, chiamata anche proteina osteogenica 1 (OP-1), è stata clonata e riprodotta con la tecnologia del DNA ricombinante per la prima volta nel 1990 (Ozkaynac et al., 1990) ed attualmente è il principio attivo di un farmaco impiegato nella terapia rigenerativa di difetti ossei (Brown et al. 2006). Dallo studio della sequenza genica si è dimostrato che questa proteina presenta al C-terminale il dominio di 7 cisteine caratteristico dei membri della famiglia del TGF- β (C...CXGXC...CC...CXCX). La corretta configurazione della proteina

prevede la formazione di tre ponti disolfuro tra le cisteine in posizione 330-396, 359-428 ed infine 363-430, mentre la cisteina in posizione 395 rimane libera. Come tutti i membri della superfamiglia del TGF beta anche OP-1 viene secreta in forma di precursore circa quattro volte più lungo della forma matura ovvero la sequenza compresa tra la serina 300 e l'istidina 431. Similmente alle altre proteine BMP, OP-1 agisce a livello dei recettori di membrana in forma di dimero la cui formazione prevede lo stabilirsi di un ponte disolfuro tra le cisteine in posizione 395 di due monomeri (Mehler M. F. et al., 1997). Tra il precursore e il dominio di 7 cisteine è presente un esapeptide (serina 300–lisina 305) che funge da sequenza segnale per il taglio di una proteasi tripsino-simile (Celeste et al., 1990). Sebbene la funzione biologica sia svolta dal solo dominio C-terminale, la porzione a monte è essenziale per consentire *in vivo* la corretta configurazione della proteina attiva. La forma matura di OP-1 correttamente ripiegata dà luogo ad un motivo a chiave greca di dimensioni approssimative 60Å x 20Å x 15Å (Griffith et al., 1996). Caratteristica del motivo a chiave greca è che l'ordine dei filamenti β antiparalleli non segue l'ordine che essi hanno nella catena peptidica. Per questa ragione, uno dei *loop* presenti in questo motivo risulta essere molto lungo. OP-1 è formata da 8 filamenti a foglietto β che danno luogo a due porzioni distinte, *finger 1* e *finger 2*, ed un filamento ad α -elica compreso tra il terzo ed il quinto residuo di cisteina disposti nello spazio come mostrato in figura 1.

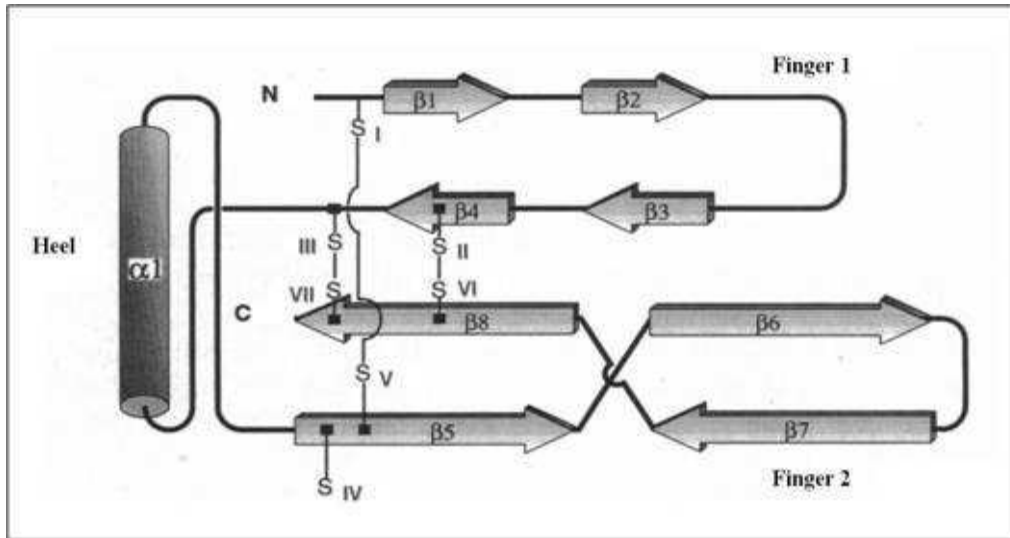


Figura 1. Rappresentazione grafica di OP-1 matura (residui 299-431) nella corretta configurazione: le 7 cisteine formano 3 ponti disolfuro (II-VI, III-VII, I-V) attorno agli 8 frammenti a foglietto β . Questi danno luogo a due estroflessioni (Finger 1 e Finger 2) che hanno origine dalla porzione ad α -elica (Heel) (Griffith *et al.*, 1996).

I filamenti β sono costituiti da: $\beta 1$, lisina 331 – istidina 333; $\beta 2$, tirosina 336 – serina 338; $\beta 3$, acido glutammico 352 – alanina 355; $\beta 4$, tirosina 357 – acido glutammico 362; $\beta 5$, cisteina 395 – asparagina 402; $\beta 6$, isoleucina 404 – acido aspartico 410; $\beta 7$, asparagina 414 – tirosina 420; ed infine $\beta 8$, valina 424 – istidina 431. In particolare i filamenti da $\beta 1$ a $\beta 4$ danno origine alla porzione *finger 1*, mentre da $\beta 5$ a $\beta 8$ a *finger 2*.

La porzione ad α -elica si estende dalla tirosina 82 all'isoleucina 94 e dà luogo ad un'elica lunga 3,5 giri con caratteristiche anfipatiche, pertanto contiene sia residui amminoacidici idrofobici che idrofilici. La struttura elicoidale contribuisce inoltre a stabilizzare la formazione del dimero (Griffith *et al.*, 1996). Pertanto si può concludere che il dimero si forma dall'associazione della regione ad α -elica di un monomero con le regioni *finger 1* e *2* di un altro monomero, tale legame è reso stabile dalla formazione del ponte disolfuro tra le cisteine in posizione 395 dei due monomeri.

1.4 Meccanismo d'azione delle BMP

Per comprendere la regolazione ed il meccanismo d'azione delle BMP, molta attenzione è stata rivolta ai recettori di membrana coinvolti nella via di trasduzione del loro segnale. Tali recettori sono del tipo serina – treonina chinasi e sono formati da due unità distinte, dette di tipo I e II. Sono state identificate 3 varianti dell'unità I (BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-IA) (Koenig et al., 1994) e tre dell'unità II (BMPR-II, ActR-II, ActR-IIB) (Yamashita et al., 1995). I recettori BMPR-IA, IB, II sono specifici per le BMP, mentre i recettori ActR-II, IIB interagiscono anche con altri ligandi. La loro espressione, osservata nelle cellule del tessuto osseo e a livello delle aree cerebrali sui neuroni corticali, ippocampali e della sostanza nigra (Ebendal T. et al., 1998), va incontro ad un significativo aumento dopo ischemia (Charytoniuk DA et al., 2000) o contusione cerebrale (Lewen A. et al., Neuroreport 1997). L'interazione del ligando con il recettore porta alla formazione di un complesso recettoriale attivato, formato da due unità di tipo I e due unità di tipo II (Moustakas and Heldi, 2002). Un ruolo importante, in questo meccanismo, viene svolto dal complesso proteico SMAD 1/ 5/8 che si trova a livello delle unità I (Nishimura et al., 1998); il legame della proteina BMP al recettore provoca la fosforilazione di tale complesso con conseguente distacco dal recettore di tipo I e legame nel citoplasma con la SMAD 4. Il supercomplesso così formato trasloca nel nucleo attivando specifici fattori di trascrizione. Questo complicato meccanismo di trasmissione del segnale è regolato a livello di membrana dall'antagonista recettoriale per le BMP, detto Noggin (Groppe et al., 2002) e a livello citoplasmatico dalla SMAD 6, che legandosi all'unità I, impedisce la fosforilazione di SMAD 1/5/8 (Iamamura et al., 1997). Inoltre, a livello citoplasmatico, è ulteriormente regolato dalla proteina TOB, che

interagisce con le proteine SMAD attivate impedendone la traslocazione nucleare (Yoshida et al., 2000), e la proteina Smurf 1, un enzima ubiquitina ligasi E3, che promuove la degradazione delle proteine SMAD 1/5 e delle unità I del recettore (Zhu et al., 1999) (Figura 2).

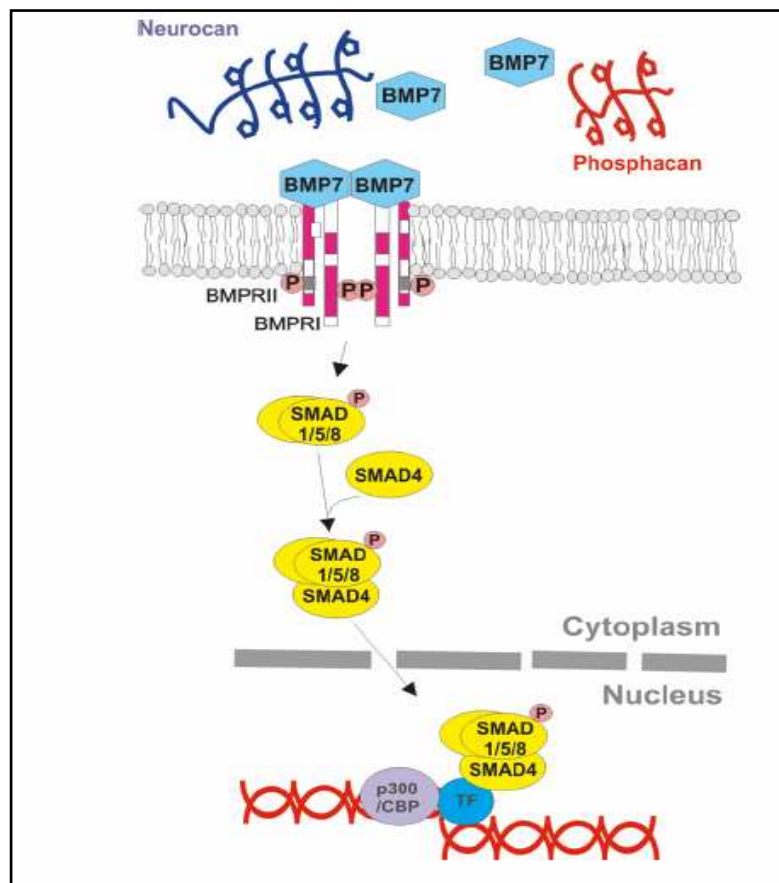


Figura 2. Schema del processo di trasmissione del segnale BMP dipendente. (Bani-Yaghoub *et al.*, 2008).

2. Studio in vitro di fattori neurogenici mediante il modello cellulare PC12

La linea cellulare di feocromocitoma PC12 ottenuta da un tumore di ghiandola surrenale di ratto è un modello sperimentale di differenziamento neuronale ormai consolidato (Green L.A. et al., 1976). Questa linea presenta caratteristiche tipiche delle cellule cromaffino-simili, quali la sintesi, l'immagazzinamento e il rilascio

di catecolammine e caratteristiche delle cellule neuronali quali la capacità di rispondere alla stimolazione con NGF mediante la formazione di neuriti, di vescicole sinaptiche, il blocco della replicazione cellulare (Grumolato L. et al., 2003) ed espressione di neurofilamenti (Lindenbaum M.H. et al., 1987).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'effetto neuritogenico delle proteine BMP2 (Iwasaky S. et al., 1996) e BMP4 (Paralkar V.M. et al., 1992) su colture PC12 è confrontabile con quello osservato dopo trattamento con NGF. Altre evidenze sperimentali hanno messo in luce che tali risultati dipendono grandemente dalla sottopopolazione cellulare e dalle condizioni di coltura utilizzate. Althini e collaboratori infatti affermano che BMP4 e BMP6 hanno un effetto neuritogenico solo se utilizzate in combinazione con NGF e che la crescita neuritica è osservata in tempi più precoci rispetto a quella indotta utilizzando solo NGF (Althini et al., 2003).

3. La trasduzione proteica

La nuova frontiera nel trattamento di specifici stati patologici vede la manipolazione di cellule target per la produzione endogena di molecole biologicamente attive. La terapia genica e le tecniche di trasfezione virale mediante adenovirus (Kugler et al., 2003), virus adenoassociati (Shimazaki et al., 2000), lentivirus (Kordower et al., 2000) ed herpes virus (Antonawich et al., 1999) sono le strategie più comunemente proposte ed utilizzate attualmente per raggiungere tale scopo sebbene il loro impiego *in vivo* possa comportare l'insorgenza di una risposta immunitaria di tipo immediato o ritardato, o neurotossicità (Check E. et al., 2002).

Le proteine ricombinanti sono ampiamente riconosciute come farmaci ad elevato potenziale terapeutico e rappresentano oggi una valida ed interessante alternativa alla medicina tradizionale. Prodotte, purificate e rinaturate *in vitro* possono però presentare una ridotta attività biologica rispetto alle corrispondenti proteine naturali. Inoltre, la loro espressione, purificazione e rinaturazione *in vitro* sono processi caratterizzati da una bassa resa ed alti costi di gestione. Per la loro somministrazione *in vivo*, richiedono particolari sistemi di veicolazione che ne limitino i processi di degradazione dopo impianto (Schwarze et al., 1999). Per ovviare a tali problemi, possono risultare utili particolari trasportatori proteici, denominati domini di trasduzione proteica (PTD). I PTD consentono di trasportare farmaci e proteine con dimensioni fino a 120 kDa in cellule di tipo diverso (Dietz et al., 2004) e per via sistemica (Schwarze et al., 1999). Tra questi il più utilizzato è un dominio appartenente al virus dell'HIV denominato TAT. Questo dominio è stato scoperto e caratterizzato nel 1988 da due gruppi di ricerca diretti rispettivamente da Green e Loewenstein e Frankel e Pabo (Green and Loewenstein, 1988; Frankel and Pabo, 1988). Nel virus dell'HIV, TAT è una proteina di 86 amminoacidi ed è responsabile del trasporto delle proteine virali all'interno della cellula. La porzione attiva coinvolta nel trasporto proteico è costituita da 11 amminoacidi, per la maggiorparte di natura basica: **Y G R K K R R Q R R R** (Fawell et al., 1994). La presenza di amminoacidi basici è una caratteristica che accomuna tutti i PTD fino ad ora caratterizzati. Studi successivi hanno dimostrato che questo dominio è in grado di trasportare anche proteine diverse da quelle virali e che tale trasporto è più efficiente quando la proteina è nello stato denaturato. Dopo trasduzione in sede citoplasmatica, la proteina va incontro a rinaturazione e ad attivazione mediante il sistema cellulare delle HSP90

(Frankel e Pabo, 1988). Questo sistema consente di evitare tutti quei passaggi di rinaturazione in vitro che, come detto in precedenza, generalmente hanno basse rese di produzione. Inoltre utilizzando questi trasportatori è possibile inoculare direttamente la proteina di interesse nella sede desiderata e ridurre il tempo di internalizzazione evitando la degradazione della proteina cargo dopo impianto nell'organismo.

3.1 Meccanismo di ingresso e trafficking cellulare delle proteine di fusione TAT

Nonostante i numerosi studi a riguardo non è ancora del tutto chiaro il meccanismo che permette ai PTD di trasferire le proteine cargo all'interno della cellula. Alcuni studiosi ipotizzano che il passaggio attraverso la membrana sia garantito da una serie di legami idrogeno tra il foglietto fosfolipidico idrofobico della membrana plasmatica e i gruppi idrofilici degli amminoacidi basici presenti nella sequenza del PTD (Wright et al., 2003). L'elevata densità di carica a pH fisiologico posseduta da questi peptidi ne esclude il trasporto passivo dovuto al gradiente di concentrazione (Kim et al., 2006). Alcune evidenze sperimentali lasciano credere che il trasporto avvenga per un processo di endocitosi-temperatura dipendente con consumo di ATP e mediato da caveole. Le caveole sono vescicole del diametro di 50-70nm ricche in colesterolo e sfingolipidi chiamate anche "zattere lipidiche". Esse sono coinvolte nel trasporto proteico non mediato da recettori di membrana (Fittipaldi A. et al. 2003). L'ipotesi più accreditata correntemente, prevede che la proteina di fusione interagisca con le catene di glicani presenti sulla membrana plasmatica e successivamente venga trasferita nel citoplasma cellulare mediante un meccanismo di macropinosi.

Una volta liberata all'interno della cellula la proteina coniugata alla sequenza TAT tende a localizzarsi a livello del nucleo e dell'apparato del Golgi (Koutsokeras A et al., 2009)

4. Rigenerazione neuronale e ingegneria tissutale

Negli ultimi anni le conoscenze sul meccanismo di rigenerazione tissutale, sia a livello cellulare che molecolare, sono fortemente progredite. In particolare, si è raggiunto un sensibile progresso nel campo della biologia molecolare con la caratterizzazione dei segnali molecolari solubili capaci di regolare, modulare e controllare il reclutamento, la differenziazione e l'attività delle cellule implicate nel processo di formazione e rimodellamento tissutale. Nel nostro organismo molti sono i tessuti e gli organi che a causa di patologie o traumi non sono più in grado di svolgere le loro funzioni sia dal punto di vista strutturale che metabolico. Fino a poco tempo fa l'uso di protesi e, nei casi più gravi, il trapianto, rappresentavano l'unica possibilità per far fronte a queste condizioni patologiche (Terada et al., 2000). Negli ultimi anni si sta sviluppando nel campo della medicina rigenerativa una nuova branca che prende il nome di *ingegneria tissutale*. Con questo termine, che traduce l'espressione anglosassone "*tissue engineering*" coniata ufficialmente nel 1988 dalla National Science Foundation, si indica quel campo multidisciplinare che progetta e realizza innovative strategie di terapia finalizzate alla stimolazione in vivo di un processo rigenerativo (Langer et al., 1993). L'ingegneria tissutale rappresenta il punto di incontro di diverse discipline scientifiche quali la medicina, la biologia, l'ingegneria e la chimica, con lo scopo comune di ottenere o sostituire organi o parte di organi del corpo umano mediante sostituti biologici formati da un biomateriale e cellule autologhe tessuto

specifiche o staminali multipotenti, oppure semplicemente costituiti da molecole bioattive quali fattori di crescita complessate con specifici sistemi di veicolazione quali collagene o matrici polimeriche sintetiche (PLA, PLLA). Tra i fattori di crescita maggiormente studiati ed utilizzati ricordiamo il PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine), HGF (fattore di crescita degli epatociti), FGF (fattore di crescita fibroblastica), NGF (fattore di crescita neuronale) che stimola la migrazione cellulare e l'estensione dei neuriti, EGF (fattore di crescita dell'epidermide) un potente stimolatore della proliferazione cellulare, la famiglia dei TGF- β (fattore di crescita trasformante) di cui fanno parte anche le BMP (proteine morfogenetiche dell'osso) I fattori di crescita impiegati nella ingegneria tissutale possono essere ottenuti per purificazione da estratti tissutali, mediante terapia genica o tecnica del DNA ricombinante (Whitaker et al., 2001). Il controllo dei processi di crescita è fondamentale per rigenerare circuiti nervosi complessi, garantirne il corretto funzionamento e permetterne la riparazione dopo una lesione. In tutte queste condizioni, i meccanismi regolatori implicano segnali ambientali precisamente distribuiti nello spazio e nel tempo, i quali modulano le proprietà intrinseche delle cellule bersaglio.

Il danno e l'infarto cerebrale rappresentano le principali cause di morte e disabilità neuromotorie (Green and Shuaib 2006), spesso accompagnate da malattie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer o di Parkinson (Wen et al, 2008). I trattamenti attualmente disponibili sono molto limitati ed includono la stabilizzazione, il monitoraggio, la neurochirurgia, e la riabilitazione. In particolare i trattamenti chirurgici sono finalizzati a prevenire i danni secondari mantenendo un regolare flusso sanguigno e di ossigeno al cervello e minimizzando l'infiammazione e la pressione intracranica.

Ma per prevenire problemi neurofisiologici e problemi cognitivi è richiesto un intervento specifico che ristabilisca le connessioni neuronali.

I comuni approcci terapeutici includono l'uso di farmaci che dissolvono coaguli di sangue quale l'attivatore del plasminogeno in forma ricombinante rt-PA, l'arteriectomia e la somministrazione di farmaci ad attività neuroprotettiva. Attualmente, due principali approcci sono stati formulati per minimizzare la perdita neuronale e migliorare l'innervazione cerebrale: la stimolazione della neurogenesi endogena e l'impianto di cellule con potenziale neurorigenerativo. Alcune evidenze sperimentali lasciano credere che dopo un danno o infarto cerebrale, si attivi un processo endogeno di neurogenesi e crescita neuritica (Greenberg and Jin 2006) stimolata dalle cellule infiammatorie (neutrofilo, microglia, macrofagi, e cellule T), progenitori gliali, e astrociti a livello della regione del danno ed attiva nella zona subventricolare e zona subgranulare (SVZ e SGZ); (Sundholm-Peters et al. 2005). Sfortunatamente, la neurogenesi endogena e la crescita neuritica spesso sono impediti dalla mancata migrazione dei neuroblasti generati nelle zone SVZ e SGZ a causa dell'inibizione indotta dai proteoglicani quali condroitin solfato ed eparansolfato. In tale direzione, sono in fase di sperimentazione farmaci a base di enzimi quali condroitinase ABC in combinazione con fattori di crescita, neurotrofine o citochine (Tropea et al 2003). Questo trattamento combinato è basato sul concetto secondo cui la condroitinase può regolare il legame dei proteoglicani al fattore di crescita fibroblastico (FGF2), il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), il fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale (GDNF) BMP e altri fattori (Fisher et al., 2006), favorendo la progressione dei neuroblasti dalla zona SV e SGZ alla regione del danno neuronale.

SCOPO DELLA TESI

La proteina ricombinante utilizzata in questo lavoro di tesi, chiamata hTAT-OP1 è costituita da 162 aminoacidi e può essere suddivisa in due porzioni.

La regione N-terminale è formata da 30 aminoacidi di cui 11 appartenenti al dominio di trasduzione proteica TAT e da sei istidine, funzionali al processo di purificazione della proteina.

La regione C-terminale è costituita da 132 aminoacidi corrispondenti ai residui 300 – 431 della proteina nativa, ovvero la porzione attiva di OP-1. Inoltre, questa regione comprende l'esapeptide segnale per il taglio enzimatico da parte di una peptidasi tripsino-simile ed il dominio funzionale di sette cisteine (*Figura 1*), essenziale per il folding della proteina.

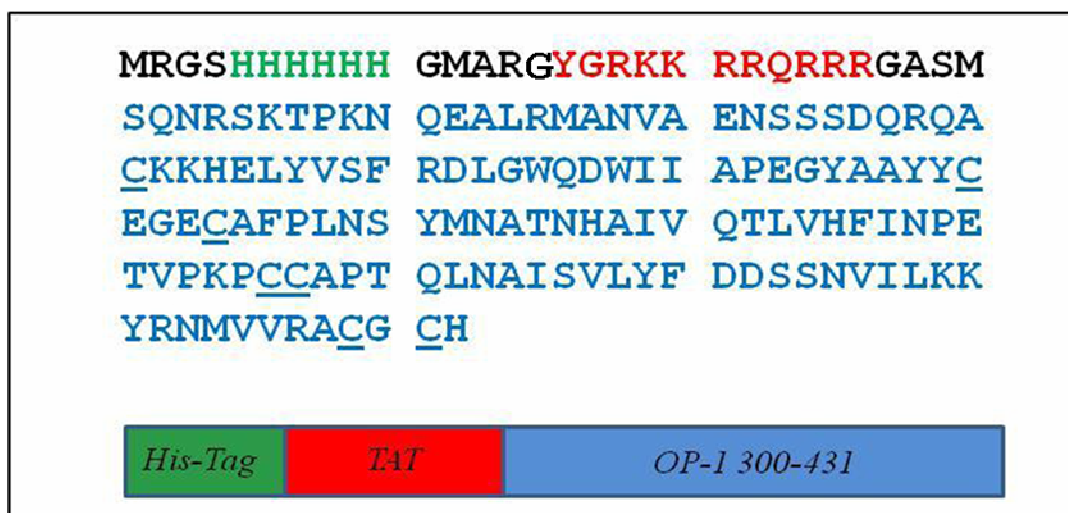


Figura 1. Sequenza e rappresentazione schematica di hTAT-OP1.

hTAT-OP1 che è stata precedentemente preparata e purificata, è stata progettata quale prodotto funzionale a garantire A) un adeguato stimolo differenziativo per una eventuale applicazione medica; B) un efficace sistema di veicolazione intracellulare; C) bassi costi di produzione, ovviando al laborioso e costoso processo di rinaturazione *in vitro*. Studi preliminari su colture di preosteoblasti MC3T3E1 hanno dimostrato che la proteina hTAT-OP1 viene veicolata in forma denaturata in sede intracellulare mediante il dominio di trasduzione proteico TAT e, dopo refolding presumibilmente mediato dai sistemi cellulari delle heat shock protein, esplica la sua attività biologica (Di Liddo R. et al. 2010). E' verosimile pensare che tale attività sia esercitata dalla sequenza OP1 mediante interazione a livello dei recettori specifici di membrana (BMPR) appartenenti alla via del segnale BMP. In questo lavoro di tesi è stato eseguito uno studio di trafficking cellulare della proteina hTAT-OP1 e un'analisi del potenziale neurogenico testando l'effetto sulla proliferazione cellulare, sullo sviluppo di neuriti e sulla sintesi ed organizzazione dei neurofilamenti in cellule PC12.

MATERIALI E METODI

1. Preparazione, purificazione e caratterizzazione della proteina ricombinante umana TAT-OP1

La preparazione della proteina ricombinante umana TAT-OP1 ha previsto, come riportato in un precedente lavoro di tesi di Dottorato (Boran C. Tesi di dottorato) il clonaggio della sequenza genica corrispondente alla regione 300-431 della proteina nativa OP1 e la sua successiva inserzione nel vettore di espressione pTAT- α -synA30P. Dopo trasformazione di batteri BL21 e stimolazione mediante isopropil β -tiogalattopiranoside (IPTG), la proteina è stata isolata a partire dai lisati cellulari e purificata in prima fase mediante Cromatografia di Affinità con Ioni Metallici Immobilizzati (IMAC) e successivamente con cromatografia di gel filtrazione mediante colonnina PD10 preimpaccata con gel Sephadex G-25 (Pharmacia). Le frazioni raccolte sono state analizzate mediante SDS-PAGE e la concentrazione proteica è stata misurata mediante uno spettrofotometro UV-VIS. Per gli studi biologici, il prodotto ricombinante è stato ulteriormente purificato mediante cromatografia a fase inversa HPLC (cromatografo LKB-Pharmacia). L'analisi mediante lo spettrometro API-TOF Mariner (PerSeptive Biosystems, Stratford, Texas) ha consentito di determinare il peso molecolare della proteina purificata. La caratterizzazione dell'estremità C-terminale è stata eseguita dopo carbamidometilazione mediante spettrometria di massa.

2. Coltura di cellule PC12

Le cellule PC12 derivate da feocromocitoma di ratto sono state acquistate dalla European Cell Cultures Collection (EACC, Porton Down, Wilts, UK) e coltivate

in sospensione in terreno RPMI, addizionato con glutammina (2mM), Horse Serum (HS) (10%), Fetal Calf Serum (FCS) (5%), penicillina (100 ug/ml) e streptomina (100 ug/ml) (Sigma-Aldrich). Le colture sono state mantenute ad una concentrazione compresa tra 3×10^5 - 5×10^5 cellule /ml a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e CO₂ al 5%. A giorni alterni le sospensioni cellulari sono state diluite 1:2 con terreno fresco. Per gli studi di attività biologica e trafficking cellulare, sono state utilizzate colture in adesione ottenute mediante la semina su piastre condizionate con Collagene IV (1µg/cm²) (Sigma-Aldrich) in terreno DMEM (Gibco) addizionato con FBS allo 0,5% (Sigma-Aldrich).

3. Saggio di vitalità cellulare MTS

Il saggio di vitalità cellulare è stato allestito utilizzando il kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Questo saggio colorimetrico sfrutta la riduzione, da parte delle deidrogenasi mitocondriali attive in cellule vive, del composto tetrazolico MTS (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio) nel prodotto colorato formazano. La lettura dell'assorbanza a 490 nm del terreno di coltura in cui è rilasciato il sale viene correlata al numero di cellule vitali presenti nella coltura. Lo studio di vitalità è stato eseguito su colture trattate con hBMP7 (2nM) (Sigma-Aldrich), hTAT-OP1 (2 nM, 200nM), in presenza o meno di NGF (1,8nM) (Sigma-Aldrich). I controlli negativi sono stati allestiti in terreno di espansione mentre le colture trattate con NGF (1,8nM) sono state utilizzate come controllo positivo di stimolazione neurogenica. Dopo 24 ore dalla semina (2×10^4 cellule/cm²), in piastre di 96 pozzetti precondizionate con Collagene IV (Sigma-Aldrich), il terreno di crescita è stato sostituito con terreno contenente DMEM (Gibco), FBS (0,5%) (Sigma-Aldrich) e le

proteine hTAT-OP1, hBMP7, utilizzate singolarmente o insieme con NGF. Ad intervalli di 24 ore, 72 ore e 7 giorni, il terreno di coltura è stato rimosso e in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 120 µl di terreno contenente DMEM e MTS (20%). Dopo 2 ore di incubazione a 37°C, 100µl di terreno sono stati prelevati da ciascun campione e sottoposti a lettura spettrofotometrica a 490 nm utilizzando il lettore ELISA Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments). Ogni trattamento è stato eseguito in triplice replica e l'analisi statistica è stata effettuata tramite ANOVA e test di Student (*t-test*). I risultati finali, media di tre esperimenti, sono stati espressi come numero di cellule vitali.

4. RT-PCR: Reazione di Retro Trascrizione e Polimerizzazione a catena

Lo studio di espressione dei recettori specifici per le proteine BMP è stato eseguito utilizzando le coppie di primer indicati in Tabella 1, ed acquistati da Eurofins mwg operon.

Nome	Sequenza 5'→3'
L19 F	CTGAAGGTGAAGGGGAATGT
L19 R	AAGTCTTGATGATCTCCTCC
BMPR-II F	AGGGATGACTTCCTCGCTGC
BMPR-II R	CTGTATCCAAAGCATAAGGC
ActR-II F	GGGAAAATGGGAGCTGCTGC
ActR-II R	CCTGTACACCCAAAATGCAC
ActR-IA F	AGTGCTGCCAAGGGGACTGGTG
ActR-IA R	GGTCCCAAATATCTCTATGTGC
BMPR-IA F	ACATCAGATTATTGGGAGCC
BMPR-IA R	TGTAACAAAACGAGCTGGAG
BMPR-IB F	ACTCCATTCCTCATCAAAG
BMPR-IB R	GGTGAAGAACACTTTCACAG

Tabella 1. Coppie di primer utilizzati per l'analisi di espressione mediante RT-PCR dei recettori delle proteine BMP (Robert U. *et al.* Mol. Vision 2004)

4.1 Estrazione di mRNA

Su colture PC12 aderenti alle piastre condizionate con collagene IV è stata eseguita l'estrazione di mRNA. Dopo distacco meccanico, i campioni sono stati centrifugati a 1200 rpm per 5 minuti, risciacquati in PBS freddo ed infine trattati con 0,3ml di soluzione Trizol (Invitrogen). Il lisato cellulare è stato prelevato e incubato per 5 minuti in un tubo non contenente RNase. Dopo l'aggiunta di 0,2ml di Cloroformio (Sigma-Aldrich), i campioni sono stati agitati per 15 secondi, incubati per 10 minuti a temperatura ambiente ed infine centrifugati a 12000 g per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa è stata prelevata, trasferita in un tubo sterile e trattata con 0,5ml di isopropanolo per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione a 12000 g per 10 minuti a 4°C, il pellet è stato risospeso in 50 µl di acqua non contenente RNase (Invitrogen) dopo un lavaggio in etanolo (75%) e centrifugazione per 5min a 7500 g a 4°C.

4.2 Quantificazione spettrofotometrica di mRNA estratto

La quantificazione spettrofotometrica è stata eseguita mediante lo strumento DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer (Beckman).

Ogni misura è stata effettuata con 1µl di campione, per determinare una densità ottica a 260 nm (OD₂₆₀) compresa tra 0.1 e 1.0. Dopo aver sottratto il valore di densità ottica relativa al bianco la concentrazione di RNA estratto è stata calcolata considerando che 1 OD₂₆₀ corrisponde ad una concentrazione di 50 µg/µl.

Su ogni campione è stata eseguita la misura della densità ottica a 280 nm (OD₂₈₀) per determinare il rapporto OD₂₆₀/OD₂₈₀ che, compreso tra 1.8 e 2.0, è significativo della purezza del RNA estratto.

4.3 Reazione di RT-PCR

Le reazioni di retrotrascrizione e di amplificazione sono state eseguite utilizzando il kit One Step (Qiagen). La miscela di reazione è stata preparata nel modo seguente: acqua RNase free (Invitrogen), buffer 5x, dNTPs, primer, la mix di enzimi retrotrascrittasi e Taq polimerasi, inibitore di RNase (tutti i precedenti reattivi sono presenti nel kit Qiagen), RNA per un volume finale di reazione di 50 µl. Il controllo negativo è stato preparato omettendo l'aggiunta di RNA. La reazione one step è stata eseguita utilizzando il termociclatore PTC -100 (MJ research inc.) con il programma che ha previsto una incubazione iniziale di 30 minuti a 50°C, una predenaturazione di 15 minuti a 95°C e 36 cicli di reazione così strutturati: 1 minuto a 94°C (denaturazione), 1 minuto ad una temperatura di 1 grado inferiore a quella di melting dei primer (annealing), e 8 minuti a 72°C (allungamento).

4.4 Elettroforesi su gel di agarosio

L'analisi elettroforetica dei prodotti di reazione PCR è stata eseguita su gel di agarosio (Sigma-Aldrich) preparato allo 1,5% in soluzione tampone TBE 1X (0,04 mM tris-Borato, 0,001M EDTA pH 8) (Invitrogen) ed utilizzando Etidio Bromuro (0,5 µg/ml) (Sigma-Aldrich). E' stata quindi lasciata solidificare per circa 30 min. Ogni campione è stato caricato con 2 µl di soluzione colorante Blue Juice (Invitrogen). Come riferimento di pesi molecolari tra 100 e 1200 pb, è stato utilizzato il prodotto DNA Mass Ladder (Invitrogen). La visualizzazione delle bande dei campioni amplificati è stata eseguita per esposizione ai raggi UV per mezzo dello strumento Gel Doc (BioRad).

5. Studio del trafficking cellulare e della morfogenesi

Per gli esperimenti di differenziamento le cellule sono state seminate ($1 \times 10^4 - 3 \times 10^4$ cellule/cm²) in pozzetti di piastre da 12 pozzetti (Becton Dickinson) pretrattati con collagene IV (1µg/cm²) e coltivate in DMEM (Gibco) addizionato con FBS (0,5%) (Sigma-Aldrich). Dopo 24 ore, le cellule sono state trattate con NGF (1,8nM), hBMP-7 (2nM) e hTAT-OP1 (2nM, 200nM). L'effetto della combinazione di hBMP7 e hTAT-OP1 con NGF è stato valutato. Il trattamento è stato eseguito per una durata totale di 7 giorni con cambi di terreno a giorni alterni. Le valutazioni di trafficking cellulare e le analisi di morfogenesi hanno previsto l'utilizzo dell' immunofluorescenza e del western blotting.

5.1 Western Blotting

Per la preparazione degli estratti cellulari le cellule sono state seminate su piastre di coltura (Beckton-Dickinson) pretrattate con collagene tipo IV (1µg/cm²) alla densità sopra riportata. Ad intervalli di 24 ore e 7 giorni di trattamento, i campioni sono stati risciacquati in PBS 1X freddo, distaccati dalla piastra per modalità meccanica e centrifugati per 5 minuti, a 1200 rpm a 4°C. Dopo aver rimosso il surnatante, i precipitati sono stati trattati con 120ul di buffer di lisi (1% v/v Triton-X100, 0.5% p/v Sodio Desossicolato, 0,15M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.6, 1% cocktail di inibitori di proteasi (Sigma –Aldrich)), spipettati utilizzando una siringa da insulina con ago da 29G, ed infine centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante è stato quindi raccolto per la successiva quantificazione.

Per lo studio di trafficking sono stati raccolti campioni dopo 2, 6, 24, 48ore dal termine del trattamento con hTAT-OP1 200nM e hBMP7 2nM. Per verificare

l'espressione dei neurofilamenti, i lisati cellulari sono stati raccolti dopo 24ore e 7 giorni di trattamento con NGF, hBMP-7 e hTAT-OP1, quest'ultimi usati da soli o combinati con NGF.

5.1.1 Quantificazione degli estratti cellulari

Per quantificare gli estratti cellulari è stato utilizzato il BCA Protein Assay kit (Pierce) che sfrutta il metodo colorimetrico dell'Acido Bicinconinico. Le soluzioni A (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Tartrato di Sodio, Acido Bicinconinico in una soluzione 0,1M di NaOH) e B (soluzione al 4% di Cu_2SO_4) sono state miscelate in proporzione 50:1 rispettivamente per un volume finale di 1 ml. E' stata preparata una curva di taratura utilizzando campioni standard a concentrazione nota di albumina sierica bovina (BSA) e considerando 8 punti da 0 $\mu\text{g}/\text{ul}$ a 2000 $\mu\text{g}/\text{ul}$. Standard e campioni sono stati aggiunti in volume di 50 μl alla miscela di reattivi A+B e dopo agitazione per 30 secondi sono stati incubati per 30 minuti a 37°C. La lettura spettrofotometrica è stata eseguita sullo strumento DU 530 Life Science UV/Vis (Beckman) alla lunghezza d'onda di 562nm.

5.1.2 Sodio Dodecil Solfato Poliacrilamide Gel Elettroforesi (SDS-PAGE)

Sul gel sono stati caricati 25 μg -50 μg di ciascun campione. Dopo riduzione in una soluzione contenente 50nM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glicerolo, 5% β -Mercaptoetanolo, 0,03% Blu di Bromofenolo e successiva ebollizione a 96°C per 5 minuti, un volume totale di 20 μl -50 μl di miscela è stato caricato su un gel di poliacrilamide discontinuo costituito da 10ml di gel Stacking (4% Soluzione Acrilamide/bis-Acrilamide 37:1, 125mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 100 μl

Ammonio persolfato (APS), 16ul TEMED (Sigma Aldrich)) e 20ml di gel Running (10%-12% Soluzione Acrilamide/bis-Acrilamide 37:1, 375mM Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 70ul APS, 15 ul TEMED), colato e montato su cella per elettroforesi VP-140 (Elettrofor). I campioni sono stati sottoposti ad una corrente costante di 60 mA per 2 ore e 30minuti in tampone di corsa costituito da: 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glicina, 0,03% SDS. Dopo la separazione mediante corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (GE Amersham) con porosità 0,45µm preidratata in acqua mQ ed equilibrata per 15 minuti in tampone di trasferimento contenente 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glicina, 0,03% SDS, 20% Metanolo. Successivamente è stato assemblato l'apparato di trasferimento ed un campo elettrico costante ortogonale al gel di 400 mA è stato generato per un tempo di 90 minuti , per lo studio di trafficking e di 8 ore per lo studio di espressione dei neurofilamenti.

5.1.3 Immunoblotting mediante SNAP i.d.

Per la rivelazione della presenza di hTAT-OP1, dei Neurofilamenti ad alto medio e basso peso molecolare e delle proteine SMAD1/5/8 fosforilate in cellule PC12 sono stati utilizzati rispettivamente anticorpi mouse anti His-Tag specifico per la coda di 6 istidine presente in hTAT-OP1, mouse Anti Neurofilament H/M/L (Sigma Aldrich) e rabbit anti P-SMAD1/5/8 (Cell Signaling Technology). Per l'immunorivelazione delle proteine è stato utilizzato il sistema SNAP i.d. (Millipore). Questo è un dispositivo che prevede l'applicazione di una pressione negativa sulla membrana dopo ogni incubazione utilizzando un sistema di diffusione attiva dei reagenti sulla membrana, riducendo i tempi di incubazione della membrana rispetto al sistema tradizionale. Il primo passo è l'incubazione

istantanea della membrana con una soluzione di saturazione dei siti aspecifici composta da TBS-T (Tris HCl pH 7.6, NaCl, 0,1% Tween) allo 0,5% in latte scremato. Dopo l'applicazione del vuoto, che fa attraversare la soluzione in ogni punto della membrana, è stata aggiunta una soluzione di anticorpo primario 1:300 per 10 minuti in TBS-T. Al termine del periodo di incubazione la soluzione di anticorpo è stata aspirata e successivamente sono stati eseguiti 3 lavaggi con TBS-T. In seguito, la membrana è stata incubata per 10 minuti con una soluzione (1:2000) di anticorpo secondario Anti mouse-HRP (GE Amersham) per anti His-Tag e Anti Neurofilament H/M/L mentre l'anticorpo secondario Anti rabbit-HRP (GE Amersham) è stato utilizzato per anti P-SMAD1/5/8. La membrana è stata lavata per tre volte con TBS-T.

5.1.4 Rivelazione

La rivelazione è stata eseguita secondo il protocollo suggerito dalla ditta fornitrice del kit ECL (GE Amersham) ed ha previsto l'incubazione per 1 minuto della membrana con 0,125ml/cm² di soluzione di rivelazione, costituita dalle soluzioni A e B in proporzione 1:1. Una volta asciugata, la membrana è stata posta in cella di esposizione, al buio, e a contatto con una lastra autoradiografica (GE Amersham) per un tempo variabile da 1 a 30 minuti. Successivamente la lastra impressionata è stata sviluppata tramite incubazione in liquido di sviluppo X-OMAT EX II e di fissaggio RP X-OMAT LO (Kodak).

5.2 Immunofluorescenza e Microscopia confocale

La marcatura delle proteine cellulari mediante anticorpi è stata eseguita su cellule seminate su chambers slides (Falcon BD), lavate in PBS 1X freddo e fissate in

metanolo per 10 minuti a -20°C e successivamente per 1 minuto in acetone a -20°C. Sono stati eseguiti 3 lavaggi di 5 minuti a temperatura ambiente con PBS 1X. E' stata eseguita la permeabilizzazione della membrana cellulare mediante trattamento per 6 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di acqua distillata contenente Triton X-100 (Sigma-Aldrich) all'1%. In seguito, i campioni sono stati lavati con PBS 1X e incubati con una soluzione al 10% di BSA in PBS 1X e mantenuta a temperatura ambiente per 10 minuti.

A questo punto, i campioni sono stati incubati per 1 ora con anticorpo primario diluito 1:100 in PBS 1x all' 1% BSA a temperatura ambiente. Gli anticorpi primari utilizzati nei diversi esperimenti sono stati : mouse anti-his-Tag (sigma-Aldrich), mouse anti hBMP7 (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti Neurofilamenti H/M (Sigma-Aldrich). Dopo tre lavaggi di 5 minuti con PBS 1X, è stato aggiunto l'anticorpo secondario anti isotipo coniugato ad Alexa 488 o 594 diluito 1:200 in PBS 1X addizionato con BSA (1%) e l'incubazione è stata eseguita per 30 minuti a temperatura ambiente. I preparati così ottenuti sono stati montati con montante acquoso per fluorescenza contenente DAPI (4-6 diamidino-2-fenilindolo) (Vecta-Shield). I controlli negativi sono state allestiti omettendo l'anticorpo primario. I preparati sono stati osservati con microscopio confocale Leica TCS-SP5 (Leica Instrument), dotato di obiettivi con ingrandimenti HCXPL Fluotar 20X/0.5 a secco, HCXPL Apo 40X/1.25, HCXPL Apo 63X/0,5 entrambi ad immersione in olio. L'acquisizione di immagini è stata realizzata mediante il programma LAS AF (Leica Instrument).

5.3. Analisi della crescita dendritica

Dopo 24 e 7 giorni di trattamento, le cellule sono state lavate per 3 volte con PBS 1X e fissate in soluzione di formaldeide al 4% per una notte a 4°C. Dopo lavaggio in PBS 1X le cellule sono state trattate per 10 secondi con una soluzione di blu di toluidina preparata allo 0,5% (p/v) e successivamente lavate per 3 volte con acqua. I campioni sono stati poi osservati al microscopio DM/IL (Leica) ad un ingrandimento X 200 per lo studio della crescita di dendriti. La quantificazione della crescita dendritica ha previsto l'acquisizione di 5 immagini per campione e 100 cellule totali per campo. Sono state considerate positive le cellule esprimenti ramificazioni di lunghezza maggiore od uguale al diametro del corpo cellulare. I dati sono stati espressi come media % e l'analisi statistica è stata svolta mediante ANOVA e test di Student.

RISULTATI

1. Proteina hTAT-OP1

In un precedente lavoro (Boran C. Tesi di dottorato “Produzione, caratterizzazione e studio dell’attività biologica di TAT-OP1 fattore osteogenico per l’ingegneria tissutale”), è stata messa a punto la preparazione e la purificazione della proteina hTAT-OP1. Il costrutto è stato ottenuto tramite tecnica di DNA ricombinante, isolato mediante cromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati (IMAC) e purificato attraverso cromatografia liquida a fase inversa (RP-HPLC). hTAT-OP1 è stata poi caratterizzata tramite SDS-PAGE, e spettrometria di massa stabilendo per il costrutto un peso molecolare pari a 18,52 kDa (Fig 1A). La caratterizzazione dell’estremità C-terminale ha confermato dopo carbamidometilazione, la presenza del dominio funzionale formato da sette cisteine (Fig 1B). Successivi studi di stabilità in soluzione tramite analisi UV e dicroismo circolare hanno portato a stabilire che hTAT-OP1 è stabile in soluzione acquosa al 60% MeCN e allo 0,05% TFA sino a tre mesi a 4°C. Nessuna citossicità è stata osservata su colture cellulari MC3T3-E1 dopo trattamento con hTAT-OP1 (500 ng/ml e 100 ng/ml).

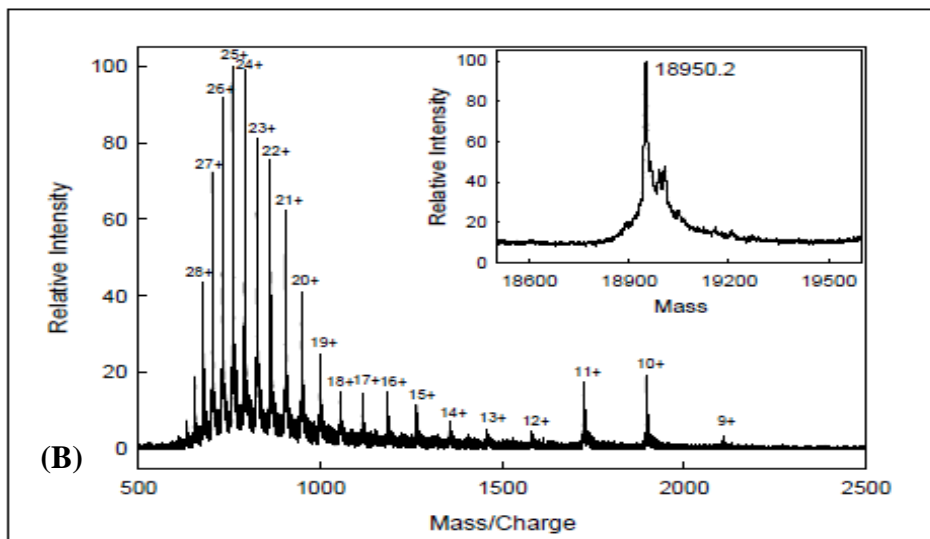
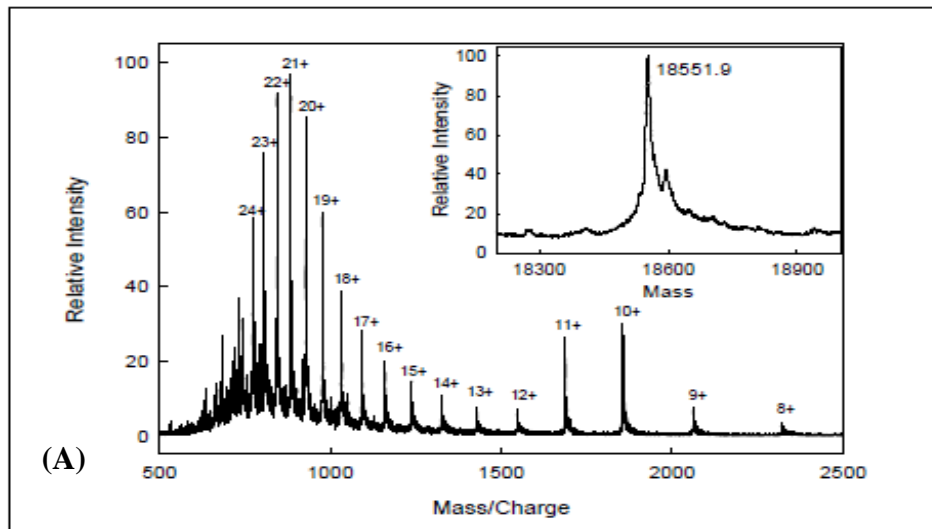


Figura 1 :spettri ESI TOF multiprotici e deconvoluti della proteina ridotta(A) e carbamidometilata (B)

2. Studio di trafficking cellulare

Per dimostrare l'adeguatezza del modello sperimentale delle PC12 allo studio di caratterizzazione delle potenzialità neurogeniche della proteina hTAT-OP1, è stata valutata l'espressione dei recettori specifici delle BMP (BMPR) implicati nella trasmissione del segnale in sede citoplasmatica e nucleare. Come mostrato in Fig 2, è stata osservata l'espressione come mRNA di recettori di tipo I quali ActR-IA, BMPR-IA di tipo II quali BMPR-II e ActR-II.

Questo dato ha portato quindi a stabilire che il modello cellulare utilizzato è utile per verificare se l'attività del nostro costrutto si esprima attraverso l'interazione con i recettori alle BMP.

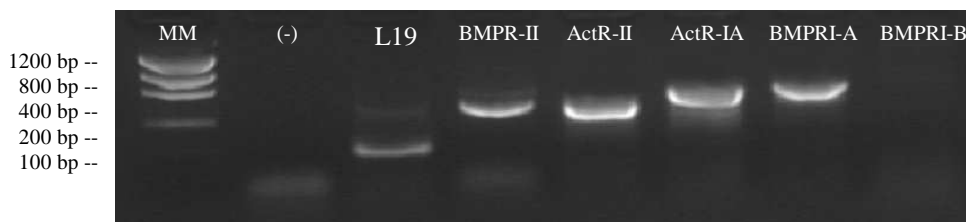


Fig.2 Espressione dei recettori BMPR in cellule PC12. L'mRNA è stato sottoposto a reazione di RT-PCR per determinare la presenza dei recettori BMPR di tipo I (ActR-IA, BMPR-IA, BMPR-IB), e di tipo II (BMPRII, ActRII). Come controllo positivo di reazione è stato utilizzato il gene housekeeping L19. (MM) Standard di peso molecolare; (-) controllo negativo.

2.1 Determinazione dell'ingresso di hTAT-OP1 in PC12

La proteina ricombinante OP1 è stata preparata come prodotto di fusione con la sequenza TAT allo scopo di ottenere un uptake cellulare veloce, la traslocazione attraverso la membrana citoplasmatica in forma denaturata ed il refolding intracellulare. Il meccanismo di azione della proteina nativa BMP7 prevede l'interazione con recettori di membrana del tipo BMPR-I e II. (Chen D. et al., Growth Factors 2004). Sulla base di tale evidenza, abbiamo ipotizzato che il costrutto hTAT-OP1 entri velocemente all'interno delle cellule mediante la

sequenza TAT e, dopo refolding, si porti in sede extracellulare per esplicitare la sua azione a livello di membrana. Tale ipotesi è stata verificata mediante studi di western blotting, e di immunofluorescenza.

2.1.1 Western Blotting

I lisati cellulari di campioni trattati con hTAT-OP1 200nM per 24 ore, sono stati separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. La presenza della proteina è stata rilevata mediante l'anticorpo anti his-tag che identifica la coda di 6 istidine presente all'estremità N terminale del costrutto. In figura 2 una banda di peso molecolare corrispondente a quello della proteina hTAT-OP1 è stata osservata subito dopo la fine del trattamento (T0) e sino a 6 ore dal termine del trattamento (T6). Il segnale è risultato assente nei campioni analizzati in tempi successivi ovvero a T24 e T48.

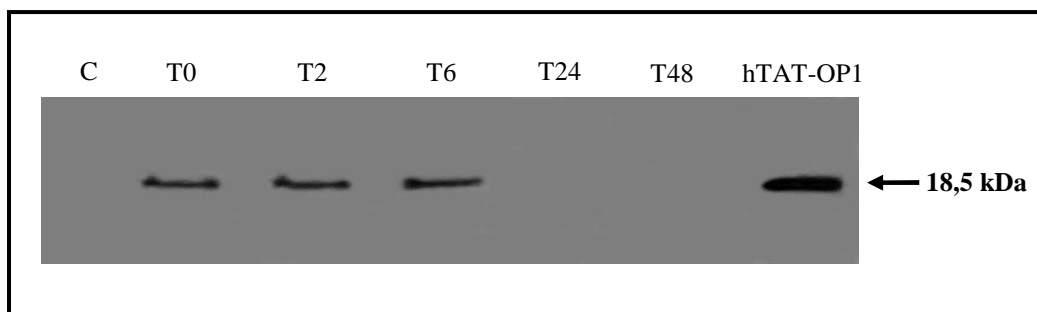


Figura 2 Internalizzazione della proteina hTAT-OP1 in cellule PC12. Dopo trattamento di 24 ore con una soluzione di hTAT-OP1 (200nM), la presenza della proteina è stata valutata mediante western blotting a differenti intervalli di tempo (T0, T2, T6, T24, T48) dal termine del trattamento. L'analisi è stata condotta con anticorpo anti his-tag, specifico per la coda di istidine presente all'N terminale del costrutto hTAT-OP1.

L'assenza di segnale a 24 ore e 48 ore dal termine del trattamento potrebbe essere dovuta all'assenza del costrutto in sede intracellulare per avvenuta traslocazione extracellulare o alla sua mancata visualizzazione come prodotto di 18,5 KDa dopo

lisi enzimatica a livello dell'esapeptide-segnale presente nella regione N-terminale (Brunner et al, 1988).

2.1.2 Immunofluorescenza

Per meglio caratterizzare tale aspetto, è stato ritenuto opportuno eseguire uno studio di trafficking cellulare del costrutto mediante localizzazione del segnale relativo alla sequenza TAT ed OP1 nelle cellule trattate con il costrutto ricombinante, tramite immunofluorescenza. Il trattamento ha previsto l'utilizzo della proteina hTAT-OP1 alla concentrazione di 200nM e la sua durata è stata di 24 ore. L'analisi è stata eseguita a differenti intervalli di tempo (T0, T2, T6, T24 e T48 ore) dal termine del trattamento, utilizzando un anticorpo specifico per la regione N-terminale (anti his-tag) ed uno specifico per la sequenza hBMP7 corrispondente ai residui AA 300-431. Dopo incubazione con l'anticorpo secondario coniugato ad Alexa 594 (segnale rosso) e Alexa 488 (segnale verde) (fig. 3), è stata osservata una diversa localizzazione intracellulare dei due segnali. In particolare, al termine del trattamento (T0) e dopo 6 ore (T6) i siti di legame dei due anticorpi sono risultati a livello della membrana e del citoplasma. A tempi tardivi (T24) il segnale dell'his-tag si localizza solo a livello nucleare, con un pattern tipicamente nucleolare, mentre il segnale dell'OP1 si osserva sulla membrana. Tali dati lasciano ipotizzare che il costrutto in sede citoplasmatica venga scisso in due porzioni di cui la sequenza contenente his-tag venga traslocata a livello del nucleo, mentre la porzione corrispondente alla proteina hOP1 "presumibilmente" fuoriesca dalle cellule per legarsi ai recettori specifici di membrana.

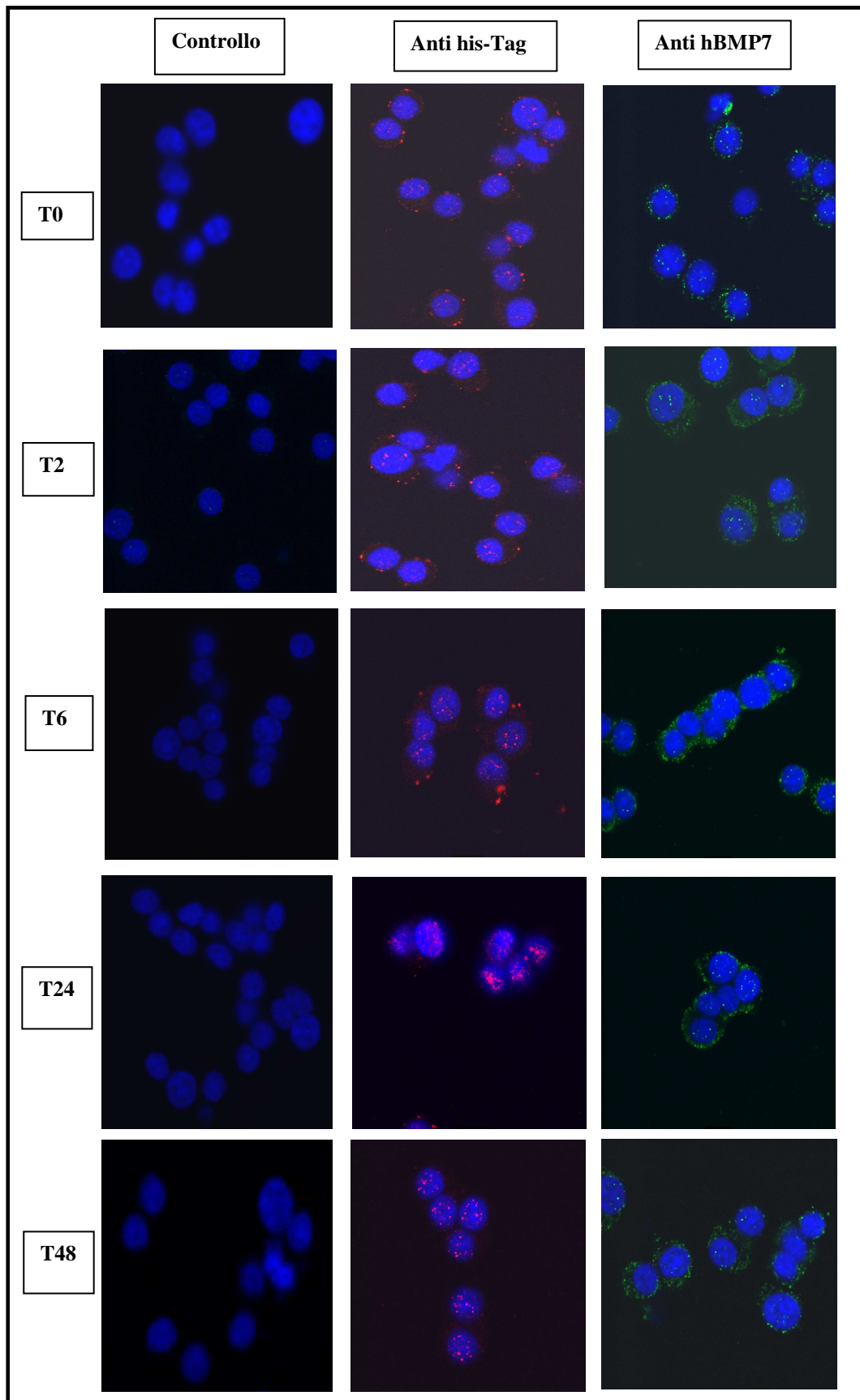


Figura 3. Localizzazione del segnale relativo a TAT e OP1 in cellule PC12. Dopo 2, 6, 24, 48 ore dal termine del trattamento (T2, T6, T24, T48) ed al termine (T0), le cellule sono state fissate e marcate con l'anticorpo anti his-tag (spot rossi) specifico per la coda di istidine e con l'anticorpo anti BMP7 specifico per la porzione OP1 (residui 300-431) (spot verdi). (Ingrandimento x630).

2.2 Determinazione dell'attività biologica di hTAT-OP1

Per dimostrare che a livello di membrana la sequenza OP1 si lega al complesso recettoriale specifico esplicando un'attività biologica, è stata verificata l'avvenuta fosforilazione delle SMA1/5/8 dopo induzione cellulare con il costrutto hTAT-OP1. Le proteine SMAD1/5/8 sono coinvolte nella via del segnale delle proteine BMP e si attivano per fosforilazione in seguito al legame delle BMP con i recettori di membrana. Agiscono da secondo messaggero traslocando, unitamente alla SMAD 4, a livello del nucleo dove promuovono una specifica attività sull'espressione genica. Anche in questo caso ci si è avvalsi della tecnica di western blotting e lo studio è stato eseguito su campioni PC12 trattati per 24 ore con hTAT-OP1 (200nM) e marcati con l'anticorpo specifico anti SMAD 1/5/8 fosforilate (fig.4), dopo trasferimento dei lisati proteici su membrana di nitrocellulosa.

L'analisi ha evidenziato la presenza di una banda del peso atteso di 60 kDa nei campioni raccolti dal termine del trattamento (T0) fino a 24 ore (T24) (fig. 4). Risultati analoghi sono stati osservati in campioni trattati con hBMP7 utilizzata alla concentrazione 2nM. In figura 4, è evidente un calo dell'espressione di SMAD 1/5/8 in forma fosforilata nei campioni mantenuti in coltura per 48 ore dopo il trattamento con hTAT-OP1 e hBMP7.

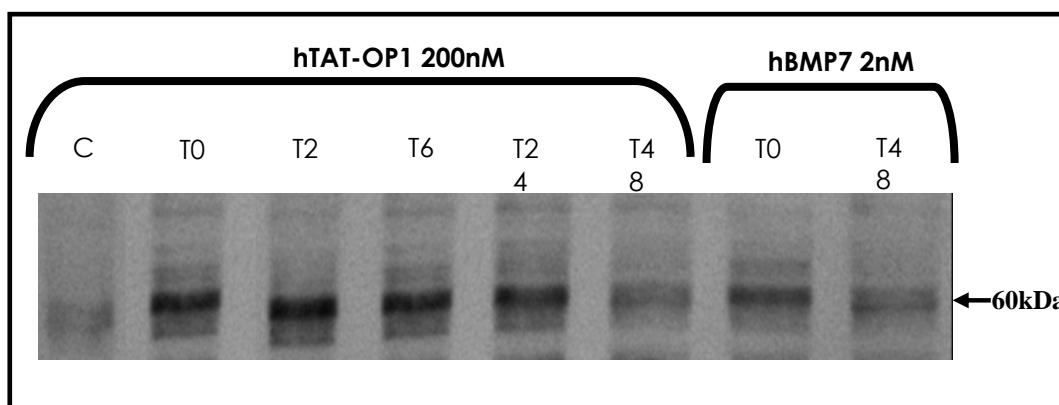


Figura 4 Attivazione del complesso proteico SMAD 1/5/8 da parte di hTAT-OP1. Cellule PC12 sono state trattate per 24 ore con una soluzione di hTAT-OP1 200nM e hBMP7 2nM. Lo studio del complesso SMAD 1/5/8 fosforilato è stato fatto a differenti intervalli di tempo T0, T2, T6, T24, T48 dal termine del trattamento. (C) controllo negativo.

3. Studio del potenziale neurogenico di hTAT-OP1

Dopo aver stabilito che hTAT-OP1 si lega ai recettori BMPR attivandoli, ne è stato determinato il potenziale neurogenico, valutando gli effetti sulla proliferazione, sulla crescita dendritica e sull'espressione dei Neurofilamenti H e M in colture PC12. I campioni sono stati preparati utilizzando hTAT-OP1 e hBMP7 in singolo o in associazione ad NGF.

3.1 Saggio di vitalità cellulare

Uno degli effetti principali del differenziamento in senso neuronale delle PC12 è quello del blocco della replicazione cellulare (Grumolato L. et al., Eur. J. Neuroscience 2003). Sulla base di tale considerazione, è stato valutato l'effetto del costrutto sulla crescita cellulare attraverso il saggio MTS. I dati sono stati espressi e comparati tra loro come numero di cellule per campione (fig. 5). L'esperimento ha previsto l'analisi della proliferazione dopo 24, 72 ore e 7 giorni di esposizione con terreno di coltura addizionato con i fattori usati singolarmente hBMP7 (2 nM), hTAT-OP1 (2 o 200 nM), NGF (1,8nM), oppure combinati tra loro (NGF

1,8nM+hBMP7 2nM), (NGF 1,8nM+ hTAT-OP1 2 nM), (NGF 1,8nM+ hTAT-OP1 200 nM). Come riportato in figura 5, nessuna significativa differenza è stata osservata nella crescita dei campioni trattati rispetto al controllo, dopo 24 ore di trattamento. A 72 ore tutti i trattamenti dimostrano portare una riduzione della proliferazione cellulare, soprattutto per quanto riguarda hBMP7 e hTAT-OP1 non c'è differenza statistica rispetto a quella indotta da NGF. Dopo 7 giorni di trattamento tutte le condizioni, eccetto hTAT-OP1 2nM, danno ancora una riduzione della proliferazione cellulare rispetto al controllo non trattato, mentre tra i cotrattamenti soltanto NGF 1,8nM+hTAT-OP1 2nM, porta ad una riduzione significativa della proliferazione rispetto al trattamento con NGF 1,8nM. Questo ci porta a considerare il fatto che il nostro costrutto al pari di hBMP7 determina una riduzione della proliferazione in maniera dose dipendente e del tutto simile a quella indotta da NGF a 72 ore. Dopo 7 giorni di trattamento la situazione non cambia ma la presenza di NGF in singolo e nei cotrattamenti, determina una riduzione della proliferazione più marcata rispetto a hBMP7 o hTAT-OP1 utilizzate da sole.

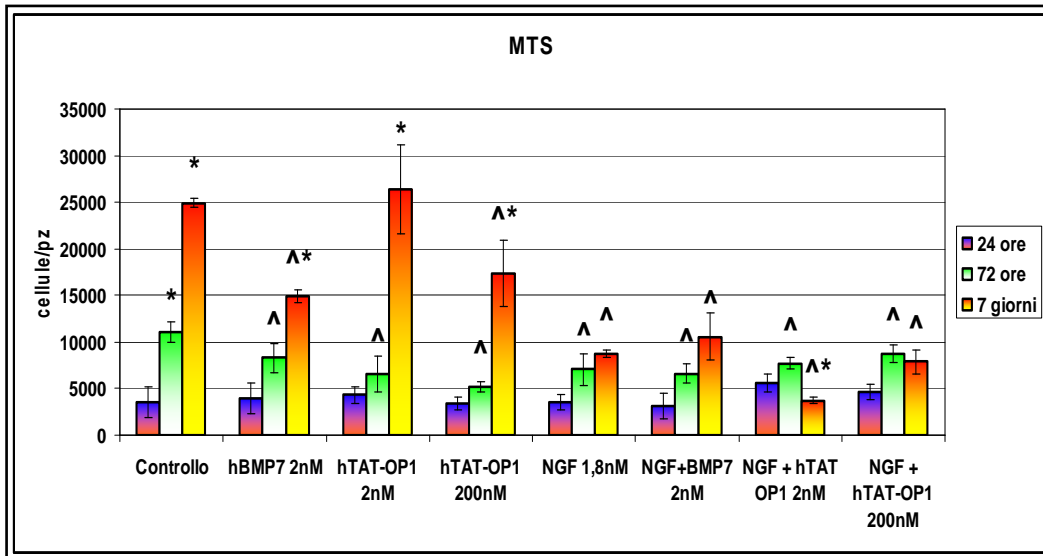


Figura 5. MTS su cellule PC12- Le cellule sono state trattate con terreno di coltura (controllo), hBMP7 2 nM, hTAT-OP1 2, 200 nM, NGF 1,8nM, (NGF 1,8nM+hBMP7 2 nM), (NGF 1,8nM+hTAT-OP1 2 nM), (NGF 1,8nM+ hTAT-OP1 200 nM). Il saggio è stato condotto dopo 24, 72 ore e 7 giorni di trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA e test di student (t-test) rispetto al controllo ($^{\wedge}P \leq 0,05$.) e rispetto a NGF 1,8nM ($*P \leq 0,05$)

3.2 Analisi della crescita neuritica

In parallelo agli esperimenti di vitalità cellulare, sono stati eseguiti studi di crescita neuritica. In questo caso i campioni sono stati fissati e colorati con blu di toluidina dopo 24 ore e 7giorni di trattamento (figura 6). L'analisi ha previsto l'acquisizione dell'immagine di 100 cellule per 5 campi casuali di ciascuna piastra. I risultati ottenuti (Tab. 1) sono stati espressi come media % delle cellule presentanti neuriti di lunghezza \geq al diametro del corpo cellulare. I dati mostrano che il trattamento eseguito solo con hTAT-OP1 o hBMP7 non stimola la crescita di ramificazioni né a tempi precoci né a tempi tardivi. Nel controllo positivo di differenziamento, allestito utilizzando il fattore NGF, sono stati osservati abbondanti neuriti dopo 7 giorni di stimolazione. Un rapido effetto stimolatorio ha caratterizzato i trattamenti eseguiti utilizzando la proteina hTAT-OP1 in combinazione con NGF, similmente a quanto osservato utilizzando (hBMP7 +

NGF). Inoltre, una maggiore stimolazione sembra essere garantita se si impiega il costrutto alla concentrazione di 200 nM ($p < 0,05$).

Tali evidenze mostrano una chiara sinergia di azione tra hTAT-OP1 ed il fattore NGF. Inoltre, tale effetto sembra essere garantito dalla porzione OP1 piuttosto che dall'intero costrutto, avendo osservato un analogo meccanismo di azione da parte della proteina hBMP7 (controllo positivo) e si esplica nel favorire un più precoce sviluppo di neuriti (24ore). Dopo 7 giorni di trattamento, non si osservano differenze significative di crescita tra i cotrattamenti (hTAT-OP1 + NGF), (BMP7 + NGF) ed i campioni trattati con NGF.

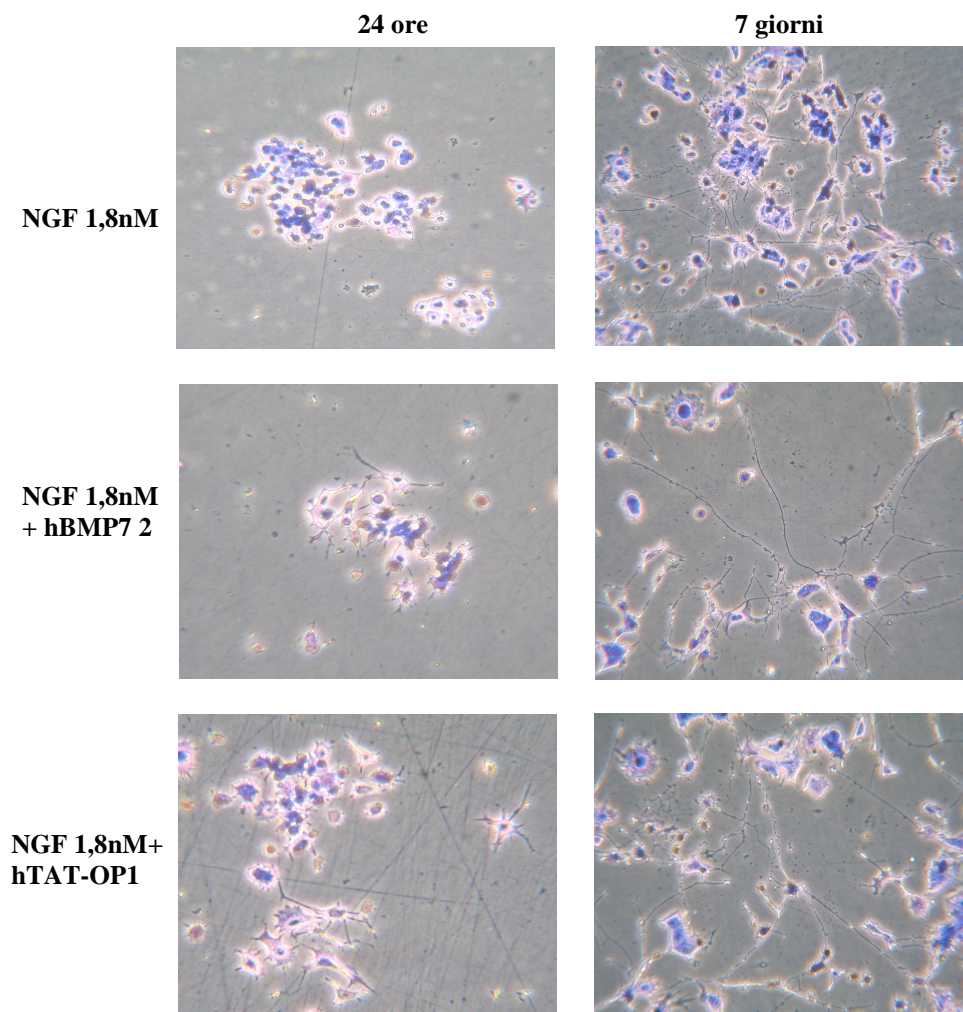


Figura 6. Analisi della crescita neuritica mediante microscopia ottica. Cellule PC12 sono state colorate con blu di toluidina dopo 24 ore e 7 giorni di incubazione. Ingrandimento x 200

Trattamenti	Media % Cellule con neuriti ± Deviazione standard	
	24 ore	7 giorni
Controllo	0,00	0,00
NGF 1,8nM	0,00	45,97 [^] ±8,55
hBMP7 2nM	0,00	0,00
hTAT-OP1 2nM	0,00	0,00
hTAT-OP1 200 nM	0,00	0,00
NGF + hBMP7 2nM	9,43* [^] ±2,29	53,98 * [^] ±12,37
NGF+ hTAT-OP1 2nM	7,43* [^] ±1,95	40,60 [^] ±10,17
NGF + hTATOP1 200nM	11,8* [^] ±3,04	47,51 [^] ±16,17

Tabella 1. Analisi della crescita neuritica in cellule PC12. I risultati, espressi come media % ± deviazione standard, sono ottenuti dall'analisi di 5 campi per pozzetto, considerando come positive le cellule presentanti neuriti della lunghezza ≥ al diametro cellulare. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA e test di student (t-test) ([^]P ≤ 0,05 rispetto al controllo) (*P ≤ 0,05 rispetto a NGF)

4. Analisi dell'espressione dei neurofilamenti

Per meglio caratterizzare l'effetto neurogenico della proteina hTAT-OP1 sulle cellule PC12, sono stati eseguiti studi di espressione dei neurofilamenti H e M mediante western blotting ed immunofluorescenza.

4.1 Western blotting

Per discriminare l'effetto dovuto alla sequenza attiva OP1 rispetto a quello indotto dal peptide TAT, alcune colture PC12 sono state trattate solo con la sequenza TAT (200nM). In figura 7 sono mostrati due western blotting, eseguiti dopo 24 ore (A) e 7 giorni (B) di trattamento. Come si osserva in figura 7 dopo 24 ore l'espressione dei neurofilamenti ad alto (200kDa) e medio (160kDa) peso molecolare è assente nei campioni trattati con hBMP7, hTAT-OP1 o TAT, mentre è presente nei campioni trattati con (NGF 1,8nM + hBMP7 2nM), (NGF 1,8nM + hTAT-OP1 2nM), (NGF 1,8nM + TAT 200nM). Dopo 7 giorni di trattamento è stata rilevata una maggiore espressione dei neurofilamenti nei campioni sottoposti ai cotrattamenti (NGF 1,8nM + hBMP7 2nM), (NGF 1,8nM + hTAT-OP1 2nM) e (NGF 1,8nM + TAT 200 nM). La sequenza TAT 200nM ha dimostrato di non avere alcun effetto sull'espressione dei neurofilamenti

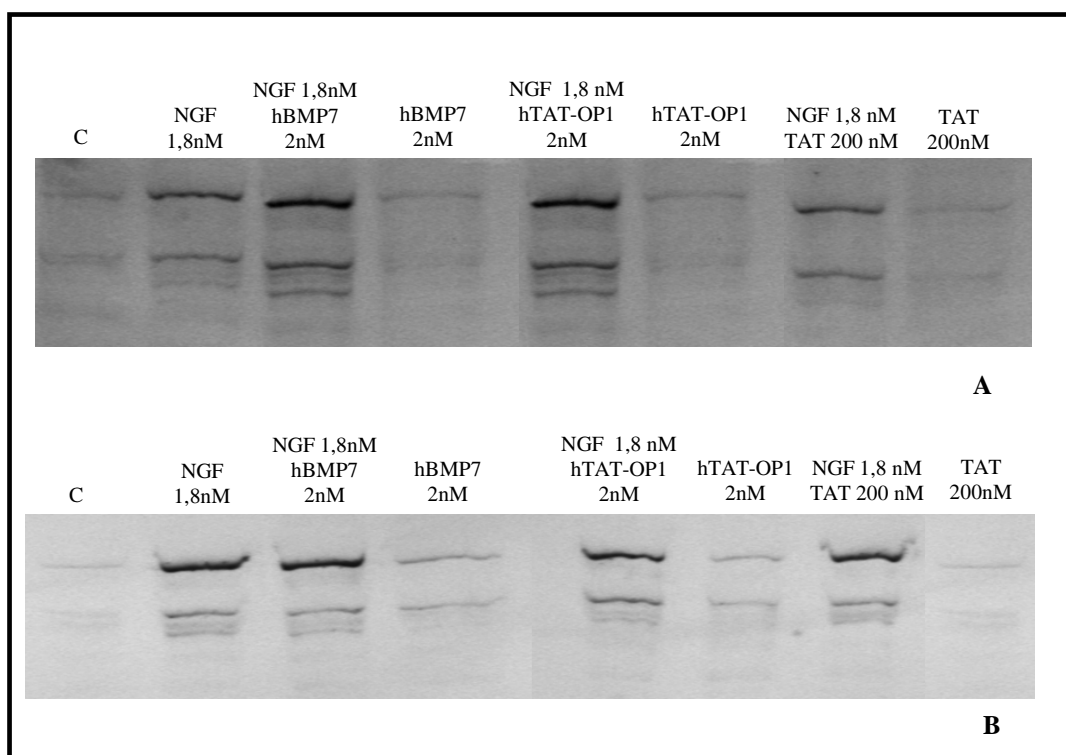


Figura 7. Espressione di neurofilamenti in cellule PC12 trattate con terreno di mantenimento (C), NGF 1,8nM , hBMP7 2nM, hTAT-OP1 2nM, TAT 200 nM, NGF 1,8nM + hBMP7 2nM e NGF 1,8nM + hTAT-OP1 2nM e NGF 1,8nM + TAT 200 nM. Le cellule sono state lisate e sottoposte ad analisi mediante western blotting per l'indagine di neurofilamenti ad alto (200kDa) e medio (160kDa) peso molecolare dopo 24 ore di trattamento (A) e dopo 7 giorni (B).

4.2 Immunofluorescenza

Come mostrato in figura 8, i trattamenti con la proteina hTAT-OP1 usata da sola o in combinazione con NGF hanno dimostrato avere un effetto sull'espressione e organizzazione dei neurofilamenti. In particolare, nei campioni trattati con (NGF 1,8nM + hBMP7 2nM) e (NGF 1,8nM + hTAT-OP1 2nM) è stata osservata dopo 24 ore di trattamento la presenza di filamenti ben organizzati rispetto al trattamento con il solo NGF.

In tempi tardivi (7giorni) i neurofilamenti risultano abbondantemente distribuiti nel corpo cellulare similmente a quanto si osserva nei campioni trattati con hBMP7. Non sono state osservate differenze significative rispetto al controllo nei campioni trattati con la sequenza TAT 200nM oppure hTAT-OP1 200nM in combinazione e non con NGF (Dati non riportati).

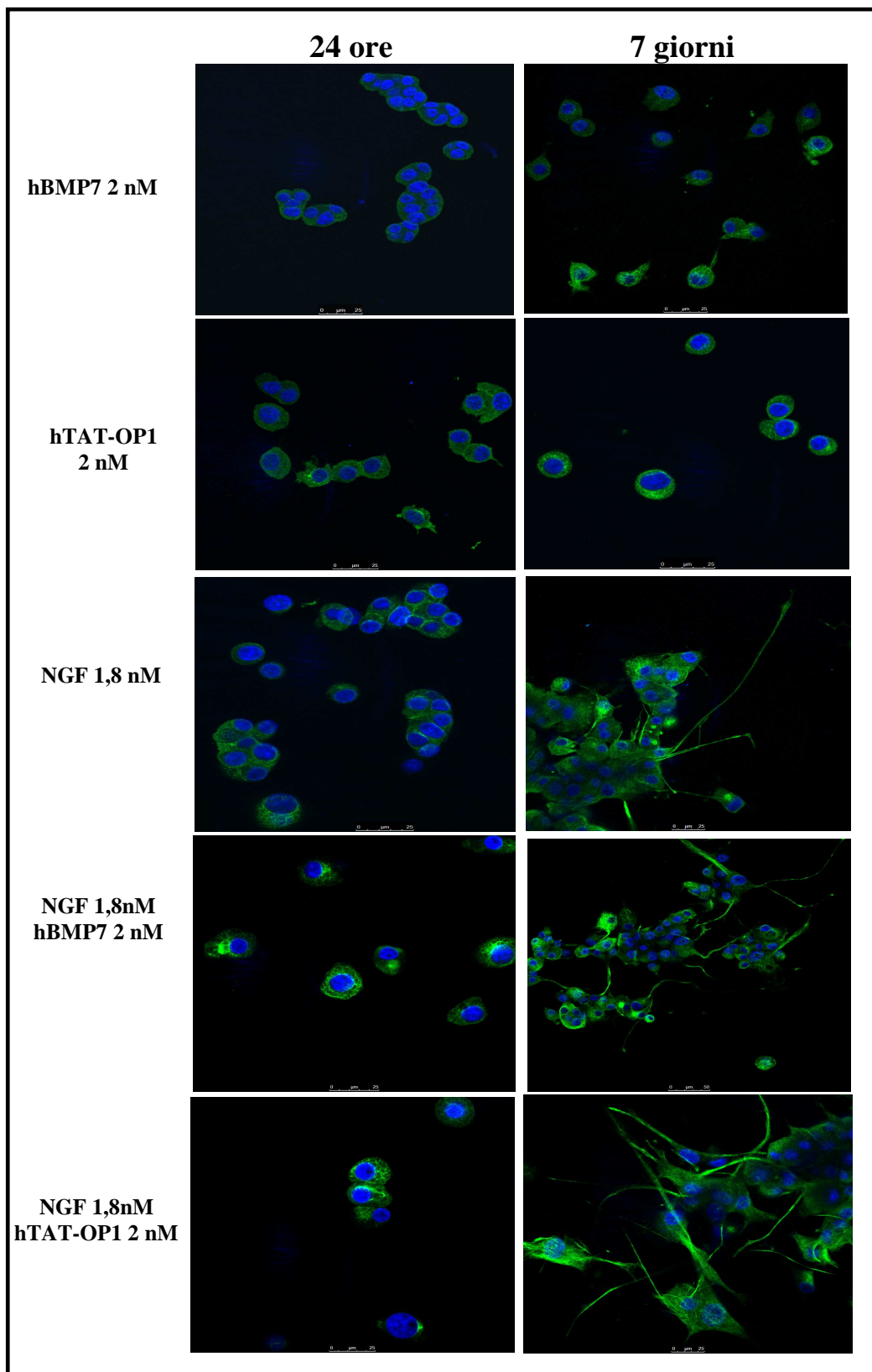


Figura 8 Immunofluorescenza per neurofilamenti su cellule PC12. Le immagini sono state raccolte dopo 24 ore e 7 giorni di trattamento con NGF 1,8nM , hBMP7 2nM, hTAT-OP1 2nM, NGF 1,8nM + hBMP7 2nM e NGF 1,8nM + hTAT-OP1 2nM. I campioni fissati sono stati marcati con anticorpo primario anti neurofilamenti e secondario anti isotipo coniugato con alexa 488. Le immagini sono state acquisite con microscopio confocale Leica TCS-SP5 ad un ingrandimento x630 per i campioni a 24 ore e x 400 per i campioni a 7 giorni.

DISCUSSIONE

La proteina di fusione hTAT-OP1, ottenuta mediante tecnologia del DNA ricombinante, presenta all'estremità N terminale 11 aminoacidi corrispondenti alla porzione attiva di TAT e all'estremità C-terminale 132 aminoacidi, appartenenti alla proteina matura hBMP7. La sequenza TAT è un dominio di trasduzione proteica appartenente al virus HIV ampiamente utilizzato per la veicolazione di proteine all'interno delle cellule (Schwarze *et al.*, 1999). Il costrutto hTAT-OP1 è stato purificato per eseguire i successivi studi in vitro, caratterizzato dal punto di vista chimico determinandone il peso molecolare (18,52 kDa) e, mediante carbamidometilazione, determinata la presenza delle 7 cisteine fondamentali per il corretto ripiegamento e per la sua attività sui recettori (BMPR).

hTAT-OP1 è stata concepita per facilitare l'ingresso della proteina OP1 nelle cellule, è noto che la sequenza TAT consente una riduzione del tempo di ingresso delle proteine a cui è coniugata permettendo a quest'ultima di agire più rapidamente e riducendone il dosaggio (Jacob M. *et al.*, 2007).

Il meccanismo di azione della proteina nativa BMP7 prevede l'interazione con recettori di membrana del tipo BMPR-I e II. (Chen D. *et al.*, 2004). Sulla base di tale evidenza, abbiamo ipotizzato che il costrutto hTAT-OP1 entri velocemente all'interno delle cellule mediante la sequenza TAT e, dopo refolding probabilmente mediato dalle heat shock protein citoplasmatiche, si porti in sede extracellulare per esplicare la sua azione a livello di membrana. Tale ipotesi è stata verificata in questo lavoro di tesi mediante studi di trafficking cellulare, e verificandone l'attività biologica sui recettori alle BMP (BMPR).

Il passo successivo è stato quello di testare il potenziale neurogenico di hTAT-OP1, dal momento che numerose evidenze lasciano credere che BMP7 abbia un

ruolo determinante nel processo di rigenerazione neuronale. Espressa nelle meningi e nel plesso corioideo, regola, nella zona ventricolare la sopravvivenza, la migrazione e il differenziamento dei neuroblasti e, dopo un danno cerebrale la sua espressione e quella dei suoi recettori risulta incrementata (Lewen et al 1997; Harvey et al 2005).

In questo lavoro, i controlli allestiti con la proteina hBMP7 e NGF sono stati utili per la migliore caratterizzazione dell'effetto della proteina hTAT-OP1 in un modello in vitro di cellule di feocromocitoma PC12, comunemente utilizzato in letteratura per gli studi di differenziamento neuronale (Lloyd A.G. et al., 1976). Tale modello è risultato inoltre adeguato allo studio di caratterizzazione biologica del costrutto hTAT-OP1 perché, come dimostrato mediante RT-PCR, le cellule PC12 esprimono i recettori di membrana specifici che sono implicati nella via del segnale BMP. In particolare è stata osservata l'espressione dei recettori BMPR del tipo I quali ActR-IA, BMPR-IA e del tipo II quali ActR-II e BMPR-II. Alla luce dei risultati riportati nello studio di trafficking cellulare, è stato stabilito che dopo trattamento di 24 ore con una soluzione di hTAT-OP1 200nM, il costrutto trasloca nelle cellule, permane come tale, mantenendo un peso di 18,5 Kda per circa 6 ore e successivamente viene scisso in due porzioni a livello di una sequenza segnale, presente tra i residui AA 300-305 di OP1. Mediante immunofluorescenza e microscopia confocale è stato dimostrato che il peptide TAT e la sequenza OP1 hanno una diversa localizzazione intracellulare. Dopo 24 ore dalla fine del trattamento, la porzione contenente la sequenza TAT si localizza nel nucleo come dimostrato in precedenti studi in letteratura (Koutsokeras A et al., 2009), con un pattern tipicamente nucleolare, mentre il frammento contenente OP1 è stato osservato sulla membrana citoplasmatica. L'avvenuta fosforilazione delle

SMAD1/5/8 dopo induzione cellulare con il costrutto hTAT-OP1 ha confermato che la sequenza OP1 a livello della membrana citoplasmatica attiva la via del segnale BMP mediante interazione con i recettori specifici. La digestione della proteina nelle due parti funzionali che avviene a livello di un esapeptide specifico, riconosciuto presumibilmente da una peptidasi cellulare tripsino simile, che interviene nella via canonica di maturazione del precursore di OP1 (Brunner *et al.*, 1988), non altera la funzionalità della porzione attiva. Tali dati dimostrano indirettamente che la proteina ricombinante di fusione hTAT-OP1, somministrata in forma denaturata e quindi non attiva, ripristina la sua attività dopo refolding intracellulare, presumibilmente mediante le proteine heat shock citoplasmatiche. Successivamente, trasloca in sede extracellulare, dimerizza (Mehler M. F. et al., 1997) ed interagisce in maniera efficace con i recettori BMPR.

In letteratura è nota l'azione delle BMP durante i primi stadi dello sviluppo embrionale ed in particolar modo nella corretta formazione del sistema nervoso centrale (Mehler M.F., et al., 1997). Un sotto gruppo delle BMP formato da BMP2, BMP4 e BMP7, regola gli stadi di differenziamento di progenitori neuronali nella linea simpaticoadrenergica, modula l'espressione di neurotrasmettitori, neuropeptidi e, in concerto con NGF, stimola lo sviluppo di dendriti (Mehler M.F., et al., 1997). Pertanto, in questo lavoro è stato testato il potenziale neurogenico del costrutto hTAT-OP1 sulle cellule PC12 che presentano, sia proprietà appartenenti a cellule cromaffino-simili, come sintesi, immagazzinamento e rilascio di catecolamine quali dopamina e noradrenalina, che caratteristiche appartenenti a cellule neuronali quali, la risposta allo stimolo di NGF mediante la formazione di neuriti, di vescicole sinaptiche e blocco della replicazione cellulare (Grumolato L. et al., 2003). In questo lavoro, sono stati

valutati gli effetti del trattamento con hTAT-OP1 sulla proliferazione, sulla crescita neuritica e sull'espressione dei neurofilamenti H e M. Allo scopo di definire una eventuale sinergia con il fattore NGF, in parallelo, sono stati preparati campioni mediante stimolazione con (hTAT-OP1 + NGF) e (hBMP7 + NGF). Dopo 24 ore di trattamento, il costrutto hTAT-OP1 alle concentrazioni di utilizzo non induce alcuna differenza significativa di crescita cellulare rispetto al controllo non trattato. I primi effetti sulla proliferazione si manifestano in tempi tardivi (72 ore, 7 giorni) e sono di tipo inibitorio, similmente ai fattori NGF e hBMP7, e concentrazione-dipendente. Nei campioni stimolati contemporaneamente con (hTAT-OP1 + NGF), e (hBMP7 + NGF), è stata osservata una proliferazione cellulare che è comparabile o superiore ($p < 0,05$) a quella osservata sulle PC12 dopo trattamento con NGF.

Un'altra caratteristica delle cellule PC12 è quella di produrre neuriti dopo stimolazione di 48 e 72 ore con NGF (Lloyd A.G. et al., 1976). E' noto che le BMP aumentano l'attività neurotrofica non solo di NGF in PC12 (Althini S. et al., 2003), ma anche di altri fattori neurogenici durante lo sviluppo neuronale (Bengtsson H. et al., 1998). In questo lavoro è stato dimostrato che la proteina hTAT-OP1 in combinazione con NGF determina un precoce effetto stimolatorio (24 ore) sulla crescita dendritica rispetto al fattore NGF e similmente a quanto osservato nei campioni trattati con hBMP7. Inoltre, una maggiore stimolazione sembra essere garantita se si impiega il costrutto alla concentrazione di 200 nM ($p < 0,05$).

Tali evidenze mostrano una chiara sinergia di azione tra hTAT-OP1 ed il fattore NGF. Inoltre, tale effetto sembra essere garantito dalla porzione OP1 piuttosto che dall'intero costrutto, avendo osservato un analogo meccanismo di azione da parte

della proteina hBMP7 ed alcun effetto stimolatorio sull' espressione e sull' organizzazione dei neurofilamenti da parte della sequenza TAT. Studi in letteratura dimostrano un “crosstalk” tra le vie di segnale delle BMP e NGF che coinvolge le proteine ERK e SMAD. La proteina ERK, che viene fosforilata a seguito dell'interazione da parte di NGF con il suo recettore di membrana, influenza l'attività regolatoria delle SMAD mediante fosforilazione delle SMAD 1 e 5 (Kretzschmar M. et al. 1997;). Sia le BMP che NGF sembrano attivare i geni Id1, Id2 e Id3 e forse è proprio a livello della trascrizione di questi geni che si determina l'effetto di sinergia nello sviluppo precoce di neuriti (Althini S. et al., 2003).

Alla luce dei risultati riportati in questo lavoro è possibile prevedere future applicazioni della proteina hTAT-OP1 nel campo della rigenerazione tissutale. In particolare, nel campo della chirurgia neuronale ed ossea. Si intravede il suo utilizzo per la preparazione ed ottimizzazione di impianti protesici in soggetti che hanno subito un trauma cranico o spinale, in ragione della garanzia che offre in termini di veloce veicolazione in sede intracellulare, ridotta degradazione in vivo e bassi costi di produzione.

BIBLIOGRAFIA

Althini S., Usoskin D., Kylberg A., Dijke P., Ebendala T. (2003) Bone morphogenetic protein signalling in NGF-stimulated PC12 cells. *Biochem and Biophys Res.* **307**: 632-639.

Andrade M.A., Chacon P., Merelo J.J. and Moran F. (1993): Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering.* **6**: 383-390.

Antonawich F.J., Federoff H.J., Davis J.N. (1999): BCL-2 transduction, using a herpes simplex virus amplicon, protects hippocampal neurons from transient global ischemia. *Exp Neurol.* **156**: 130–137.

Babensee J. E., McIntire L. V., Mikos A. G. (2000): Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm. Res.* **17**: 497-504.

Baldwin S. P., Saltzman W. M. (1998): Materials for protein delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Del. Rev.* **33**: 71-86.

Bani-Yaghoub M., Tremblay R.G., Ajji A., Nzau M., Gangaraju S., Chitty D., Zurakowski B., Sikorska M. (2008) Neuroregenerative strategies in the brain: emerging significance of bone morphogenetic protein 7 (BMP7). *Biochem. Cell. Biol.* **86**: 362-369.

Beker-Hapak M., McAllister S., Dowdy S. (2001): TAT-mediated protein transduction domain into mammalian cells. *Methods.* **24**: 247-256.

Brown A., Stock G., Patel A. A., Okafor C., Vaccaro A. (2006) Osteogenic Protein-1 A review of its utility in Spinal applications. *Biodrugs.* **20** (4): 243-251.

Brunner A.M., Gentry L.E., Cooper J.A., Purchio A.F. (1998): Recombinant type 1 transforming growth factor beta precursor produced in Chinese hamster ovary cells is glycosylated and phosphorylated. *Mol Cell Biol.* **8**(5): 2229-2232.

Celeste A.J., Iannazzi J.A., Taylor R.C., Hewick R.M., Rosen V., Wang E.A., Wozney J.M. (1990): Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci.* **87**(24): 9843-9847.

Charytoniuk D.A., Traiffort E., Pinard E., Issertial O., Seylaz J., Ruat M. (2000) Distribution of bone morphogenetic protein receptor transcripts in the rodent nervous system and up-regulation of bone morphogenetic protein receptor type II in hippocampal dentate gyrus in a rat model of global cerebral ischemia. *Neuroscience* **100**: 33-43.

Check E. (2002): Gene therapy: shining hopes dented - but not dashed. *Nature.* **420**: 735.

Chen D., Zhao M., Mundy G. (2004): Bone morphogenetic protein. *Growth factors.* **22**(4): 233-241.

Chou J., Harvey B. K., Chang C. F., Shen H., Morales M., Wang Y., (2005) Neuroregenerative effects of BMP7 after stroke in rats. *J. Neurol. Sci.* **15** ; **240**(1-2) :21-29.

Chou J., Luo Y., Kuo C.C., powers K., Shen H., Harvey B. K., Hoffer B. J., Wang Y. (2008) Bone Morphogenetic Protein-7 reduces toxicity induced by high doses of methamphetamine in rodents. *Neuroscience* **151**; 92-103.

DeLisser H.M., Christofidou-Solomidou M., Strieter R.M., Burdick M.D., Robinson C.S., Wexler R.S., Kerr J.S., Garlanda C., Merwin J.R., Madri J.A., Albelda S.M. (1997): Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.* **151**(3): 671-677.

Dietz G.P., Bahr M. (2004): Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse Approach. *Mol Cell Neurosci.* **27**: 85–131.

Di Liddo R., Grandi C., Dal zoppo D., Venturini M., Negro A., Conconi M.T., Schiavon O., Parnigotto P.P. (2010) Recombinant human TAT-OP1 for tissue engineering. Submitted to: The Int. J of Bio. And Cell. Biology

Dolgilevich S., Zaidi N., Song J., Abe E., Moonga B.S., Sun L. (2002): Transduction of TAT fusion proteins into osteoclasts and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* **299**(3): 505-509.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj, Horwitz E. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* **8**(4): 315-7.

Ebendal T., Bengtsson H., Soderstorm S. (1998) **Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain.** *Neurosci. Res.* **51**(2):139-46

Edelhoch H. (1967): Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry.* **6**(7): 1948-1954.

Fackler M.J., Krause D.S., Smith O.M., Civin C.I., May W.S. (1995): Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood.* **85**(11): 3040-3047.

Fawell S., Seery J., Daikh Y., Moore C., Chen L.L., Pepinsky B. Barsoum (1994): Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci.* **91**: 664–668.

Fittipaldi A., Ferrari A., Zoppe M., Arcangeli C., Pellegrini V., Beltram F., and Giacca M. (2003) Cell Membrane Lipid Rafts Mediate Caveolar Endocytosis of HIV-1

Tat Fusion Proteins. *J. Biol. Chem* **278** (36) 34141–34149.

Frankel A.D. and Pabo C.O. (1988): Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. **55**: 1189-1193.

Fisher M. C., Li Y., Segatoleslami M. R., Dealy C. N., Kosher R. A. (2006) Heparan sulphate proteoglycans including syndecan-3 modulate BMP activity during limb cartilage differentiation. *Matrix Biol.* **25**: 27-39

Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. (2007): Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg.* **77**(8): 626-31.

Green L.A., Tischler A. S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73** (7) 2424-2428.

Green M. and Loewenstein P.M. (1988): Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. **55**: 1179-1188.

Green A. R., Shuaib A. (2006) Therapeutic strategies for the treatment of stroke *Drug Discovery.* **11**: 681-693.

Greenberg D. A., Jin K. (2006) Turning neurogenesis up a notch. *Nature Medicine.* **12** (884-885)

Griffith D. L., Keck P. C., Sampath T. K., Rueger D. C. and Carlson W. D. (1996): Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 878-883.

Groppe J., Greenwald J., Wiater E., Rodriguez-Leon J., Economides A.N., Kwiatkowschi W., Affolter M., Vale W., Belmonte J.C.I. and Choe S. (2002): Structural basis of BMP signaling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*. **420**: 636–642.

Grumolato L., Louiset E., Alexandre D., Arït-Ali D., Turquier V., Fournier A., Fasolo A., Vaudry H., Anouar Y.(2003) PACAP and NGF regulate common and distinct traits of the sympathoadrenal lineage: effects on electrical properties, gene markers and transcription factors in differentiating PC12 cells. *Eur. J. Neuroscience* **17**; 71-82

Harvey B.K., Mark A., Chou J., Chen G.J., hoffer B.J., Wang Y. (2004): Neurotrophic effect of bone morphogenetic protein-7 in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Research*. **1022**:88-95.

Harwood PJ, Giannoudis PV (2005): Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects. *Expert Opin. Drug Saf.* **4**: 75–89.

Hochuli E. (1990): Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Protein. Eng.* **12**: 87-98.

Hwang N.S., Kim M.S., Sampattavanich S., Baek J.H., Zhang Z., Elisseff J. (2006): Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells*. **24**(2): 284-291.

Imamura T., Takase M., Nishihara A., Oeda E., Hanai J., Kawabata, M. and Miyazono K. (1997): Smad6 inhibits signalling by the TGFbeta superfamily. *Nature*. **389**: 622–626.

Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ. (1992): Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors*. **7**(2): 139-150.

Israel D.I., Nove J., Kerns K.M., Kaufman R.J., Rosen V., Cox K.A., Wozney J.M. (1996): Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factors*. **13**(3-4): 291–300.

Iwasaki S., Hattori A., Sato M., Tsujimoto M., Kohno M. Characterization of the Bone Morphogenetic Protein-2 as a Neurotrophic Factor. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 7360-17365.

Jainwal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P. (1997): Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J. Cell. Biochem.* **64**(2): 295-312.

Jena N., Martin-Seisdedos C., McCue P., Croce C.M. (1997): BMP7 null mutation in mice: Developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res.* **230**(1): 28–37.

Joliot, A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H., and Prochiantz A. (1991): Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 1864-1868.

Kingsley D.M., (1994): The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* **8**(2): 133-146

Kim D., Jeon C., Kim J.H., Kim M.S., Yoon C.H., Choi I.S., Kim S.H., Bae Y.S. (2006): Cytoplasmic transduction peptide (CTP): new approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res.* **312**: 1277–88.

Koenig B.B., Cook J.S., Wolsing D.H., Ting J., Tiesman J.P., Correa P.E., Olson C.A., Pecquetl F., Ventura F., Grant R.A., Chen G., Wrana J., Massague´ J. and Rosenbaum J.S. (1994): Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5961–5974.

Kordower J.H., Emborg M.E., Bloch J., Ma S.Y., Chu Y., Leventhal L., McBride J., Chen E.Y., Palfi S., Roitberg B.Z., Brown W.D., Holden J.E., Pyzalski R., Taylor M.D., Carvey P., Ling Z., Trono D., Hantraye P., Déglon N., Aebischer P. (2000): Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science.* **290**: 767–773.

Koutsokeras A. Kabouridis P. S. (2009) Secretion and uptake of TAT-fusion proteins produced by engineered mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**(2): 147–153

Kugler S., Kilic E., Bahr M. (2003): Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron specific longterm transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther.* **10**: 337–347.

Langer R., Vacanti J.P. (1993): Tissue engineering. *Science.* **260**: 920-926.

Lein P., Johnson M., Guo X., Rueger David., Higgins D. (1995) Osteogenic Protein-1 induces dendritic growth in rat simpathetic neurons. *Neuron* **15**: 597-605.

Lewen A., Soderstrom S., Hillered L., Ebental T. (1997). Expression of serine/threonine kinase receptors in traumatic brain injury. *Neureport.* **8**: 475-479

Lindenbaum M.H., Carbonetto S., Mushynski W.E. (1987) Nerve Growth Factor enhances the syntesis, phosphorylation, and metabolic stability of neurofilament proteins in PC12 Cells. **262** (2) 605-610.

Lindsay M.A. (2002): Peptide-mediated cell delivery: application in protein target Validation. *Curr Opin Pharmacol.* **2**: 587–594.

Liu Y., Belayev L., Zhao W., Busto R., Saul I., Alonso O., Ginsberg M. D. (2001) The effect of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on functional recovery, local cerebral glucose utilization and blood flow after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research* **905**: 81–90

Macri L., Silverstein D., Clark R.A. (2007): Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* **59**(13): 1366-81. Review.

Mann D.A., Frankel A.D. (1991): Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat Protein. *EMBO J.* **10**: 1733–1739.

Marcucci G., Baldus C.D., Ruppert A.S., Radmacher M.D., Mrózek K., Whitman S.P., Kolitz J.E., Edwards C.G., Vardiman J.W., Powell B.L., Baer M.R., Moore J.O., Perrotti D., Caligiuri M.A., Carroll A.J., Larson R.A., de la Chapelle A., Bloomfield C.D. (2005): Over expression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* **23**(36): 9234–9242.

Meheler M.F., Mabie P.C., Zhang D., Kessler J. A. (1997) Bone Morphogenetic proteins in the nervous system. *TINS* **29**(7): 309-317.

Moustakas A. and Heldt C. H. (2002): From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF β signal transduction. *Genes Dev.* **16**: 67–1871.

Nimni, M. E. (1997): Polypeptide growth factors : targeted delivery systems. *Biomaterials.* **18**: 1201-1225.

Nishimura R., Kato Y., Chen D., Harris S. E., Mundy G. R. and Yoneda T. (1998): Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J. Biol. Chem.* **273**: 1872–1879.

Ohyama K., Ellis P., Kimura S., Placzek M. (2005): Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons. *Development* **132**, 5185-5197.

Ozkaynak E., Rueger D.C., Drier E. A., Corbett C., Ridge R. J., Sampath T. K and Oppermann H. (1990): Op-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *Creat. Bio. Mol.* **9**(7): 2085-2093.

Paralkar V. M., Benjamin S. Weeks, Yu M. Yu, Kleinman H. K., Reddi A.H. (1992): Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2B Stimulates PC12 Cell Differentiation: Potentiation and Binding to Type IV Collagen. *J. Cell. Biol.* **119**(6): 1721-1728.

Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258** : 598-599.

Recchia A., Rota D., Debetto P., Peroni D., Guidolin D., Negro A., Skaper S.D., Giusti P. (2007): Generation of a alpha-synuclein-based rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **30**(1): 8-18.

Reddi A.H. (2001): Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* **83-A** (Suppl. 1): S1-S6.

Sampath K. T., Maliakal J. C., Hsuschka T., Jones W. K., Sask H., Tucker R. F., White K. H., Coughlin J. E., Tucker M. M., Pang R. H. L., Corbett C., Ozkaynak E., Oppermann H. and Rueger D. C. (1992): Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J. Biol.*

Sato T. (1968): A modified method for lead staining of thin sections. *J Electron Microsc.* **17**(2): 158-159.

Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akbani A., Dowdy S.F. (1999): In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science.* **285**: 1569–1572.

Shimazaki K., Urabe M., Monahan J., Ozawa K., Kawai N. (2000): Adeno-associated virus vector-mediated bcl-2 gene transfer into post-ischemic gerbil brain in vivo: prospects for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Gene Ther.* **7**: 1244–1249.

Stanchi O., Negro A., Callegaro L. (1997): Expression of osteogenic factor OP-1 in cells of *Spodoptera frugiperda* infected with recombinant baculovirus. *United States Patent 5,641,649.*

Studier F.W., Moffatt B.A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-30.

Suh H. (2000): Tissue restoration, tissue engineering and regenerative medicine. *Yonsei Med J.* **41**(6): 681-4. Review.

Sundholm-Peters N.L., Yang H. K., Goings G. E., Walker A. S., and Szele F.G. (2005) Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**: 1089-1100.

Tabata Y. (2008): Current status of regenerative medical therapy based on drug delivery technology. *Reprod Biomed Online.* **16**(1): 70-80. Review.

Terada S., Sato M., Sevy A., Vacanti J. P. (2000): Tissue engineering in the twenty-first century. *Yonsei Med J.* **41**(6): 685-91. Review.

Tropea D., Caleo M., Maffei L. (2003) Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and chondroitinase ABC on retinal fiber sprouting after denervation of the superior colliculus in adult rats. *J. Neurosci.* **23**: 7034-7044.

Urist M.R., Iwata H., Ceccotti P.L., Dorfman R. L., Boyd S. D., McDowell R. M. and Chien C. (1973): Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**: 3511–3515.

Vallejo L.F., Brokelmann M., Marten S., Trappe S., Cabrera-Crespo J., Hoffmann A., Gross G., Weich H.A., Rinas U. (2002): Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* **94**(2): 185–194.

Varley E.J., Maxwell J.(1996): BMP-2 and BMP-4, but Not BMP-6, Increase the Number of Adrenergic Cells Which Develop in Quail Trunk Neural Crest Cultures. *exp. Neurol.* **140** 84-94

Varley E.J., Wheby R. G., Rueger D. C., Maxwell G.D. (1995): Number of Adrenergic and Islet-1 Immunoreactive Cells Is Increased in Avian Trunk Neural Crest Cultures in the Presence of Human Recombinant Osteogenic Protein-1. *Dev. Dynamics* **203**: 434-447

Wen. H., Dou Z., Finni T., Havu M., Kang Z., Chen S. (2008) Thigh muscle function in patients revealed by velocity encoded phase-contrast magnetic resonance imaging. *Muscle Nerve* **37**: 736-744.

Whitaker M. J., Quirk M. A., Howdle S. M. and Shakesheff K. M. (2001): Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J. of Pharmacy and Pharmacology.* **53**: 1427-1437.

Winnier G., Blessing M., Labosky P.A., Hogan B.L. (1995): Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* **9**(17): 2105-2116.

Woo B.H., Fink B.F., Page R., Schrier J.A., Jo Y.W., Jiang G., DeLuca M., Vasconez H.C., DeLuca P.P. (2001): Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res.* **18**(12): 1747-1753.

Wozney J.M. (2002): Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine.* **27**: S2-S8.

Wright L.R., Rothbard J.B., Wender P.A. (2003): Guanidinium rich peptide transporters and drug delivery. *Curr Protein Pept Sci.* **4**: 105–124.

Yamashita H., ten Dijke P., Huylebroeck D., Sampath T.K., Andries M., Smith J.S., Heldin C.H. and Miyazono K. (1995): Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J. Cell. Biol.* **130**: 217–226.

Yeh L.C., Adamo M.L., Olson M.S., Lee J.C. (1997): Osteogenic protein-1 and insulin-like growth factor I synergistically stimulate rat osteoblastic cell differentiation and proliferation. *Endocrinology.* **138**(10): 4181-4190.

Yoshida Y., Tanaka S., Umemori H., Minowa O., Usui M., Ikematsu N., Hosoda E., Imamura T., Kuno J., Yamashita T., Miyazono K., Noda M., Noda T. and Yamamoto T. (2000): Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell.* **103**: 1085–1097.

Zhang H.B., Bradley A. (1996): Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development.* **122**: 2977–2986.

Zhang S., Holmes T.C., Lockshin C., Rich A. (1993): Spontaneous assembly of a selfcomplementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 3334- 3338.

Zhu H., Kavsak P., Abdollah S., Wrana J. and Thomsen G.H.A. (1999): SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature.* **400**: 687–693.

Un ringraziamento particolare

Ai professori **Claudio Grandi**, **Mariateresa Conconi** e **Pierpaolo Parnigotto**, per la possibilità che mi hanno dato di fare questo bellissimo lavoro.

Alla dottoresse **Rosa Di Liddo** e **Silvia Baiguera** e al dottor **Daniele Dal Zoppo**, per avermi aiutato nelle difficoltà pratiche che ogni giorno si presentavano durante questi tre anni.

Ai dottorandi del Centro Interdipartimentale di Ricerca e Servizi per la Biologia e la Medicina della Rigenerazione dell'ospedale S. Luca di Trecenta: **Piergiorgio Paganin**, **Silvia Ferraro**, **Valentina Villani**, **Rosa Marmo**, **Alessia Tasso**. Senza i quali questo periodo non lo avrei affrontato ogni giorno con il sorriso sulle labbra.