

Figure 1 Analisi per Western Blot dell'overespressione (GOLPH3-OE) e del silenziamento (GOLPH3-KD) della proteina GOLPH3 in fibroblasti primari umani (PHF) e cellule di cancro della cervice uterina (HeLa).

i lipidi cellulari sono stati estratti in 2 ml di una miscela di isopropanolo:acqua:etilacetato (30:10:60; v:v:v) dopo l'aggiunta di standard interni per ciascuna classe di sfingolipidi che si intendeva misurare. Metà dell'estratto è stata utilizzata per la determinazione dei fosfolipidi totali (Pi nmol) e per la determinazione delle sfingomieline la parte rimanente dell'estratto è stata utilizzata per la determinazione delle ceramidi, esosilceramidi e lattosilceramidi.

Dopo evaporazione gli estratti lipidici sono stati riestratti in 3 ml di una miscela di cloroformio:metanolo (2:1; v:v) e secondo la procedura standard di Bligh & Dyer (E.A. Bligh, W.J. Dyer; 1959) indotti alla formazione di fasi. La fase organica è stata, quindi, prelevata ed essicata. Per la determinazione delle sfingomieline gli estratti sono stati incubati per 2 ore in una miscela di metanolo 10mM NaOH. In seguito a separazione per HPLC i singoli campioni sono stati analizzati per 'tandem mass spectrometry' come descritto dettagliatamente in Bielawski et al. 2006 con i seguenti risultati (**Figura 2**).

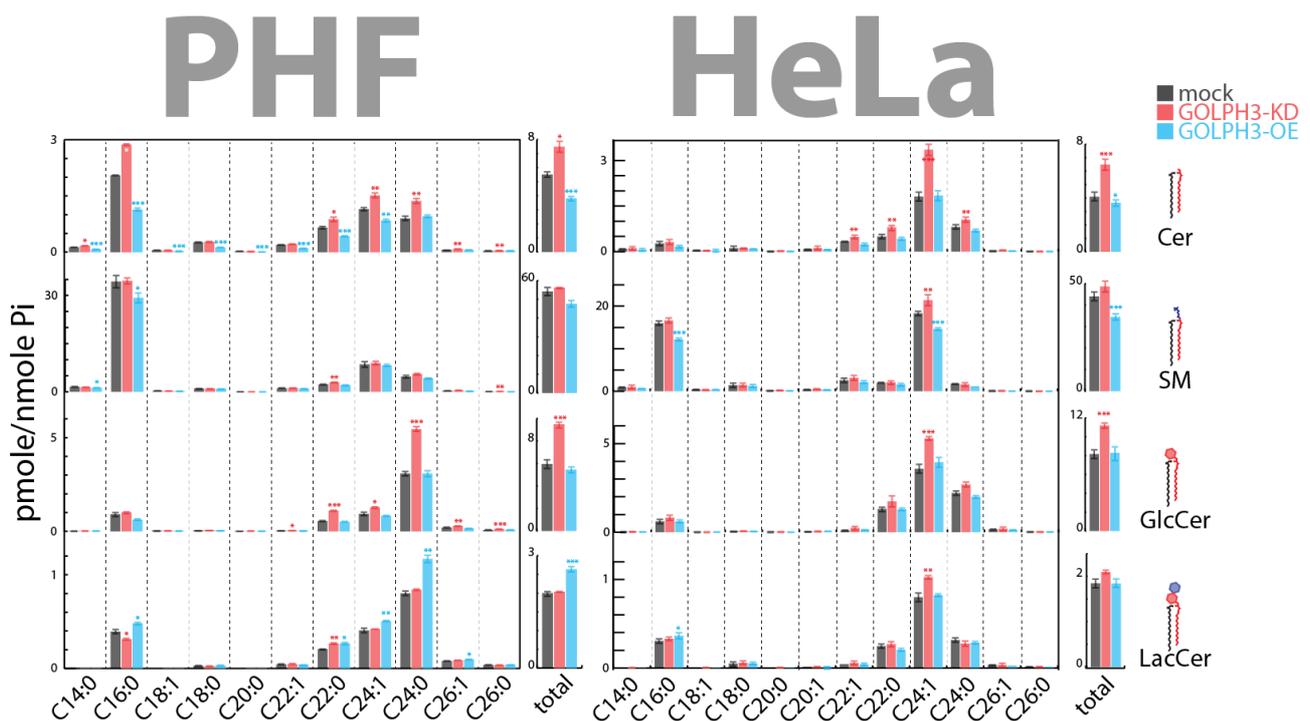


Figure 2 Analisi per LC/MS-MS della composizione lipidica di cellule PHF ed HeLa overesprimenti (GOLPH3-OE) silenziate (GOLPH3-KD) per l'espressione della proteina GOLPH3. Cer, Ceramide; SM, Sfingomieleina; GlcCer, glucosilceramide; LacCer, lattosilceramide.

Dall'analisi dei risultati ottenuti risulta che l'espressione della proteina GOLPH3 influenza i livelli cellulari di sfingolipidi e che specificamente i livelli di ceramide correlano inversamente con quelli di GOLPH3 sia in cellule primarie (PHF) che in cellule tumorali (HeLa). Questo risultato è di particolare interesse dal momento che la ceramide è un lipide bioattivo con proprietà anti-proliferative. Studi ulteriori saranno messi in atto per valutare quale parte dell'effetto neoplastico derivante dall'amplificazione del gene GOLPH3 dipenda dai variati livelli di ceramide.

In aggiunta all'attività sperimentale durante il periodo del progetto ho svolto attività di diffusione scientifica riportando le premesse ed i risultati del programma STM presso l'Università di Stony Brook (in due seminari indipendenti) sia dando un seminario più generico delle mie attività di ricerca presso la Facoltà di Medicina dell'Università di Yale nel Connecticut in data 16 Settembre.