

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTA DI SCIENZE MM.FF.NN**



**LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOLOGIA MOLECOLARE**

**ELABORATO DI LAUREA**

*CONTRIBUTO AL PROGETTO: "PROTEOMICA DI FIBROBLASTI CUTANEI COLTIVATI IN VITRO OTTENUTI DA SOGGETTI NORMALI E DI PAZIENTI DIABETICI DI TIPO 1 CON O SENZA COMPLICANZE MICROVASCOLARI"*

Tutor: Prof. Gerolamo Lanfranchi  
Dipartimento di Biologia  
Co-Tutor: Dott. Millions Renato  
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

**Laureanda: SERAFEIMOYLA GKRTZAPI**

**ANNO ACCADEMICO 2005-2006**

# INDICE

<b>INDICE</b>	1
<b><i>ABBREVIAZIONI</i></b>	2
<b>1 ABSTRACT</b>	3
<b>2 INTRODUZIONE</b>	5
<b>3 MATERIALI E METODI</b>	9
3.1 Selezione dei pazienti	9
3.2 Biopsia e coltura di fibroblasti cutanei	9
3.3 Lisi ed estrazione delle proteine	10
3.4 Dosaggio delle proteine	10
3.5 Separazione delle proteine	10
I <sup>a</sup> dimensione: IEF	11
II <sup>a</sup> dimensione: SDS-PAGE	13
3.6 Visualizzazione dei risultati	14
3.7 Analisi dell'immagine	14
Valutazione degli spots	15
Misurazione degli spots	15
Sottrazione del background	15
Spot matching	15
Normalizzazione	16
3.8 Analisi Statistica	16
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	16
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i></b>	23
<b><i>APPENDICI</i></b>	25
Appendice A : Unità di misura	25
Appendice B : Prefissi nel S.I di misura	25

## ABBREVIAZIONI

<b>APS</b>	Persolfato d'ammonio
<b>BMI</b>	Indice di massa corporea
<b>CHAPS</b>	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate
<b>DNA</b>	Acido deossi ribonucleico
<b>DCCT</b>	Diabetes Control and Complication Trial
<b>DTT</b>	Ditiotreitolo
<b>DS</b>	Deviazione Standard
<b>EDTA</b>	Etilen Diammino Tetra Acetato
<b>FCS</b>	Siero Bovino Fetale
<b>IEF</b>	Isoelettrofocalizzazione
<b>IPG</b>	Immobilized pH Gradient
<b>mRNA</b>	RNA messaggero
<b>MW</b>	Massa Molecolare
<b>pI</b>	Punto Isoelettrico
<b>PBS</b>	Tampone fosfato salino
<b>RNA</b>	Acido ribonucleico
<b>SDS</b>	Sodio Dodecil Solfato
<b>SDS-PAGE</b>	Elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di SDS
<b>T1DM</b>	Diabete Mellito di Tipo 1
<b>C%</b>	Quantità di cross-linker come percentuale del monomero totale
<b>T%</b>	Percentuale in peso del monomero totale (acrilamide+cross-linker)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N' - Tetra Metilen Diammina
<b>Tris</b>	Tris idrossimetilaminometano
<b>UKPDS</b>	UK Prospective Diabetes Study
<b>2D-PAGE</b>	Two Dimensional Polyacrilimide Gel Electrophoresis

### 1. ABSTRACT

Il tirocinio da me svolto ha avuto sede presso un laboratorio del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Padova.

Il presente lavoro di tesi rappresenta un contributo al progetto: "Proteomica di fibroblasti cutanei coltivati in vitro, ottenuti da biopsie di soggetti normali e di pazienti diabetici di tipo 1, caratterizzati dalla presenza o dall'assenza di complicanze microvascolari renali".

Lo scopo del progetto, è quello di identificare, tramite elettroforesi bidimensionale, le differenze, sia qualitative che quantitative, tra le varie mappe proteiche di fibroblasti ottenuti dai gruppi di soggetti in esame al fine di identificare le proteine marker di predisposizione alla nefropatia diabetica. Sono stati utilizzati i fibroblasti in quanto rappresentano un ottimo modello per lo studio del diabete e della predisposizione genetica allo sviluppo delle sue complicanze.

Lo scopo di questo tirocinio è stato quello di stabilire le migliori condizioni sperimentali per l'analisi del proteoma di fibroblasti cutanei di soggetti sani e costruire delle mappe di riferimento per la successiva analisi comparativa con le mappe ottenute dai pazienti diabetici.

Nel complesso, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, i patterns degli spots ottenuti usando l'intervallo di pH stretto (4-7) presentano un'alta riproducibilità in accordo con studi riportati in letteratura.



## **2. INTRODUZIONE**

La ricerca delle basi genetiche delle malattie occupa un posto fondamentale nella ricerca biomedica contemporanea. L'esplorazione del codice genetico (genomica) dei cromosomi umani ha permesso l'individuazione nel DNA umano di circa 30.000 geni. Conoscendo l'assetto genico normale è possibile ricercare le eventuali alterazioni del DNA presenti in soggetti con malattie con chiare componenti genetiche accertate da inequivocabili dati clinici o da studi epidemiologici. Tuttavia, anche se l'identificazione dei geni costituisce la base di partenza delle indagini sulla predisposizione ereditaria alle malattie, essa non informa su come le informazioni contenute nel DNA siano poi effettivamente trascritte, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, e come esse possano essere associate alle malattie. Infatti, altre due tappe a valle del gene sono di cruciale importanza: lo studio della trascrizione del messaggio genetico negli RNA messaggeri (mRNA) generati a partire dall'informazione contenuta nel DNA (trascritoma) e l'identificazione di tutte le proteine sintetizzate a partire dal codice genetico e presenti nelle cellule (proteoma). Perciò la proteomica si occupa dell'effettiva identificazione e misurazione del prodotto finale della catena d'eventi che parte dalla trascrizione del messaggio genetico contenuto nel DNA. L'identificazione e quantificazione di tutte le proteine effettivamente espresse, e non soltanto degli mRNA trascritti, è di cruciale importanza dal momento che è stata riscontrata una disparità tra l'espressione qualitativa e quantitativa degli mRNA e quella delle corrispondenti proteine (Gygi et al., 1999).

Le maggiori informazioni circa la funzione di un gene si ottengono dallo studio della proteina, che ne rappresenta l'espressione diretta. Determinare la funzione di un gene, quindi, significa determinare le caratteristiche di una proteina che includono la struttura molecolare, le modificazioni co- e post- traduzionali, il grado di sintesi e di degradazione e la concentrazione cellulare (Klose, 1999).

La tecnica che attualmente permette di separare le diverse isoforme proteiche generate dalle modificazioni co- e post- traduzionali e da tutti i cambiamenti indotti da uno stato patologico o da una particolare condizione ambientale è la 2D-PAGE (two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis), tecnica di elezione per lo studio del proteoma (Gorg et al., 2000). Attraverso questa tecnica è possibile separare contemporaneamente centinaia di proteine ed ottenere

informazioni circa la massa molecolare (MW), il punto isoelettrico (pI) e l'abbondanza relativa di ciascuna di esse. Uno degli ambiti applicativi della proteomica è lo studio del diabete mellito. Il confronto tra un tessuto sano e uno malato può infatti evidenziare la presenza di proteine alterate dal punto di vista sia quantitativo che qualitativo. L'identificazione di queste proteine e delle loro funzioni può aiutare a comprendere il complesso meccanismo di insorgenza e progressione della malattia.

Il Diabete Mellito colpisce in Italia attualmente circa il 3-4% della popolazione, e tale percentuale è ancora maggiore se si considerano gli individui affetti da diabete non ancora diagnosticato. Di tutti gli individui diabetici, circa il 10% sono affetti da Diabete di Tipo 1 (T1DM), cioè la forma giovanile insulino-dipendente. La nefropatia diabetica è una delle principali cause d'insufficienza renale terminale, di ricorso alla dialisi ed al trapianto di rene (Viberti et al., 1992). È noto che la nefropatia diabetica si sviluppa in circa il 30-40% dei pazienti diabetici (Battle et al., 1995 ; Borch-Johnsen et al., 1992). Nonostante numerosi studi sia retrospettivi che prospettici UKPDS (Nasr et al., 1999), DCCT (Worrall, 1994) abbiano suggerito l'esistenza di una relazione tra il controllo glicemico e il rischio di sviluppo di nefropatia diabetica, in molti casi si assiste allo sviluppo di danno renale in un numero sostanziale di pazienti in terapia insulinica intensiva indipendentemente dal controllo metabolico (Borch-Johnsen et al., 1992). Risulta pertanto evidente come l'iperglicemia sia condizione necessaria, ma non sufficiente nel determinare il danno renale e, più in generale, le complicanze associate al diabete. Infatti, mentre la retinopatia diabetica nell'arco della malattia coinvolge la maggior parte dei pazienti Diabetici Tipo 1, l'incidenza della nefropatia diabetica cresce rapidamente nei primi 15-20 anni per poi ridursi con l'aumento della durata di malattia. Tale andamento si scontra con l'ipotesi che l'esposizione cronica all'iperglicemia sia il fattore più importante per lo sviluppo delle complicanze croniche del diabete, ma avvalga l'ipotesi dell'esistenza di una suscettibilità individuale (genetica) al danno renale, con fattori diversi dall'iperglicemia che contribuiscono alla genesi della nefropatia.

Queste osservazioni hanno spinto la ricerca verso l'individuazione di possibili caratteristiche intrinseche e/o genetiche allo scopo di identificare precocemente i soggetti diabetici di tipo 1 a rischio di nefropatia. Contemporaneamente si cerca di

chiarire i meccanismi patogenetici che portano allo sviluppo di tale complicanza. Tuttavia, le ricerche di possibili alterazioni geniche sono finora risultate nel complesso deludenti.

I fibroblasti rappresentano un ottimo modello sperimentale sia per lo studio dei meccanismi molecolari associati allo sviluppo di complicanze diabetiche, che per l'applicazione di tecniche di proteomica. Nei fibroblasti in coltura sono evidenziabili alterazioni d'attività metaboliche (relative al segnale insulinico, a trasporti ionici, a cinetiche di crescita, ecc) che esprimono un danno cellulare ubiquitario. Il fibroblasto in coltura mantiene quindi caratteristiche metaboliche che non dipendono dalla variazione dell'ambiente, ma che sono geneticamente determinate. E' stato dimostrato che i fibroblasti cutanei di soggetti diabetici nefropatici, mantenuti a lungo in coltura, e quindi decondizionati dall'ambiente metabolico in vivo, presentano un'aumentata attività nel controtrasporto  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Trevisan et al., 1992). E' verosimile che l'accelerata attività del controtrasporto sia dovuta ad alterazioni dei segnali intracellulari che ne modulano l'attività, tra cui la Protein-chinasi C (PKC). Recentemente è stato dimostrato che alcune isoforme della PKC sono attivate dall'iperglicemia nelle cellule muscolari lisce d'origine vascolare (Williams and Schrier, 1992). E' stato inoltre dimostrato che l'attività della PKC in fibroblasti cutanei di diabetici di Tipo 1 con nefropatia è aumentata rispetto ai diabetici di Tipo 1 non nefropatici. Tale aumentata attività si riscontrava a concentrazioni fisiologiche di glucosio (5 mmol/l) e aumentava se si incubavano i fibroblasti a concentrazioni di glucosio diabetiche (20 mmol/l) (Iori et al., 2003). Perciò i fibroblasti rappresentano un utile modello per lo studio d'anomalie intrinseche (=geneticamente determinate) del metabolismo cellulare. I fibroblasti coltivati in vitro e derivati da biopsie cutanee effettuate in pazienti con nefropatia (=albuminurici) hanno dimostrato una più rapida cinetica proliferativa, una maggiore sintesi di collagene ed un'alterazione negli scambi ionici di membrana, rispetto ai fibroblasti in coltura sia di diabetici di tipo 1 non complicati che di soggetti normali di controllo (Trevisan et al., 1997). Il fibroblasto umano rappresenta quindi un modello sperimentale ideale per la ricerca più ampia di predisposizioni genetiche alla malattia e per lo studio dei meccanismi del danno cellulare e metabolico.



L'argomento di questa tesi riguarda la messa a punto del protocollo d'elettroforesi bidimensionale applicato al progetto di ricerca intitolato "Proteomica di fibroblasti cutanei coltivati in vitro ottenuti da soggetti normali e di pazienti diabetici di tipo 1 con o senza complicanze microvascolari".

Lo scopo dello studio è quello di isolare e caratterizzare le proteine espresse in colture di fibroblasti umani ottenuti mediante biopsia cutanea da pazienti affetti da diabete di tipo 1 con o senza nefropatia (albuminuria  $>200 \mu\text{g}/\text{min}$ ) e con lunga durata di malattia (15-20 anni), e da soggetti normali di controllo.

Grazie all'applicazione della tecnica dell'elettroforesi bidimensionale si ottengono mappe peptidiche riproducibili e confrontabili necessarie per l'analisi qualitativa e quantitativa delle proteine presenti in un campione; successivamente le proteine presenti negli spots possono essere identificate mediante spettrometria di massa. Lo studio si propone quindi di analizzare ed identificare eventuali anomalie dello spettro proteico presenti nelle colture di fibroblasti, sia per una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici della nefropatia diabetica, che per identificare markers precoci di predisposizione allo sviluppo di tale complicanza. L'identificazione di proteine abnormemente espresse nei fibroblasti di soggetti diabetici affetti da complicanze nefropatiche rappresenterebbe, infatti, un'interessante novità nella ricerca mirata allo studio e alla comprensione dei meccanismi molecolari che portano al danno nefropatico. Da queste osservazioni iniziali possono poi derivare ulteriori ricerche effettuate anche con metodiche tradizionali e più finalizzate, allo scopo di cercare i rapporti fisiopatologici tra proteina anomala identificata ed il suo possibile ruolo nella fisiopatologia del danno cellulare e metabolico.

Per la messa a punto del protocollo di 2D-PAGE abbiamo utilizzato le colture cellulari ottenute dai pazienti sani di controllo selezionati per lo studio. La mappa proteica ottenuta da questo gruppo di soggetti sarà utilizzata per il confronto con quelle ottenute dai pazienti diabetici con e senza nefropatia. Per stabilire la qualità dei risultati ottenuti abbiamo seguito i criteri di valutazione più comuni che si usano per valutare la riproducibilità delle mappe proteiche bidimensionali. Tali criteri sono l'efficienza di matching, che è un indice della "sovrapponibilità" della posizione degli spots proteici in una mappa bidimensionale, e la variazione dell'intensità degli spots in mappe diverse. Questi criteri permettono di stabilire la

correttezza dell'intero processo d'estrazione, purificazione, dosaggio e separazione delle proteine.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 SELEZIONE DEI PAZIENTI:**

Sono stati reclutati tre gruppi di soggetti paragonabili per sesso, età e indice di massa corporea (BMI). Il primo gruppo comprendeva soggetti normali di controllo, mentre gli altri due gruppi erano costituiti da pazienti con diabete di tipo 1 con e senza nefropatia, in base ai valori d'escrezione urinaria d'albumina e di creatininemia. I pazienti diabetici presentavano inoltre un controllo metabolico paragonabile (percentuale d'emoglobina glicata), e una durata di malattia superiore ai 15 anni.

#### **3.2 BIOPSIA E COLTURA DI FIBROBLASTI CUTANEI:**

In questo studio abbiamo analizzato il proteoma di fibroblasti cutanei ottenuti dai soggetti sani. E' stato seguito il seguente protocollo sperimentale.

L'espianto cutaneo, eseguito mediante anestesia locale sulla superficie volare dell'avambraccio, delle dimensioni di circa 2x3 mm, è suddiviso con un bisturi in piccoli pezzetti distribuiti poi in fiasche da 25 cm<sup>2</sup>. Dopo l'aggiunta del terreno HAM'S F-10 Nutrient Mixture (Eurobio, Les Ulis Cedex B, France) addizionato con il 20% di siero bovino fetale (FCS) (Eurobio), 1 mM di glutamina (Eurobio), 100 U/ml di penicillina (Eurobio) e 100 µg/ml di streptomina (Eurobio), le fiasche sono mantenute a 37°C. Il terreno viene cambiato ogni 3-4 giorni. Solitamente, i fibroblasti sono visibili dopo 4-5 giorni d'incubazione e arrivano alla confluenza dopo circa 4 settimane. Quando le cellule sono a confluenza, il terreno viene aspirato e il monostrato viene lavato 3 volte con una soluzione fosfato-salina (PBS). I fibroblasti vengono staccati con aggiunta di 0.05% di tripsina-0.02% EDTA (Eurobio), trasferiti in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> e coltivati con il terreno di crescita al 10% di FCS. Dopo il terzo passaggio, le cellule vengono congelate e conservate in azoto liquido. Per ogni esperimento le cellule sono state utilizzate sempre all'ottavo passaggio.

### 3.3 LISI ED ESTRAZIONE DELLE PROTEINE:

La fase di preparazione del campione è molto importante, l'obiettivo finale è quello di raggiungere il maggior grado possibile di solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine contenute nel campione. Prima d'ogni esperimento i fibroblasti sono incubati per 24 ore con terreno quiescente privo di siero. Le cellule vengono lavate 3 volte con PBS. Ad ogni fiasca vengono aggiunti 0.4 ml di tampone di lisi composto da urea 8 M, CHAPS 4% p/v, IPG buffer 2%, al quale, al momento dell'uso, si aggiunge un cocktail di inibitori delle proteasi. Il lisato viene quindi raccolto, trasferito in provette *Eppendorf®* e sottoposto a 3 cicli di congelamento-scongelo in N<sub>2</sub> liquido e sonicazione in ghiaccio (Kawaguchi et al., 1995 ; Teixeira-Gomes et al., 1997). Dopo la lisi cellulare, il materiale insolubile è eliminato mediante centrifugazione a 14000 g a 4°C per 15 minuti.

Successivamente il campione proteico viene concentrato utilizzando apposite provette (Microcon-Amicon, Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 USA) provviste di un filtrino con un cut-off di 3000 dalton. Questo passaggio di concentrazione permette anche una parziale rimozione dei sali dal campione.

### 3.4 DOSSAGGIO DELLE PROTEINE

Il contenuto proteico delle frazioni viene determinato mediante il metodo di Lowry modificato (Lowry et al., 1951). La reazione di Lowry consiste della reazione del biureto seguita dalla riduzione in condizioni alcaline del reagente di Folin-Ciocalteu (acidi misti di fosfomolibdotungstano). Gli ioni rame facilitano il processo di riduzione. I gruppi cromogeni principali sono i legami peptidici complessati con rame (biureto) ed i molibdotungstani ridotti blu, che sono ridotti in gran parte da tirosina, triptofano ed aminoacidi polari. Il prodotto della reazione, etereopolimolibdeno blu ha una forte colorazione blu, con un assorbimento rilevabile a 540 nm. Per ogni dosaggio abbiamo creato una retta standard usando quantità note di albumina umana (Sigma). Per ogni esperimento abbiamo caricato 1 mg di proteine.

### 3.5 SEPARAZIONE DELLE PROTEINE:

Le proteine sono separate utilizzando due steps di elettroforesi: il primo in gradiente di pH (prima dimensione), il secondo mediante SDS-PAGE (seconda dimensione).

### I<sup>a</sup> dimensione: ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

L'IEF è un metodo elettroforetico ad alta risoluzione che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico. Le proteine sono molecole anfotere che possono avere carica netta negativa, positiva o uguale a zero a seconda del pH dell'ambiente circostante. Il prerequisito per una separazione altamente riproducibile è la presenza di un gradiente di pH stabile e continuo con una conducibilità regolare e costante. La presenza di un gradiente di pH è fondamentale nella tecnica dell'IEF, infatti, sotto l'effetto di un campo elettrico, una proteina si muove verso il punto nel quale la sua carica netta è nulla. Di fondamentale importanza, per la diffusione dell'elettroforesi bidimensionale, è stata l'introduzione dei gradienti di pH immobilizzati in sostituzione di quelli generati con anfotiti trasportatori. La tecnica dei gradienti di pH immobilizzati, proposta nel 1982 (Bjellqvist et al., 1982), è basata sull'incorporazione covalente di tamponi di immobiline, determinanti il pH, nella matrice di poliacrilamide. Un'immobilina è un acido o una base debole definita dal suo valore di pK, contenente catene laterali cariche con capacità tamponanti. Il pH in ogni punto del gel è determinato dalla misura di immobiline che si trovano in quel punto ed è stabile.

Nel nostro caso sono state usate strisce di gel preformati di acrilamide/bisacrilamide (T=4%, C=3%) copolimerizzati su un supporto di plastica con la miscela di immobiline (IPG strips) che sono disponibili in commercio in forma disidratata e congelata. E' possibile scegliere strips di diversa lunghezza e con diverso gradiente di pH. Nel nostro caso la lunghezza delle strips è di 24 cm ed gli intervalli di pH utilizzati sono 3-10 e 4-7. Le strisce sono conservate disidratate alla temperatura di -20°C, al momento dell'uso vengono lasciate 10 min a temperatura ambiente, per evitare rotture dello strato di gel quando si toglie la sottile pellicola che le ricopre.

La composizione della soluzione di reidratazione contiene un agente denaturante e solubilizzante (urea), un detergente non ionico o zwitterionico (CHAPS), un agente riducente (ditiotreitolo, DTT) ed un tracciante colorato (blu di bromofenolo). Fondamentale è l'aggiunta di "IPG buffer" con range di pH uguale a quello della strip in uso. Nel nostro caso una quantità costante (1000 µg) di proteine solubilizzate è stata diluita in 450 µl con una soluzione di reidratazione

(8 M urea, 2% CHAPS, 0.5 % IPG buffer, 1% DTT, tracce di bromofenolo blu). L'IEF è stata condotta sull'apparecchio IPGphor Isoelectric Focusing (Amersham Biosciences) mantenuto alla temperatura costante di 20°C mediante un sistema di raffreddamento.

Manualmente si procede in questo modo:

- si appoggia lo “strip holder” a forma di barchetta sulla piastra dell'apparecchio;
- il campione viene distribuito al centro dello “strip holder” a ponte tra i due elettrodi;
- si posizionano le strips con il gel verso il basso (entrambi gli elettrodi devono essere a contatto con il gel) facendo attenzione a non lasciare bolle d'aria sotto la striscia;
- si aggiunge un po' d'olio minerale fino a coprire completamente la strip al fine di minimizzare il contatto con l'aria, responsabile dell'evaporazione che può facilitare la cristallizzazione dell'urea durante la reidratazione.

L'IEF viene condotta a voltaggi molto alti (fino ad un massimo di 8000 V) e a correnti molto basse (fino ad un valore massimo di 50  $\mu$ A per IPG strip). Un tipico protocollo isoelettroforetico è caratterizzato da una serie di steps in cui il voltaggio viene aumentato gradualmente fino al valore finale desiderato per il focusing. Il voltaggio iniziale è, solitamente, basso per minimizzare l'aggregazione del campione e per favorire l'entrata del campione nel gel di poliacrilamide, in particolare delle proteine ad elevato peso molecolare.

Nel nostro caso, per la IEF con strips da 24 cm e gradienti di pH 4-7 e 3-10, abbiamo seguito il protocollo riportato in Tabella 1:

Step	Voltaggio (V)	$\mu$ A/strip	Tempo
Reidratazione	50	50	12h
1 step	200	50	1h
2 step	500	50	1h
3 step	1000	50	1h
4 step	1000-8000	50	4h
5 step	8000	50	4h

**Tabella 1:** protocollo di isoelettrofocalizzazione

Prima di separare le proteine in seconda dimensione è necessario equilibrare le IPG strips in una soluzione fortemente denaturante per risolubilizzare le proteine e favorirne il trasferimento dalla prima alla seconda dimensione (Gorg et al., 1987). L'equilibratura avviene in due steps: nel primo le strips vengono trattate con una soluzione contenente sodio dodecilsolfato (SDS) e DTT, per denaturare e ridurre le proteine; nel secondo si usa la stessa soluzione in cui il DTT è sostituito dalla iodoacetamide, per l'alchilazione dei gruppi sulfidrilici e per inibirne una eventuale riossidazione.

#### II<sup>a</sup> dimensione: SDS-PAGE:

La seconda dimensione dell'elettroforesi bidimensionale è un'elettroforesi su gel di poliacrilamide condotta in presenza di SDS.

L'SDS è un detergente anionico (Lopez et al., 1991) in grado di legarsi alle proteine in modo indipendente dalla composizione aminoacidica provocandone la denaturazione, la distruzione dei legami a idrogeno, la rottura dei ponti di solfuro, la perdita della struttura secondaria e terziaria. In presenza di un eccesso di SDS, per ogni grammo di proteina si legano circa 1.4 g di detergente, fornendo alla proteina una quantità di carica negativa costante per unità di massa e permettendo la separazione proteica esclusivamente in base alla massa molecolare.

I complessi proteina-SDS, si muoveranno verso il polo positivo del campo elettrico applicato e, per le proprietà di setaccio molecolare del gel, la loro mobilità risulta essere inversamente proporzionale al  $\log_{10}$  del peso molecolare.

Le proteine, già separate in base al loro punto isoelettrico, migrano dalla prima alla seconda matrice di separazione grazie all'azione di un campo elettrico esterno. I gel vengono polimerizzati contemporaneamente (fino ad un massimo di 6) nella camera di polimerizzazione (Ettan Dalt VI gel caster, Amersham Biosciences). Le singole camere di polimerizzazione consistono di due vetri (27 x 21 cm) uniti a libro da una striscia di silicone; sui due lati sono posizionati due spaziatori aventi uno spessore di 1.0 mm. Se si polimerizzano meno di 6 gel, lo spazio che rimane inutilizzato viene occupato da spaziatori specifici (separator sheet). Per la separazione in seconda dimensione abbiamo utilizzato gels con una concentrazione di acrilamide pari al 12%, che offre una buona risoluzione delle proteine comprese tra 14 e 100 KDa. La composizione dei gels è: 12% di

soluzione stock di Acrilamide/Bisacrilamide (40%T, 2.5%C), Tris-HCl 1.87 M, pH 8.8, APS 0.5%, TEMED 0.03%.

Sopra il bordo dei gel viene versato delicatamente del butanolo saturo in acqua al fine di mantenere la superficie superiore del gel completamente piatta ed omogenea. Il gel viene lasciato polimerizzare per circa 2 ore a temperatura ambiente. La superficie superiore di ciascun gel, regione in cui sarà caricata la strip, viene passata sotto acqua corrente per eliminare gli eventuali residui di acrilamide a poi sciacquata con acqua bidistillata. L'eccesso d'acqua viene poi asciugato con piccoli ritagli di carta assorbente. La strip viene inserita tra i due vetri e successivamente si aggiunge una soluzione di agarosio allo 0.5% sciolto nel tampone di corsa elettroforetica (la soluzione di agarosio deve essere bollente). Una volta raffreddatosi, l'agarosio fornisce una soluzione di continuità per il passaggio di proteine tra la prima e la seconda matrice d'acrilamide. La composizione del tampone di corsa è Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%. La SDS-PAGE viene fermata quando il tracciante ha raggiunto il bordo inferiore del gel e viene condotta a temperatura costante (20°C) ed a voltaggio costante (75 V).

### 3.6 VISUALIZZAZIONE DEI RISULTATI:

Per visualizzare le proteine sul gel possono essere impiegati diversi metodi. La scelta deve tenere conto principalmente di due fattori:

- la concentrazione delle proteine nel campione;
- la strategia che si vuole seguire successivamente per identificare le proteine.

Per la messa a punto del protocollo usato in questo studio, è stato utilizzato il colorante Coomassie Colloidale Brilliant Blue. I vantaggi relativi all'uso di questo colorante sono i seguenti: è compatibile con la successiva analisi in spettrometria di massa degli spots proteici; è lineare e quindi utilizzabile per valutazioni comparative; è più sensibile rispetto al Coomassie Blue "classico"; è economico e riciclabile. I gel sono stati colorati per tre ore e decolorati overnight con una soluzione acquosa d'acido acetico (7%) e metanolo (10%).

### 3.7 ANALISI DELL'IMMAGINE:

Dopo la fase di colorazione/decolorazione, l'immagine è stata acquisita con uno scanner a trasmittanza (Epson Expression 1680 Pro) che converte i valori di scala di grigio in densità ottica ed analizzata con un software dedicato (Proteomweaver, BioRad) per ottenere da un gel il maggior numero d'informazioni possibili e

cogliere le differenze esistenti tra gels diversi. Le operazioni principali che il programma permette di compiere per ciascun gel prevedono: l'acquisizione degli spots (spot detection), la loro misurazione (spot measurement), la sottrazione del "rumore di fondo" (background subtraction) e il confronto tra gli spots di gels diversi (spot matching) ed infine la normalizzazione dei dati.

1) Valutazione degli spots:

Dal menù principale è possibile impostare i parametri che il programma deve utilizzare per "vedere" gli spots sul gel, che possono essere applicati solo al gel in esame o mantenuti costanti per processare una serie di più gels che appartengono allo stesso esperimento. I principali parametri sono:

-intensità: è calcolata come il volume di uno spot rispetto al rumore di fondo;

-contrasto: altezza di uno spot rispetto al rumore di fondo;

-raggio: larghezza di uno spot.

Il programma è dotato di una funzione che rende possibile l'intervento manuale per rifinire la forma e le dimensioni di certi spots non correttamente interpretati dalla funzione automatica, per aggiungerne o eliminarne e per separare tra loro due spots che, essendo vicini, non vengono visti distintamente e vengono considerati come un tutt'uno.

2) Misurazione degli spots:

La misura d'ogni spot serve a rappresentare la sua abbondanza sul gel e genera le informazioni che servono poi al "matching": viene effettuata in automatico dal software in contemporanea alla detection degli spots.

3) Sottrazione del background:

Tutte le immagini dei gels contengono in varia misura un certo background che deriva dalla colorazione e dall'acquisizione dell'immagine. Volendo eseguire un'accurata misurazione occorre rimuoverlo prima di procedere al matching, operando con diverse modalità, sia manuali che automatiche, che possono essere impostate di volta in volta.

4) Spot matching:

Il matching utilizza i dati generali dal processo di misurazione degli spots: attraverso il confronto dei dati ottenuti da due gels, è possibile effettuare un abbinamento tra gli spots presenti su entrambi. Gli spots visualizzati su due gels che non coincidono per posizione e/o dimensione, vengono evidenziati dal



software con un codice a colori che permette di cogliere facilmente le variazioni. Il software permette di confrontare tra loro un elevato numero di gels nell'ambito dello stesso esperimento e cogliere così ogni variazione nella distribuzione delle proteine sul gel.

#### 5) Normalizzazione:

Esistono “variabili strumentali/operative”, come errori di caricamento e/o di quantificazione del campione e differente durata del processo di colorazione/decolorazione dei gel, che possono alterare la riproducibilità dei risultati e creare falsi positivi. Grazie a complessi calcoli matematici, il processo di normalizzazione serve a ridurre la variabilità sperimentale. La normalizzazione è svolta automaticamente dal software e solo dopo questo passaggio è possibile confrontare quantitativamente le intensità degli spots in gels diversi.

#### 3.8 ANALISI STATISTICA:

Il confronto fra le medie è stato svolto utilizzando il test T di Student. I valori sono stati considerati statisticamente significativi solo per  $p < 0,05$ . I risultati sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard.

### **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

Con le tecniche di proteomica è possibile misurare le quantità relative delle diverse proteine di un singolo proteoma per confrontarle con quelle presenti nella stessa cellula in stadi cellulari diversi o dopo il trattamento con un particolare farmaco (Cunningham et. al., 2000), oppure valutare le differenze tra i proteomi di cellule sane e malate. Le aree in cui si sta investendo di più sono quelle che comprendono le malattie ad alto impatto epidemiologico come i tumori, le patologie cardiovascolari, quelle neurologiche e il diabete (Pang et al., 2000).

L'analisi in larga scala del proteoma mediante 2D-PAGE ci permette di indirizzare la ricerca sulle proteine e sulle eventuali modificazioni post-translazionali coinvolte nella patogenesi del diabete (Jungblut et al., 1999).

Uno step essenziale è generare mappe bidimensionali di riferimento che rappresentano il pattern proteico in condizioni normali. Queste mappe possono essere utilizzate per il confronto con quelle ottenute da pazienti, oppure per capire l'effetto di stimoli extracellulari, come ad esempio la somministrazione di farmaci, sulla sintesi proteica (Kondo et al., 2001 ; Malmstrom et al., 2001).

Il nostro studio è stato svolto su fibroblasti umani ottenuti tramite biopsia cutanea da soggetti normali. Tali soggetti sono stati selezionati in base ai parametri clinici e fisici descritti nella sezione “Materiali e metodi”. Tale selezione è stata condotta al fine di rendere i gruppi a confronto in tutto simili tranne che per la presenza della patologia in studio.

La riproducibilità delle mappe bidimensionali è un prerequisito essenziale per un’accurata analisi proteomica.

Tenendo conto della variabilità “biologica” di soggetti differenti (Klose et al., 1983), è innanzi tutto necessario avere un numero sufficiente di campioni biologici di partenza su cui svolgere un numero di repliche che consenta di effettuare successivamente un’analisi statistica dei risultati. A tal fine ogni esperimento è stato svolto in duplicato.

Secondo quanto riportato da Nishihara e colleghi (2002) partendo da campioni proteici complessi, come ad esempio lisati cellulari totali, circa il 6-20% degli spots non risultano accoppiabili. Poiché anche tutte le variazioni sperimentali possono influenzare il risultato finale, i vari passaggi di lavoro sono stati svolti nelle stesse condizioni e dalla stessa persona e sono stati usati gli stessi materiali al fine di avere tutti i prerequisiti per una massima affidabilità. Quindi, per garantire tali prerequisiti, ogni passaggio di coltura cellulare, preparazione del materiale e separazione delle proteine, è stato svolto in condizioni standardizzate e testato per essere il migliore possibile.

Le linee cellulari utilizzate sono state coltivate usando lo stesso incubatore, lo stesso terreno di coltura e gli stessi prodotti chimici necessari (vedi “Materiali e metodi”). Per ogni esperimento le cellule sono state utilizzate sempre all’ottavo passaggio. I cicli di congelamento-scongelo e di sonicazione in ghiaccio garantiscono una lisi completa delle cellule che è stata svolta in presenza di un cocktail di inibitori di proteasi per ridurre il rischio di degradazione. I campioni proteici sono stati aliquotati e conservati a -20°C.

Una volta ottenute le mappe proteiche bidimensionali, per avere una comparazione accurata degli spots è stato usato il software Proteomweaver che permette l’acquisizione, misurazione, e confronto (matching) degli spots proteici nei diversi gels. Anche se il programma è in grado di svolgere tutte queste

operazioni in modo automatico, il passaggio di matching è controllato manualmente.

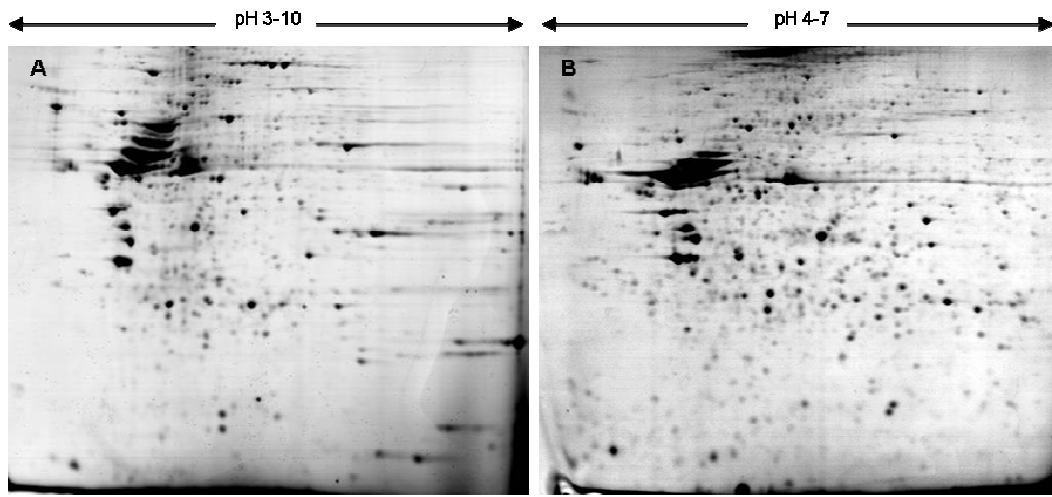
Per stimare la riproducibilità dei risultati ottenuti, sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- efficienza di matching: indica la percentuale di “matched spot” rispetto al numero totale di spots acquisiti e rappresenta una valutazione qualitativa;
- variazione d'intensità di “matched spots”: rappresenta una valutazione quantitativa.

Entrambe queste informazioni sono ottenibili tramite la creazione di uno “scatter plot” per ogni coppia di gels confrontata. Lo scatter plot è un diagramma di dispersione: sugli assi cartesiani sono inseriti le intensità degli spots dei gels confrontati, i punti all'interno del grafico rappresentano gli appaiamenti tra spots. Il numero d'appaiamenti (e quindi di punti all'interno del grafico), rispetto al numero totale di spots rilevati nei gels, rappresenta l'efficienza di matching. Matched spots con la stessa intensità si trovano sulla diagonale (bisettrice) del grafico. La distanza dalla diagonale è una misura della differenza dell'intensità della proteina nei due gels.

Per analizzare il maggior numero di proteine possibili, i primi esperimenti sono stati svolti utilizzando IPG strips con un intervallo di pH ampio, compreso tra 3 e 10 (figura 1 A). Sui risultati ottenuti abbiamo svolto analisi di confronto per un totale di 10 mappe bidimensionali ottenute da 5 soggetti normali (2 mappe per ogni soggetto), quindi complessivamente 45 confronti. Grazie alla visualizzazione dei dati, è risultato evidente che più del novanta per cento degli spots visibili nell'intervallo di pH 3-10 era compreso nella zona tra 4 e 7. Quindi, al fine di migliorare la risoluzione delle mappe bidimensionali ottenute, abbiamo separato nuovamente gli stessi campioni proteici mantenendo il protocollo tale quale ma usando IPG strips con intervallo 4-7 (Figura 1 B).

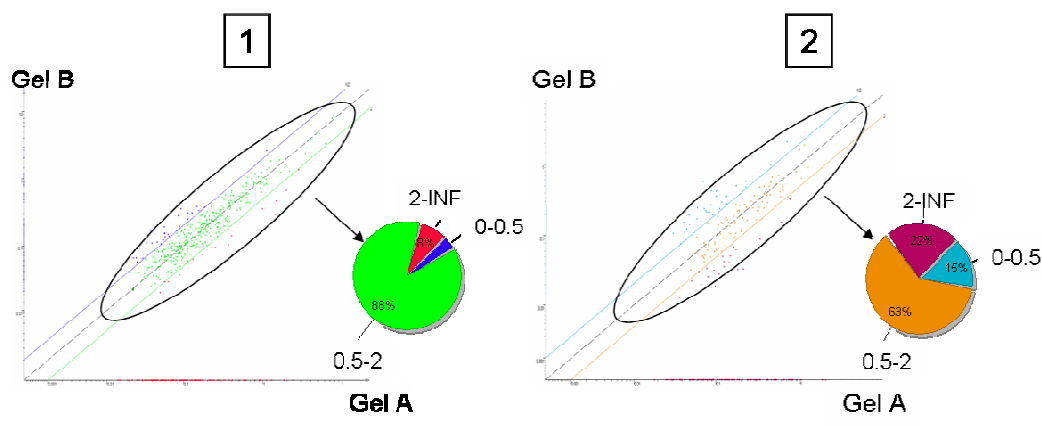
In Figura 1 riportiamo un'immagine dove sono confrontate due mappe proteiche bidimensionali rappresentative. Nella prima mappa (gel A) sono state usate strips con un intervallo di pH ampio (3-10) mentre nella seconda mappa (gel B) sono state usate strips con un intervallo di pH più stretto (4 a 7).



**Figura 1:** Immagini rappresentative delle mappe bidimensionali ottenute da fibroblasti umani in coltura usando l'intervallo di pH 3-10 (A) e 4-7 (B).

Il primo risultato, usando le IPG strips con l'intervallo di pH 4-7, è stato trovare un significativo aumento ( $p < 0.05$ ) del numero di spots rilevabili caratterizzati inoltre da una miglior risoluzione, evidente anche visivamente (Figura 1 B).

L'impressione visiva è stata confermata confrontando i dati d'efficienza di matching e d'intensità degli spots ottenuti usando i due diversi intervalli di pH. Riportiamo in Figura 2 scatter plots rappresentativi dei risultati ottenuti usando le strips con diverso intervallo di pH.



**Figura 2:** Scatter plots rappresentativi del confronto tra mappe bidimensionali ottenute utilizzando l'intervallo di pH 4-7 (1) e 3-10 (2). Nei grafici a settori circolari sono rappresentate le percentuali di matched spots con una variazione dell'intensità compresa tra 0-0.5, 0.5-2 e maggiore di 2.

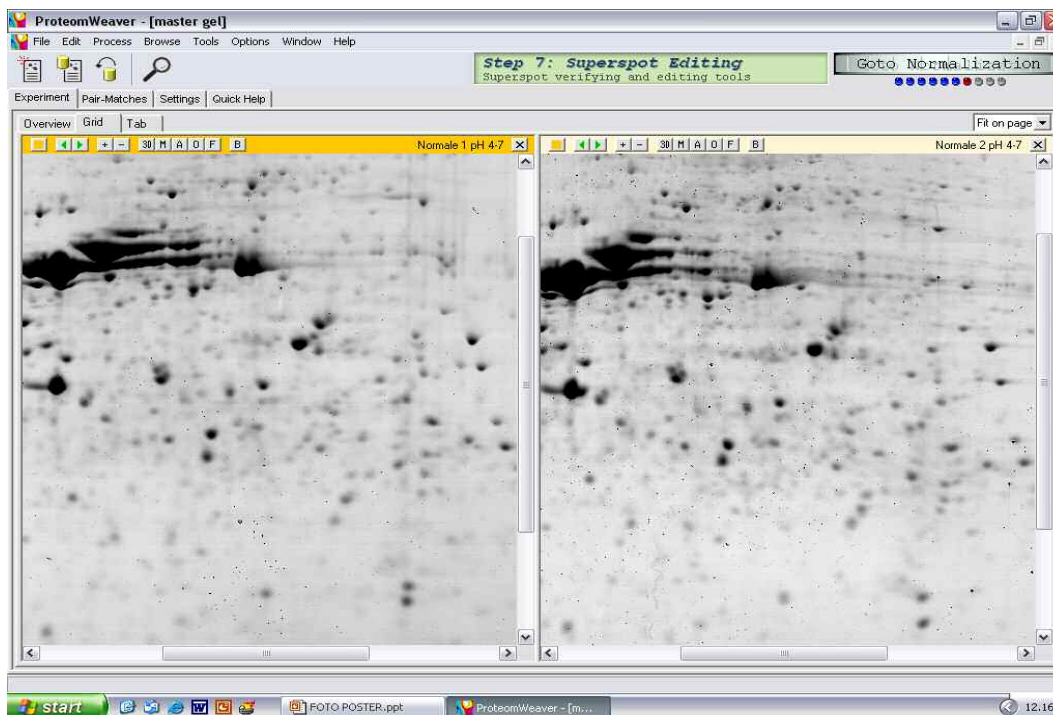
Abbiamo osservato che i gels ottenuti con l'intervallo 4-7, rispetto ai 3-10, hanno un significativo ( $p < 0,05$ ) incremento dell'efficienza di matching, passando dal 60 all'80%, ed un incremento del numero di spots appaiati che hanno variazione nell'intensità minore di un fattore due, passando dal 62 all'88% (Tabella 2).

Intervallo di pH utilizzato	N° di spots rilevati ( $\pm$ DS)	Efficienza di matching (%)	Matched spots con variazione d'intensità inferiore di un fattore 2
3-10	321 $\pm$ 68	60 $\pm$ 6	62 $\pm$ 12
4-7	592 $\pm$ 92	80 $\pm$ 7	88 $\pm$ 9

**Tabella 2:** Caratteristiche dei gels analizzati dopo elaborazione ed analisi della riproducibilità.

Nel complesso, i pattern degli spots ottenuti usando l'intervallo di pH stretto presentano un'alta riproducibilità in accordo con studi riportati in letteratura sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo (Lehr et al., 2003).

In Figura 3 riportiamo un'immagine con due gels 4-7 affiancati come esempio visivo a dimostrazione della buona riproducibilità delle mappe bidimensionali.



**Figura 3.** Riproducibilità di due tipici 2D-PAGE gels derivati da fibroblasti umani usando IPG strips con pH 4-7.

Anche se la maggioranza degli spots accoppiati mostra un'alta riproducibilità, abbiamo comunque notato, pure nelle mappe ottenute con IPG strips 4-7, che alcuni matched spots variano nelle loro intensità fino ad un fattore di 5. Frequentemente questo è osservato in spots che hanno intensità deboli. Gli spots accoppiati che, pur derivando dallo stesso campione o da campioni appartenenti allo stesso gruppo, presentano una variazione d'intensità superiore di un fattore 2, saranno esclusi dal successivo confronto con le mappe ottenute dai pazienti diabetici.

Oltre all'uso di IPG strips con un intervallo di pH stretto, quando si parte da campioni cellulari, un'altra valida strategia per aumentare la risoluzione delle mappe bidimensionali, è quella di prefazionare le proteine in base alla loro localizzazione intracellulare. Esistono protocolli che consentono di separare le proteine presenti nel nucleo, mitocondri, reticolo endoplasmatico, citosol e membrana plasmatica. Ogni frazione purificata può successivamente essere separata mediante 2D-PAGE. Questi protocolli hanno però lo svantaggio di richiedere grandi quantità di materiale, non sempre disponibile, e tempi molto lunghi.

L'analisi proteomica mira al reale profilo proteico che è la chiave degli eventi regolatori dei meccanismi cellulari. Attualmente la proteomica fornisce un approccio complementare che, rispetto alle tecniche di studio dell'mRNA, è potenzialmente più comprensivo nel chiarire i processi cellulari e i meccanismi fisiopatologici che sono alla base dell'insorgenza delle malattie (Celis et al., 1999). I protocolli di studio basati sulla 2D-PAGE richiedono un lavoro accurato per stabilire i parametri ottimali di esecuzione. Però una volta ottimizzato l'intero processo, questa tecnologia presenta potenzialità uniche, di grande utilità per lo studio delle proteine e delle loro implicazioni fisiopatologiche.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Batlle, D., Lurbe, A., LaPointe, M., Agrawal, R. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, type I diabetes, and hypertension. *Kidney. Curr. Surv. World. Lit.* 4, 1-3 (1995)
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., Postel, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology, and some applications. *J. Bioche. Biophys. Methods* 6, 317-339 (1982)
- Borch-Johnsen, K., Norgaard, K., Hommel, E., Mathiesen, E.R., Jensen, J.S., Deckert, T., Parving, H.H. Is diabetic nephropathy an inherited complication? *Kidney Int.* 41, 719-722 (1992)
- Celis, J.E., Gromov, P. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1), 16-21 (1999)
- Cunningham, M.J. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 291-300 (2000)
- Gorg, A., Obermaier, C., Gunter, B., Harder, A., Burghard, S., Wildgruber, W. and Weiss, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradient. *Electrophoresis.* 21, 1037-1053 (2000)
- Gorg, A., Postel, W., Weser, J., Gunther, S., Stahler, J.R., Hanash, S.M., Somerlot, L. Elimination of point steaking on silver-stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis.* 8, 122-124 (1987)
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1720-1730 (1999)
- Iori, E., Marescotti, M.C., Vedovato, M., Ceolotto, G., Avogaro, A., Tiengo, A., Del Prato, S., Trevisan, R. In situ protein kinase C activity is increased in cultured fibroblasts from Type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia.* 46, 524-30 (2003)
- Jungblut, P.R., Zimny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Stlik, J., Koupilova, K., Pleissner, K.P., Otto, A., Muller, E.C., Sokolowska-Kohler, W., Grabher, G., Stoffler, G. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis.* 20, 2100-2110 (1999)
- Kawaguchi, S.I., Kuramitsu, S. Separation of heat-stable proteins from *Thermus thermophilus* HB8 by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 16, 1060-1066 (1995)
- Klose, J. Genotypes and Phenotypes. *Electrophoresis* 20, 643-652 (1999)
- Klose, J., Willers, I., Singh, S., Goedde, H.W. Two-dimensional electrophoresis of soluble and structure-bound proteins from cultured human fibroblasts and hair root cells: Qualitative and quantitative variation. *Human Genetics.* 63, 262-267 (1983)

Kondo, T., Sakaguchi, M., Namba, M. Two-dimensional gel electrophoretic studies on the cellular aging: accumulation of alpha-2-



macroglobulin in human fibroblasts with aging. *Exp.Gerontol.* 36, 487-495 (2001)

- Lehr, S., Kotza, J., Knebel, B., Schiller, M., Krone, W., Muller-Wieland, D. Primary skin fibroblasts as human model system for proteome analysis *Proteomics.* 2, 280-287 (2002)
  - Lopez, M.F., Patton, W.F., Utterback, B.L., Chung-Welch, N., Barry, P., Skea, W.M., Cambria, R.P. Effect of various detergents on protein migration in the second dimension of two-dimensional gels. *Anal. Biochem.* 199 (1), 35-44 (1991)
  - Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
  - Malmstrom, J., Westergren-Thorsson, G., Marko-Varga, G. A proteomic approach to mimic fibrosis disease evolvement by an in vitro cell line. *Electrophoresis.* 22, 1776-1784 (2001)
  - Nasr, C.E., Hoogwerf, B.J., Faiman, C., Reddy, S.S. United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). Effects of glucose and blood pressure control on complications of type 2 diabetes mellitus. *Cleve. Clin. J. Med.* 66(4), 247-53 (1999)
  - Nishihara, J.C., Champion, K.M. Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis.* 23, 2203-2215 (2002)
  - Pang, C.P., Baum, L., Lam, D.S. Hunting for disease genes in multi-functional diseases. *Clin. Chem. Lab. Med* 38, 819-825 (2000)
  - Teixeira-Gomes, A.P., Clockaert, A., Bezard, G., Dubray, G., Zygmunt, M.S. Mapping and identification of *Brucella melitensis* proteins by two-dimensional electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis.* 18, 156-162 (1997)
  - Trevisan, R., Li, L.K., Messent, J., Tariq, T., Earle, K., Walker, J.D., Viberti, G. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity and cell growth in cultured skin fibroblasts of IDDM patients with nephropathy. *Diabetes* 41, 1239-46 (1992)
  - Trevisan, R., Yip, J., Sarika, L., Li, L.K., Viberti, G. Enhanced collagen synthesis in cultured skin fibroblasts from insulin-dependent diabetic patients with nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 1133-9 (1997)
  - Viberti, G.C., Yip-Messent, J., Morocutti, A. Diabetic nephropathy. Future avenue. *Diabetes Care.* 15, 1216-25 (1992)
  - Williams, B., Schrier, R.W. Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Diabetes.* 41, 1464-72 (1992)
- Worrall, G. Results of the DCCT trial. Implications for managing our patients with diabetes. *Can Fam Physician.* 40, 1955-60,1963-5 (1994)

## APPENDICI

### APPENDICE A: UNITA' DI MISURA

<b>M</b>	Molare (concentrazione)
<b>mM</b>	millimolare
<b>mmol/l</b>	millimolare/litro
<b>nm</b>	nanometro
<b>mm</b>	millimetro
<b>cm</b>	centimetro
<b>cm<sup>2</sup></b>	centimetro quadrato
<b>ml</b>	millilitro
<b>g</b>	grammo
<b>mg</b>	milligrammo
<b>min</b>	minuto
<b>h</b>	ora
<b>°C</b>	grado Celsius
<b>V</b>	Volt
<b>μA</b>	microampere
<b>kDa</b>	chilodalton
<b>U</b>	unità
<b>p/v</b>	peso/volume

### APPENDICE B : PREFISSI NEL S.I DI MISURA

<b>10<sup>9</sup></b>	giga	G
<b>10<sup>6</sup></b>	mega	M
<b>10<sup>3</sup></b>	kilo	K
<b>10<sup>-1</sup></b>	deci	d
<b>10<sup>-2</sup></b>	centi	c
<b>10<sup>-3</sup></b>	milli	m
<b>10<sup>-6</sup></b>	micro	μ
<b>10<sup>-9</sup></b>	nano	n
<b>10<sup>-12</sup></b>	pico	p

