

## Metabolismo glucidico alterato e fenomeni di proteolisi in mioblasti condizionati da cellule di cancro del pancreas: analisi di espressione genica mediante tecnica microarray su una piattaforma di 5000 geni di muscolo scheletrico\*

Eliana Greco<sup>1</sup>, Daniela Basso<sup>1</sup>, Caterina Millino<sup>2</sup>, Chiara Romualdi<sup>2</sup>, Paola Fogar<sup>3</sup>, Anna Valerio<sup>4</sup>, Milena Bellin<sup>2</sup>, Carlo-Federico Zambon<sup>3</sup>, Filippo Navaglia<sup>1</sup>, Noemi Dussini<sup>5</sup>, Angelo Avogaro<sup>4</sup>, Sergio Pedrazzoli<sup>3</sup>, Gerolamo Lanfranchi<sup>2</sup>, Mario Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di medicina di Laboratorio,

<sup>2</sup>Centro di biotecnologie CRIBI,

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche,

<sup>4</sup>Dipartimento di medicina Clinica e Sperimentale,

<sup>5</sup>Dipartimento di Pediatria, Università di Padova

### ABSTRACT

**Background & Aims:** We verified whether pancreatic cancer cell lines (MIAPaCa2, CAPAN-1, PANC-1, BxPC3) conditioned media (CM) alter glucose metabolism and gene expression profile (microarray experiment with a platform of 5000 skeletal muscle cDNA) in mice myoblasts. **Methods:** Myoblasts were incubated with control or pancreatic cancer CM for 24 and 48 hrs. **Results:** Lactate significantly increased in CM as compared to non-conditioned myoblasts. No variations in the expression levels of the main genes involved in glycolysis were found in CM myoblasts. Propionil Coenzyme A carboxylase and isocitrate dehydrogenase 3 beta (IDH3B) genes, which encode enzymes of the tricarboxylic acid cycle were overexpressed, while IGF1R and VAMP5 genes were underexpressed in CM myoblasts. PAFAH1B1 and BCL-2 genes (intracellular signal transduction) and the serine protease cathepsin G (proteolysis), were overexpressed in CM myoblasts. Tyrosine accumulation in CM myoblasts suggested that proteolysis overcomes protein synthesis. Sorcin, actin alpha, troponin T1 and filamin A were underexpressed in CM myoblasts. **Conclusions:** Our findings demonstrate that pancreatic cancer cell conditioned media enhanced lactate production and induced proteolysis, possibly by altering the expression levels of a large number of genes, not only those involved in protein biosynthesis and degradation or glucose metabolism, but also those involved in the tricarboxylic acid cycle and in vesicle traffic.

### RIASSUNTO

Abbiamo verificato se i terreni condizionati dalle linee cellulari di cancro del pancreas (MIAPaCa2, CAPAN-1, PANC-1, BxPC3) (TC) possano alterare il metabolismo glucidico ed il profilo di espressione genica (analisi microarray mediante una piattaforma di 5000 cDNA di muscolo scheletrico) nei mioblasti di topo. **Metodi:** I mioblasti sono stati condizionati con i terreni condizionati dalle linee tumorali pancreatiche e con il terreno di controllo per 24 e 48 ore. **Risultati:** Il lattato aumentava significativamente nei mioblasti condizionati rispetto ai mioblasti non condizionati. Nei mioblasti condizionati non è stata riscontrata nessuna variazione nei livelli di espressione dei principali geni coinvolti nella glicolisi. Risultavano essere sovraespressi i geni Propionil Coenzima A carbossilasi e isocitrato deidrogenasi 3 beta (IDH3B), che codificano enzimi coinvolti nel ciclo degli acidi tricarbossilici, i geni PAFAH1B1, BCL-2 (coinvolti nella trasduzione del segnale intracellulare) e Catepsina G serina-proteasi (proteolisi) mentre risultavano essere sottoespressi i geni IGF1R, VAMP5, Sorcina, alfa actina, troponina T1 e filamina A. L'accumulo di tirosina nei mioblasti condizionati suggerisce il verificarsi di fenomeni proteolitici a discapito della sintesi proteica. **Conclusioni:** I nostri risultati dimostrano che i terreni condizionati dalle cellule di cancro del pancreas aumentano la produzione di lattato e inducono la proteolisi, probabilmente alterando l'espressione di numerosi geni, non solo coinvolti nella sintesi e degradazione proteica e nel metabolismo glucidico ma anche geni coinvolti nel ciclo degli acidi tricarbossilici e nel traffico vescicolare.

### INTRODUZIONE

Nei pazienti con cancro del pancreas viene frequente-

mente riscontrata una storia clinica di diabete di tipo 2 di recente diagnosi (1-3). Sulla base di dati epidemiologici è stato supposto che il diabete di tipo 2 è sia un fattore di

\*Lavoro presentato al "SIBioC 2003, 35° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Firenze 14-17 Ottobre 2003

rischio per l'adenocarcinoma di pancreas (2,4-6), sia un danno metabolico strettamente associato o conseguente al carcinoma pancreatico di per sè (7,8). Sebbene le due ipotesi non si escludano vicendevolmente, la seconda risulta essere supportata da una serie di dati clinici e sperimentali (1,3,9-14): nei pazienti con cancro del pancreas il diabete di tipo 2 è di solito di recente insorgenza (2,3,7,8) e la rimozione del tumore può determinare sia un miglioramento della tolleranza glucidica sia una completa regressione del diabete (1,9). Pertanto, studi sperimentali *in vivo* and *in vitro* indicano che i prodotti delle cellule di cancro del pancreas possano alterare il metabolismo glucidico muscolare e può indurre insulino resistenza periferica (9-11,14,15).

I terreni condizionati dalle cellule di cancro del pancreas riducono la glicolisi epatica e favoriscono la sintesi dei trigliceridi (14). Estratti tumorali pancreatici di pazienti con diabete di tipo 2 riducono la conservazione di glicogeno nel muscolo scheletrico (9), aumentando la glicogeno fosforilasi e riducendo la glicogeno sintasi sia a livello dell'mRNA che dell'attività enzimatica (15). È stato riportato che il cancro del pancreas causa un'alterata risposta delle beta cellule in seguito a stimoli fisiologici (16) e una dissociazione tra la secrezione di insulina ed amilina (12,13,17).

La rapida evoluzione della cachessia, un'altra caratteristica del cancro del pancreas si suppone possa essere causata dai prodotti delle cellule tumorali, in particolare il fattore inducente la proteolisi (PIF), che è rilasciato nel circolo sanguigno, bersagliando le cellule muscolari (18-21).

Il muscolo scheletrico, pertanto, sembra essere particolarmente coinvolto nei pazienti con cancro del pancreas, essendo il potenziale bersaglio di vari prodotti tumorali i quali possono alterare sia il metabolismo glucidico sia attivare la degradazione proteica.

Lo scopo di questo studio è stato verificare se i terreni condizionati dalle cellule di cancro del pancreas alterano il metabolismo glucidico nei mioblasti di topo e confrontare il profilo di espressione genica dei mioblasti condizionati e non condizionati mediante analisi microarray con una piattaforma di 5000 geni di muscolo scheletrico

## METODI

### Colture cellulari

Abbiamo utilizzato quattro linee cellulari di cancro del pancreas: due linee (MIA PaCa 2 e CAPAN-1) sono state ottenute dall' American Type Culture Collection (ATCC), la linea PANC-1 è stata gentilmente donata dal Prof. Aldo Scarpa, Università di Verona, e la linea BxPC3 è stata gentilmente donata dal Dr. Andrea Galli, Università di Firenze. La linea cellulare di cancro del colon HT29 è stata ottenuta dalla Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). La linea cellulare miogenica di topo C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> è stata ottenuta da lotti congelati conservati nei nostri laboratori. Le linee MIA PaCa 2, PANC-1 e BxPC3 sono stabilizzate da tumore primario di pancreas, mentre la linea CAPAN-1 proviene da una metastasi epa-

tica di cancro del pancreas. Le cellule sono state mantenute in coltura (fiasche da 75-cm<sup>2</sup>) a 37 °C in atmosfera umida con 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>. Le cellule MIA PaCa 2, BxPC3, HT29 e C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> sono state cresciute in DMEM (0.1% gentamicina e 10% FCS) (Life Technologies, Paisley, UK). La linea PANC-1 veniva cresciuta in RPMI (Life Technologies, Paisley, UK) (0.1% gentamicina e 10% FCS), mentre la linea CAPAN-1 in RPMI (0.1% gentamicina e 20% FCS). I terreni condizionati dalle cellule tumorali pancreatiche e di colon (CM) erano ottenuti nel seguente modo: 400,000 cellule venivano seminate in fiasche di 75 cm<sup>2</sup>, mantenute in coltura per 7 giorni in DMEM a bassa concentrazione di glucosio (5.5 mM) (0.1% gentamicina, e 10% FCS). I terreni venivano raccolti, centrifugati a 1100 g e conservati a 4°C per non più di 24 ore, in seguito venivano eseguiti gli esperimenti con i mioblasti.

### Campioni di tessuto tumorale

Sono stati utilizzati biopsie di tessuto neoplastico di sei pazienti (2 maschi, 4 femmine, range di età 50-75 anni) con adenocarcinoma pancreatico localmente avanzato: tre pazienti avevano diabete di tipo 2 (glucosio plasmatico a digiuno > 126 mg/dL). I campioni sono stati conservati a -80 °C per non più di due mesi. Ciascun campione è stato omogenato PBS (1:20 w/v) ed è stata misurato il contenuto proteico totale (Bradford's method, BioRad Laboratories GmbH, Munchen, Germany).

### Esperimenti con mioblasti di topo

In una piastra per coltura da 24 pozzetti sono stati seminati 60x10<sup>3</sup> mioblasti in ciascun pozzetto e mantenuti in coltura per 24 ore. Successivamente il terreno veniva rimosso, i mioblasti venivano lavati con PBS ed infine incubati con un terreno non condizionato (NCM=DMEM) (0.1% gentamicina, and 10% FCS), con il CM dalle cellule tumorali pancreatiche e di colon e in terreno NCM addizionato con gli omogenati di tessuto tumorale (TT) con una concentrazione proteica finale di 1 mg/mL. Le concentrazioni di glucosio e lattato nel NCM, nei CM e nei TT sono stati misurati e corretti prima degli esperimenti al fine di ottenere gli stessi valori di partenza. Gli esperimenti sono stati eseguiti con una concentrazione di glucosio pari a 20mM. I terreni sono stati raccolti dopo 24 e 48 ore e in alcuni esperimenti dopo 72 ore. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e in base a tutte le condizioni sopra descritte.

### Esperimenti con mioblasti di topo e U-<sup>13</sup>C-glucosio

Sono stati eseguiti tre esperimenti separati utilizzando mioblasti incubati con NCM e CM dalle linee tumorali pancreatiche usando U-<sup>13</sup>C-glucosio (Tracer Technologies INC, Sommerville, MA, USA) (2% di <sup>12</sup>C-glucosio nativo), al fine di seguire il destino metabolico del glucosio attraverso l'arricchimento di <sup>3</sup>-<sup>13</sup>C-lattato. I surnatanti sono stati raccolti dopo 24, 48 e 72 ore. I campioni sono stati immediatamente congelati e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

### Esperimenti con mioblasti di topo e terreno condizionato di CAPAN-1 frazionato

E' stata eseguita una serie di tre esperimenti separati con mioblasti incubati con NCM, con CM di CAPAN-1 e tre frazioni di quest'ultimo, ottenute dopo ultrafiltrazione con DIAFLO 10,000 PM e 30,000 PM (Amicon Millipore corporation, Bedford, MA, USA). Le frazioni ottenute erano: 1. PM inferiore a 10,000 Da, 2. PM tra 10 e 30,000 Da, 3. PM superiore a 30,000 Da.

### Analisi biochimiche

Le concentrazioni di glucosio e lattato sono state misurate entro tre ore dalla raccolta mediante metodo colorimetrico su un analizzatore automatico (Dimension RxL, Dade Behring, Milan, Italy).

La produzione di lattato, derivato dal glucosio, e l'utilizzazione del glucosio [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ -lattato da  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosio e  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosio] sono stati analizzati come derivati del N-metil-N-ter-butildimetilsilil-trifluoroacetamide (Pierce, Rockford, IL) e pentacetato (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) rispettivamente, utilizzando uno spettrometro di massa gas cromatografico (GC-MS), operando in E.I mode con Agilent 5973 Network dopo separazione in colonna capillare DB-17 (J&W, Folsom, CA, USA) (22). E' stato valutato il rapporto tra la massa del tracciatore ( $3\text{-}^{13}\text{C}$ -lattato da  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosio) e del tracciatore ( $3\text{-}^{12}\text{C}$ -lattato da  $\text{U-}^{12}\text{C}$ -glucosio naturale) nei campioni mediante misura del rapporto degli isotopi (m/z 264/261). Il rapporto tra la massa del tracciatore ( $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosio) e del tracciatore ( $\text{U-}^{12}\text{C}$ -glucosio) nei campioni è stato valutato mediante misura del rapporto degli isotopi (m/z 247/242). E' stato monitorato a 247 m/z il frammento che rappresenta le specie di glucosio marcato risultate con cinque atomi di  $^{13}\text{C}$  [ $2\text{-}3\text{-}4\text{-}5\text{-}6\text{-}^{13}\text{C}$  glucosio]. Il rapporto tra la massa del tracciatore e del tracciatore nel campione può essere valutata dalle misure dei rapporti degli isotopi come segue:

$$G = g \times G^* / 1 + G^*$$

$$\text{or } L = l \times L^* / 1 + L^*$$

$G^*$  è la concentrazione di glucosio tracciatore proveniente da sorgente esogena,  $g$  è la concentrazione di glucosio tracciatore proveniente da sorgente endogena,  $L^*$  è il lattato tracciatore dal glucosio e  $L$  è il lattato da sorgente endogena.

Sono state misurate mediante analisi HPLC le concentrazioni di tirosina nei surnatanti dei NCM e dei CM delle linee tumorali pancreatiche ottenuti dai tre esperimenti separati.

### Esperimenti con i mioblasti per analisi microarray

Sono stati seminati  $1.5 \times 10^6$  di mioblasti di topo  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  (1) in piastre petri ( $\varnothing = 10$  cm) precedentemente coattate con 1% (w/v) gelatina di tipo A (Sigma, Milano, Italy).

Sono state preparate un totale di 80 petri e i mioblasti sono stati mantenuti in coltura per 24 ore. I mioblasti da 20 petri (basale) sono stati raccolti; dalle rimanenti 60 petri sono stati rimossi i terreni, i mioblasti sono stati lavati con PBS e successivamente incubati con NCM (20 petri) e con CAPAN-1 CM (40 petri). Dopo 16 ore di incubazione, sono stati raccolti i terreni da 10 petri con NCM e da 20 petri con CAPAN-1 CM e i mioblasti sono stati raccolti. Dopo 26 ore

di incubazione, questa procedura è stata ripetuta per le restanti 30 petri. Nei surnatanti sono stati misurati il glucosio ed il lattato. Dai mioblasti è stato estratto l'RNA totale seguendo un protocollo standard con l'impiego di TRIZOL (Gibco BRL). Un'aliquota di RNA (200 ng) è stata utilizzata per la quantificazione ed il controllo di qualità, usando il kit RNA 6000 LabChip e il bioanalizzatore Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Abbiamo ottenuto una quantità media di 1  $\mu\text{g}$  of RNA totale per 105 mioblasti. 15  $\mu\text{g}$  di RNA totale sono stati retrotrascritti e marcati direttamente in presenza di dCTP modificato con Cy3 o Cy5.

### Ibridazione dei microarray

L'ibridazione di microarray è stata eseguita in una camera a doppio vetrino (HybChamber, GeneMachines, San Carlos, CA, USA), umidificata con 160  $\mu\text{L}$  di SSC 3X. Il cDNA marcato è stato risospeso in 35  $\mu\text{L}$  di tampone di ibridazione, denaturato a 95  $^{\circ}\text{C}$  per 3 minuti in un termociclatore e applicato sui vetrini microarray pre-ibridati mediante incubazione con tampone di ibridazione (Northern max, Ambion, Austin, TX, USA) per 5 minuti a 42 $^{\circ}\text{C}$ . I microarray sono stati coperti con coprivetrini da 22 x 50 mm e ibridati overnight a 42  $^{\circ}\text{C}$  mediante immersione in un bagnetto termostato ad alta precisione (W28, Grant, Cambridge, UK). Dopo ibridazione, sono stati eseguiti dei lavaggi a 42 $^{\circ}\text{C}$  mediante una serie di incubazioni in tamponi con SDS e concentrazioni a scalare di SSC. Sono stati ottenuti due replicati di ciascun esperimento utilizzando diversi vetrini nei quali l'RNA campione e l'RNA di riferimento sono stati marcati sia con Cy3 che con Cy5; i fluorofori sono stati incrociati in entrambe le combinazioni.

Sono stati utilizzati gli RNA totali marcati preparati dai mioblasti non condizionati (NCM) e condizionati con CAPAN-1 (CM), a diversi tempi di crescita (ore), in ibridazioni competitive con il seguente schema:

1. mioblasti NCM 0 ore vs. TC 16 ore;
2. mioblasti NCM 0 ore vs. TC 26 ore;
3. mioblasti NCM 16 ore vs. TC 16 ore;
4. mioblasti NCM 26 ore vs. TC 26 ore.

### Convalidazione del profilo di espressione genica relativa mediante RT-PCR

Per convalidare i risultati ottenuti dagli esperimenti di microarray abbiamo effettuato una RT-PCR quantitativa. Da ciascun campione sono stati utilizzati 2  $\mu\text{g}$  di RNA totale per eseguire tre sintesi indipendenti di cDNA in un volume finale di 20  $\mu\text{L}$ , usando come primers oligo-dT e SuperScript reverse transcriptasi (Invitrogen, San Giuliano Milanese, Italia). Mediante il software Primer 3 sono stati disegnati primers gene specifici al fine di amplificare frammenti lunghi circa 500 bp, vicini alla porzione 3'-terminale del trascritto. Il cDNA è stato amplificato in una miscela di reazione di PCR di 50  $\mu\text{L}$  per un totale di 20, 25, 30 e 35 cicli di PCR. Ciascun amplificato è stato separato mediante elettroforesi su gel di agarosio ed è stata quantificata l'intensità delle bande specifiche mediante densitometria (GelDoc 2000, BioRad Laboratories, Milano). I livelli di espressione sono stati confrontati con un controllo

interno (enoil CoA idratasi; ECHS1)(figura 1).

### Analisi statistiche

La rilevazione della fluorescenza su vetrino definita come *scanning array* è stata eseguita usando uno scanner laser doppio confocale (GSI Lumonics LITE) insieme ad un software specifico (ScanArray Microarray Analysis). Le immagini dello scanner invece sono state analizzate con un software "QuantArray Analysis Software" (GSI Lumonics, Ottawa, Canada). La normalizzazione dei livelli di espressione è stata eseguita con uno strumento d'analisi dei dati di espressione genica, il software SNOMAD, un insieme di algoritmi diretti alla normalizzazione ed alla standardizzazione dei dati DNA microarray, disponibile sul sito <http://pevsnerlab.kennedykrieger.org/snomadinput.html>. Prima di qualsiasi analisi statistica, abbiamo eseguito la normalizzazione media totale attraverso le superfici microarray e la normalizzazione media locale attraverso l'intensità del segnale. Nei singoli esperimenti, è stata calcolata la media delle misure di intensità del rapporto dei due esperimenti replica e successivamente, dopo normalizzazione, è stata calcolata la trasformazione in log<sub>2</sub> per ciascun livello di espressione. I valori di espressione dei due replicati di ciascun esperimento sono stati considerati come due valori separati e ognuno è stato poi convertito in una trasformazione logaritmica. L'analisi dei componenti principali è stata eseguita usando il software J-express, disponibile sul sito [www.molmine.com/index\\_p.html](http://www.molmine.com/index_p.html).

I risultati sono stati statisticamente analizzati mediante Analisi della Varianza (ANOVA one-way), test T di Bonferroni per dati appaiati. E' stata effettuata un' Analisi di Varianza per misure ripetute con interazioni utilizzando

modelli lineari generali. I principali effetti sono stati il tempo ed i terreni condizionati delle linee cellulari. Quando l'interazione tempo-linea cellulare era significativa ( $p < 0.05$ ), veniva eseguito il test di Bonferroni della differenza tra le medie ad un livello di probabilità di 0.05 (SPSS, version 9.0).

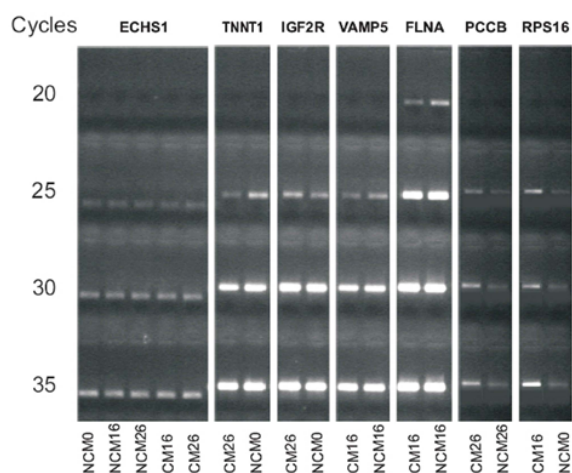
### Identificazione di geni differenzialmente espressi

Come controllo di qualità interna per l'identificazione di un livello soglia consistente sono state eseguite prove di ibridazione con lo stesso RNA marcato con Cy3 e Cy5 su un vetrino microarray. Sulla base di questi esperimenti, abbiamo adottato un livello soglia di 2.5 per la trasformazione logaritmica dei valori di intensità dei rapporti. Pertanto, abbiamo considerato come differenzialmente espressi solo quei geni i cui spot replicati risultavano nei valori di espressione inferiore a -2.5 o superiore a + 2.5, rispettivamente.

### RISULTATI

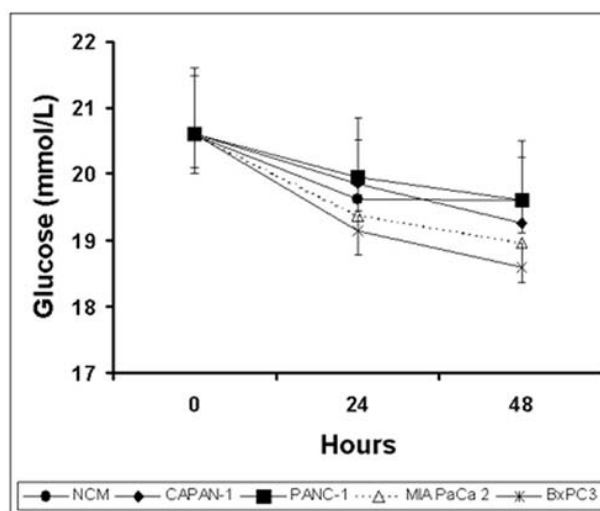
La figura 1 riporta i risultati della RT-PCR quantitativa. Elettroforesi in gel di agarosio dei geni enoil Coenzima A idratasi (ECHS1), TNNT1, recettore insulin like growth factor 2 (IGF2R), proteina di membrana associata alle vescicole 5 (VAMP5), filamina A (FLNA), propionil Coenzima A carbossilasi (PCCB), proteina ribosomiale S16 (RPS16). I campioni iniziali erano mioblasti incubati con terreno non condizionato (NCM) o terreno condizionato da CAPAN-1 (CM) per 0, 16 e 26 ore.

La figura 2 riporta le medie, deviazioni standard e analisi statistiche (test ANOVA per misure ripetute) delle



**Figura 1**

Risultati della RT-PCR quantitativa. Elettroforesi in gel di agarosio dei geni enoil Coenzima A idratasi (ECHS1), TNNT1, recettore insulin like growth factor 2 (IGF2R), proteina di membrana associata alle vescicole 5 (VAMP5), filamina A (FLNA), propionil Coenzima A carbossilasi (PCCB), proteina ribosomiale S16 (RPS16). I campioni iniziali erano mioblasti incubati con terreno non condizionato (NCM) o terreno condizionato da CAPAN-1



**Figura 2**

medie  $\pm$  deviazioni standard (barre) della concentrazioni di glucosio nei surnatanti dei mioblasti non condizionati (NCM) e condizionati dalle linee cellulari pancreatiche, ottenuti dopo 24 e 48 ore di incubazioni.

Analisi della varianza per misure ripetute:

Effetto tempo:  $p < 0.001$

Effetto linee cellulari:  $p < 0.01$

Tempo\*Linee cellulari:  $p < 0.01$ ;

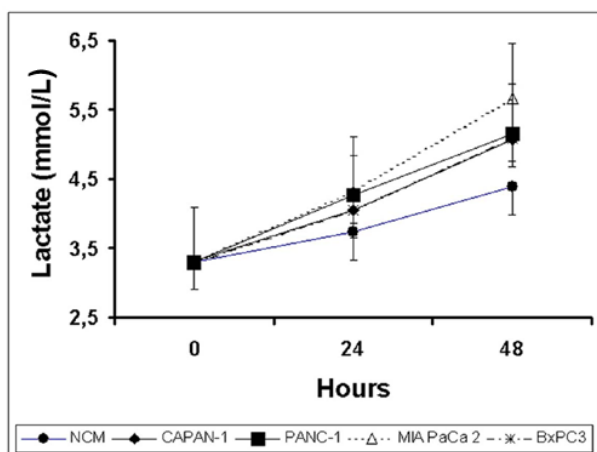
Test T di Bonferroni: =  $p < 0.05$  BxPC3 rispetto al NCM

concentrazioni di glucosio nei surnatanti dei mioblasti non condizionati e condizionati dal cancro del pancreas, ottenuti dopo 24 e 48 ore di incubazione e confrontati con i mioblasti di controllo (tempo 0). Le concentrazioni di glucosio diminuivano lievemente in tutte le condizioni sperimentali ed era statisticamente significativo nei mioblasti condizionati dalla linea BxPC3 rispetto ai mioblasti non condizionati, dopo 48 ore di incubazione.

La figura 3 riporta le medie, le deviazioni standard e le analisi statistiche (test ANOVA per misure ripetute) delle concentrazioni di lattato nei surnatanti dei mioblasti non condizionati e condizionati dal cancro del pancreas, ottenuti dopo 24 e 48 ore di incubazione rispetto ai mioblasti di controllo (tempo 0). Le concentrazioni di lattato aumentavano in entrambi i mioblasti non condizionati che condizionati ma l'aumento risultava essere più marcato nei mioblasti condizionati che quelli non condizionati, statisticamente significativo nei terreni condizionati da CAPAN-1, PANC-1 e MIA PaCa 2.

Le figure 4 e 5 riportano il pattern di  $[5-^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$  glucosio (espresso come arricchimento di 247/242 m/z) e di  $[3-^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$  lattato (espresso come arricchimento 264/261 m/z) nei surnatanti dei mioblasti non condizionati e condizionati dal cancro del pancreas. Il pattern del traser lattato nei mioblasti non condizionati e condizionati si sovrapponeva a quello del lattato totale indicando che il lattato nei mioblasti deriva dal glucosio e non da altri substrati metabolici.

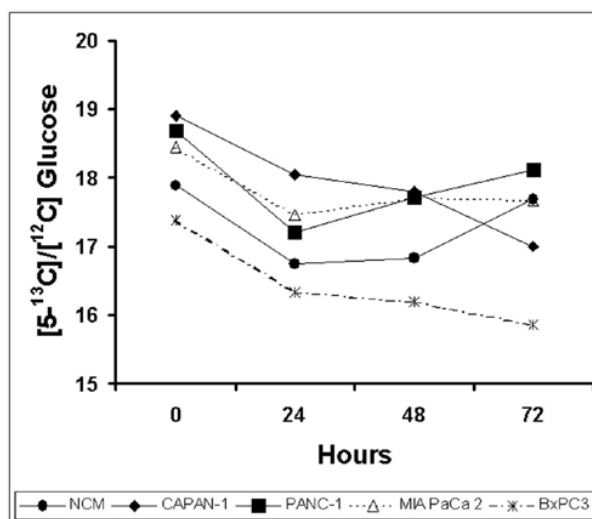
La tabella 1 riporta le concentrazioni di lattato riscontrate nei surnatanti dei mioblasti dopo incubazione con i NCM o con le frazioni del CM di CAPAN-1. Il lattato aumentava significamente nei surnatanti dei mioblasti condizionati dopo 24 ore e ancora più evidente dopo 48 ore di incubazione.



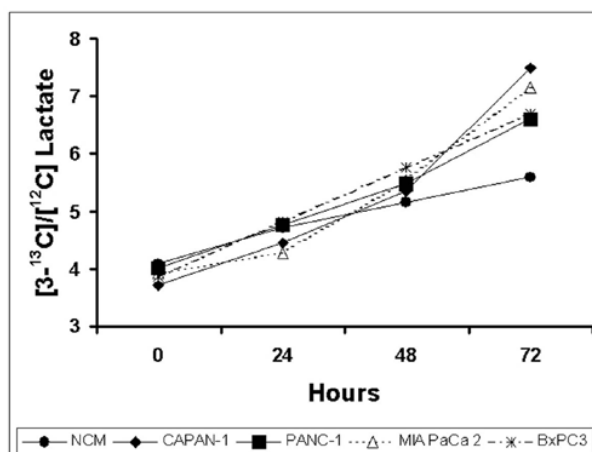
**Figura 3**  
Medie  $\pm$  deviazioni standard (barre) delle concentrazioni di lattato nei surnatanti dei mioblasti non condizionati (NCM) e condizionati dalle linee di cancro pancreatico, ottenuti dopo 24 e 48 ore di incubazione.  
Analisi della varianza per misure ripetute:  
Effetto tempo:  $p < 0.001$   
Effetto linee cellulari:  $p < 0.001$   
tempo\*linee cellulari:  $p < 0.001$ ;  
Test T di bonferroni:  $p < 0.05$  CAPAN-1 e PANC-1 rispetto a NCM;  $p < 0.001$  MIA PaCa 2 rispetto al NCM

Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti nei mioblasti incubati con le due frazioni dei CM di CAPAN-1 a basso (inferiore a 10,000 Da) e ad alto (maggiore di 30,000 Da) peso molecolare ma non con la frazione a PM intermedio tra 10,000 e 30,000 Da, sebbene la significatività statistica è stata raggiunta solo per la frazione ad alto PM.

La figura 6 riporta le medie e le deviazioni standard delle concentrazioni di glucosio e lattato nei surnatanti dei mioblasti non condizionati e condizionati dalla linea di cancro al colon HT29 dopo 24 e 48 ore di incubazione e



**Figura 4**  
Pattern del  $[5-^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$  glucosio (espresso come arricchimento 247/242 m/z) misurato da 0 a 72 ore di incubazione nei surnatanti dei mioblasti non condizionati e condizionati dalle linee cellulari di cancro del pancreas. Errori standard erano inferiori a 0.5 mmol/L



**Figura 5**  
Pattern del  $[3-^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$  lattato (espresso come arricchimento 264/261 m/z) misurato da 0 a 72 ore di incubazione nei surnatanti dei mioblasti non condizionati e condizionati dalle linee cellulari di cancro del pancreas. Errori standard erano inferiori a 0.5 mmol/L

confrontati con i mioblasti di controllo (tempo 0). Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa per entrambe le analisi (test ANOVA per misure ripetute: p:ns).

La figura 7 riporta il pattern di glucosio e lattato nei surnatanti dei mioblasti incubati con il NCM o il terreno condizionato con gli omogenati di tumore pancreatico da pazienti con diabete di tipo 2 (TT). Gli omogenati nel terreno

dei mioblasti hanno causato una diminuzione significativa dei livelli di glucosio indipendentemente dalla presenza del diabete di tipo 2; le concentrazioni di lattato aumentavano in tutti i mioblasti condizionati ma significativamente nei TT proveniente dai pazienti con diabete di tipo 2.

La figura 8 illustra il pattern delle concentrazioni di tirosina nei surnatanti dei mioblasti non condizionati e

**Tabella 1**

Medie deviazioni standard (SD) e analisi statistiche (Analisi della varianza per misure ripetute) delle concentrazioni di lattato nei mioblasti incubati con i terreni non condizionati (NCM) e condizionati da CAPAN-1 o le frazioni (CM). Sono stati eseguiti 8 replicati per ciascuna condizione.

Analisi della varianza per misure ripetute:

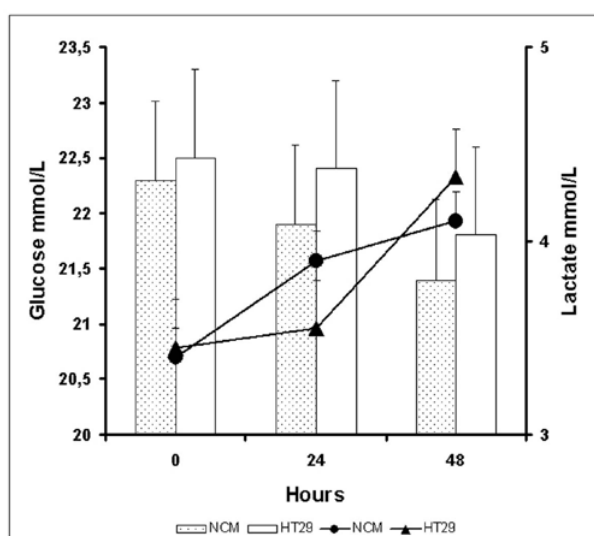
Effetto tempo:  $p < 0.001$

Effetto linee cellulari:  $p < 0.05$

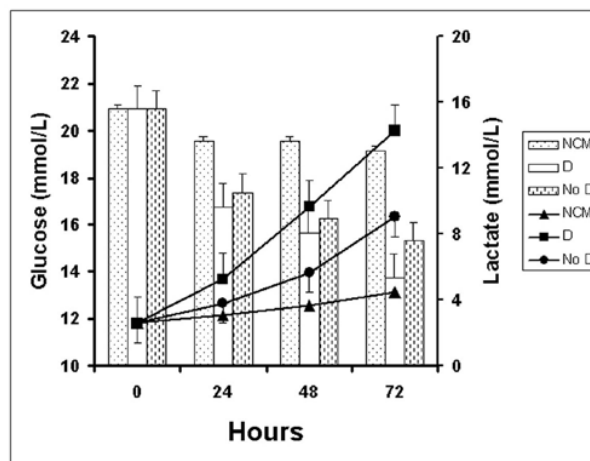
Tempo\*linee cellulari:  $p < 0.05$ ;

Test T di Bonferroni: = \*  $p < 0.05$  rispetto a NCM

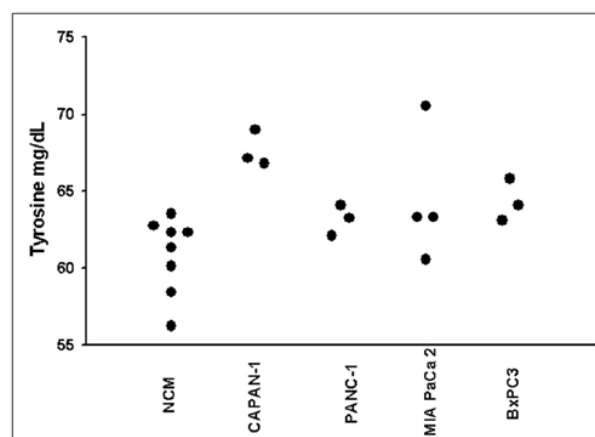
	LATTATO mmol/L						
	Basale	24 ore	48 ore	Media	SD	Media	SD
NCM	3,37 ± 0,2	3,56 ± 0,33	4,30 ± 0,52				
CAPAN-1C(*)	3,20 ± 0,05	3,90 ± 0,12	4,96 ± 0,35				
CAPAN-1 CM >30,000 Da (*)	3,30 ± 0,09	4,01 ± 0,09	4,91 ± 0,27				
CAPAN-1 CM 10-30,000 Da	3,33 ± 0,16	3,78 ± 0,25	4,41 ± 0,62				
CAPAN-1 CM <10,000 Da	3,33 ± 0,19	3,48 ± 0,24	4,74 ± 0,63				



**Figure 6**  
Pattern di glucosio (istogramma) e lattato (linee) riscontrato nei surnatanti dei mioblasti dopo incubazione con il terreno non condizionato (NCM) o il terreno condizionato dalla linea di cancro del colon HT29. Le barre rappresentano le deviazioni standard.



**Figure 7**  
Pattern di glucosio (istogramma) e lattato (linee) riscontrate nei surnatanti dei mioblasti dopo incubazione con il terreno non condizionato (NCM) o con gli omogenati dei tumori di pancreas dai pazienti con (D) o senza (No D) diabete di tipo 2. Le barre rappresentano le deviazioni standard.  
Analisi della varianza per misure ripetute:  
Effetto tempo:  $p < 0.01$  per glucosio e  $p < 0.001$  per lattato  
Effetto diabete:  $p < 0.05$  per glucosio e  $p < 0.001$  per lattato  
tempo\*diabete:  $p < 0.01$  per glucosio e  $p < 0.001$  per lattato;  
Test T di Bonferroni: =  $p < 0.05$  D e D rispetto al NCM per glucosio;  $p < 0.05$  D rispetto al NCM per lattato



**Figure 8**  
Livelli di tirosina misurata nei surnatanti dei mioblasti dopo 48 ore di incubazione con il terreno non condizionato (NCM) o i terreni condizionati dalle linee cellulari di cancro del pancreas. ANOVA ad una via:  $F=4.23$ ,  $p < 0.05$ ; test T di Bonferroni per dati appaiati:  $p < 0.05$  CAPAN-1 vs NCM.

condizionati dalle linee cellulari di cancro del pancreas dopo 48 ore di incubazione. Non è stata riportata alcuna differenza significativa nei livelli di tirosina al tempo 0 (test ANOVA ad una via:  $F=0.38$ ,  $p:ns$ ) o dopo 24 ore di incubazione ( $F=1.09$ ,  $p:ns$ ) (dati non riportati).

Per convalidare la nostra piattaforma di array 3'-cDNA, abbiamo eseguito una RT-PCR quantitativa per quantificare il livello di espressione di alcuni trascritti muscolari. A questo scopo, abbiamo selezionato un set di sei geni, quattro dei quali erano sottoespressi (TNNT1, IGF2R, VAMP5, FLNA) mentre due erano sovraespressi (PCCB and RPS16) nei mioblasti condizionati da CAPAN-1 confrontati con quelli non condizionati. Come controllo interno è stato utilizzato il gene *housekeeping* ECHS1. Abbiamo riscontrato una correlazione tra i risultati dell'analisi array e l'RT-PCR (Fig.9).

I livelli di espressione di diversi enzimi coinvolti nella glicolisi non risultavano essere alterati nei mioblasti condizionati da CAPAN-1 confrontati con i mioblasti (Esochinasi 1 (HK1), Glicogeno sintasi chinasi 3 alfa (GSK3A), Glicogeno fosforilasi, Piruvato chinasi (PKM2), Enolasi 3 (ENO3), Aldolasi A (ALDOA), GAPDH, fosfofruttochinasi (PFKM), Piruvato deidrogenasi, Isocitrato deidrogenasi 2 (IDH2), Glicogenina (GYG), Isocitrato deidrogenasi 3 gamma (IDH3G), Succinil CoA sintetasi, Succinato deidrogenasi, Malato deidrogenasi 1 (MDH1), Fosfoglicerato mutasi 2).

La tabella 2 e la tabella 3 riportano rispettivamente i geni sovraespressi e sottoespressi nei mioblasti condizionati da CAPAN-1 confrontati con i mioblasti non condizionati. Sono riportati solo i geni con funzione biologica nota. I livelli di espressione a 16 e 26 ore in confronto ai mioblasti di controllo davano i seguenti risultati: 8 geni erano sovra-

espressi, 9 geni erano sottoespressi. I livelli di espressione riscontrati nei mioblasti condizionati a 16 e 26 ore rispetto ai mioblasti di controllo erano i seguenti: 14 geni erano sovraespressi e 6 geni erano sottoespressi nei mioblasti condizionati.

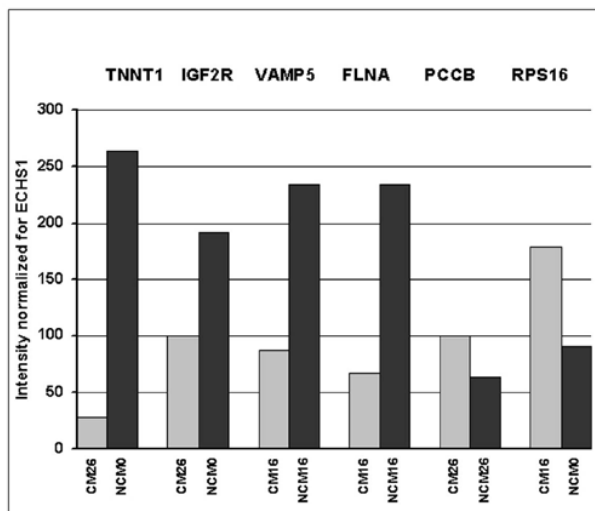
## DISCUSSIONE

È stato supposto che il muscolo scheletrico sia bersagliato da sostanze tumore derivate. Queste possono indurre intolleranza glucidica e atrofia, che è responsabile, in parte, per la marcata cachessia e diabete frequentemente riscontrate nei pazienti con cancro del pancreas (9,15,18-21). Abbiamo verificato gli effetti dei terreni condizionati dalle cellule di cancro del pancreas sul metabolismo glucidico dei mioblasti di topo e, mediante analisi microarray con una piattaforma di 5000 geni di muscolo scheletrico, sull'espressione genica.

Le concentrazioni di glucosio nei surnatanti diminuivano lievemente nei mioblasti condizionati rispetto ai non condizionati, indicando che il consumo di glucosio sia più elevato nei mioblasti condizionati che nei mioblasti non condizionati. Questa osservazione viene confermata e supportata dagli esperimenti con gli omogenati di cancro pancreatico. Come Li e Adrian (24), abbiamo osservato che i mioblasti condizionati rilasciavano nel terreno di coltura quantità più elevate di lattato rispetto ai mioblasti non condizionati. Un significativo aumento nella produzione di lattato è stato ottenuto dai mioblasti condizionati con gli omogenati di tumore dai pazienti diabetici, supportando l'ipotesi che il cancro del pancreas associato a diabete sia in grado di causare un aumento della produzione di lattato da parte dei mioblasti. Questi risultati sembrano essere peculiari al cancro del pancreas, dal momento che non è stato riscontrato alcun effetto sulla concentrazione di glucosio e lattato nei mioblasti condizionati dalla linea di cancro del colon HT29.

Per confermare che il lattato derivasse dal glucosio e non dai altri substrati metabolici (es. aminoacidi), abbiamo eseguito una serie di esperimenti con glucosio stabilmente marcato. Tutto il lattato derivava dal glucosio, indicando che nelle cellule la maggior parte del glucosio metabolizza in lattato piuttosto che essere sottoposto a fosforilazione ossidativa o essere usato per la sintesi di glicogeno. L'alterazione del metabolismo del glucosio era differente da quella che abbiamo precedentemente descritto negli epatociti condizionati, dove era stata riscontrata una riduzione della produzione di lattato (14). I prodotti tumorali potrebbero evocare differenti alterazioni metaboliche strettamente associate al pattern metabolico della cellula bersaglio (25,26)

L'effetto sui mioblasti è stato riprodotto non solo con la frazione a basso peso molecolare dei terreni condizionati dalle cellule tumorali pancreatiche (<10,000 Da) (26), ma anche con la frazione a basso peso molecolare (>30,000 Da). Possono essere proposte due ipotesi: 1. Nella frazione a basso peso molecolare può essere presente un frammento "metabolicamente attivo" di una molecola più



**Figure 9**  
Risultati RT-PCR. Come controllo interno è stato utilizzato il gene *housekeeping* ECHS1. Geni sottoespressi CM da esperimenti di microarray: TNNT1, IGF2R, VAMP 5, FLNA. Geni sovraespressi CM da esperimenti di microarray: PCCB, RPS16

grande; 2. possono cooperare due differenti molecole nel modificare il metabolismo glucidico nei mioblasti.

Per selezionare quali geni muscolari siano alterati nei mioblasti condizionati, abbiamo eseguito un esperimento di microarray con una piattaforma di 5000 geni di muscolo scheletrico, il quale è stato convalidato mediante RT-PCR quantitativa. Sulla base della nostra ipotesi che la glicolisi non sia danneggiata nei mioblasti condizionati, i livelli di espressione di molti geni coinvolti in questa via metabolica non variavano. D'altra parte, abbiamo riscontrato un diverso numero di geni sovraespressi e sottoespressi nei mioblasti condizionati rispetto ai non condizionati (Tabelle 2 e 3). Alcuni di questi geni sono potenzialmente coinvolti nel metabolismo glucidico: i geni propionil Coenzima A carbossilasi e isocitrato deidrogenasi 3 beta (IDH3B), che codificano enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici erano sovraespressi; IGF1R e VAMP5 erano sottoespressi. Pro-

pionil Coenzima A deriva dall'ossidazione di alcuni aminoacidi (metionina, isoleucina e valina) e dagli acidi grassi a numero di carboni dispari (27) ed è convertito in Succinil Coenzima A dalla propionil Coenzima A carbossilasi. IDH3B catalizza la decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato a succinil Coenzima A, attraverso l'intermedio alfa-chetoglutarato. Ipotizziamo che il ciclo degli acidi tricarbossilici mitocondriale possa essere accelerato indipendentemente dalla glicolisi e la produzione di succinil Coenzima A aumenta nei mioblasti condizionati rispetto ai mioblasti non condizionati. Un'accelerazione di questo ciclo è associata ad una ridotta sintesi di glicogeno muscolare (28), un evento già descritto nei pazienti diabetici con cancro del pancreas (9,15) e potrebbe causare un accumulo di ATP e NADH, noti inibitori della piruvato deidrogenasi (27). Questo evento potrebbe spiegare l'accumulo di lattato osservato nei nostri esperimenti.

#### Tabella 2

Geni sovraespressi con funzione biologica nota nei mioblasti condizionati da CAPAN-1, confrontati con i mioblasti non condizionati. La tabella riporta i trascritti risultati essere sovraregolati nei mioblasti dopo 16 e 26 ore di incubazione con il terreno condizionato da CAPAN-1 confrontati ai mioblasti incubati con il terreno di controllo (NCM).

	archivio ID di cDNA di muscolo	Nome del Gene	Funzione Biologica	Rapporto di Expression
Geni sovraespressi dopo 16 ore rispetto a TNC al tempo 0	2-001A01	Proteina Ribosomiale S16 (RPS16)	Biosintesi proteica	3,72
	2-007E12	Fibrillarina (FBL)	Processamento rRNA	2,69
	2-009C09	APOBEC2	Processamento rRNA	2,50
	2-026B06	BCL-2 associated athanogene	Anti-apoptosi, recettore di superficie associato alla trasduzione del segnale	2,57
	2-031A06	Coattivatore Trascrizionale (ALY)	Assemblaggio complesso proteico	2,42
	2-039D12	Perossisome recettore 1 (PXR1)	Protein-peroxisome targeting	2,41
Geni sovraespressi dopo 26 ore rispetto a TNC al tempo 0	2-009A02	PAFAH1B1	Neurogenesi, motilità cellulare, metabolismo dei lipidi, trasduzione del segnale	3,34
	BL-001H08	Catepsina G (CTSG)	Risposta ologica, proteolisi	5,46
Geni sovraespressi dopo 16 ore rispetto al TNC dopo 16 ore	2-001A07	Globina alfa unoA (HBA1)	Trasporto ossigeno	2,48
	2-005G10	Isocitrato deidrogenasi 3 beta (IDH3B)	Metabolismo Isocitrato, metabolismo dei carboidrati	2,95
	2-015D05	Proteina ribosomiale L22 (RPL22)	Biosintesi proteica	3,06
	2-022G02	ARP1 actin-related protein 1 homolog A (ACTR1A)	Trasporto vescicole	2,55
	2-034C09	U4/U6-associated RNA splicing factor (HPRP3P)	Splicing mRNA, processamento mRNA	3,04
	BL-009A02	Torsina A (DYT1)	Protein folding, heat shock response	2,95
	BL-010F10	NFKB2	Oncogenesi	3,37
Geni sovraespressi dopo 26 ore rispetto al TNC dopo 26 ore	2-010C12	S100 Calcium-binding protein A6 (S100A6)	Ciclo cellulare, segnale cellula-cellula	2,50
	2-018A07	ATP Sintasi (ATP5B)	Via Energetica	2,47
	2-018C04	Bridging-integrator protein-1 isoforma BIN1+12A (BIN1)	Controllo ciclo cellulare, proliferazione cellulare, trasporto vescicolare non selettivo	3,47
	2-018C10	Proteina ribosomiale S3A (RPS3A)	biosintesi proteine	2,63
	2-021E09	Proteina ribosomiale S21 (RPS21)	Biosintesi proteine	3,42
	2-028D10	Propionyl Coenzima A carbossilasi	Catabolismo acidi grassi	2,61
	BL-033G08	MEM-102 glicoproteina	difesa	3,71

La funzione biologica degli altri geni alterati non era direttamente o indirettamente correlata con la produzione di lattato, sebbene alcuni di loro potrebbero concernere con la secrezione di insulina ed il trasporto di glucosio. In

questo contesto è di particolare interesse la sottoespressione di IGF1IR e VAMP5 nei mioblasti condizionati, dal momento che IGF1IR lega IGF1 e con meno affinità insulina e IGF1 (29). Gli effetti della sottoespressione di IGF1IR

### Tabella 3

geni sottoespressi con funzione biologica nota nei mioblasti condizionati da CAPAN-1 confrontati con i mioblasti non condizionati. La tabella riporta i trascritti risultati essere sottoregolati nei mioblasti dopo 165 o 26 ore di incubazione con il terreno condizionato CAPAN-1 in confronto ai mioblasti incubati con il terreno di controllo (NCM)

	Archivi ID di cDNA di muscolo	Nome del gene	Funzione biologica	Rapporto di espressione
Geni sottoespressi dopo 16 e 26 ore rispetto al TNC al tempo 0	2-001H02	Proteina ribosomiale S12 (RPS12)	Biosintesi delle proteine	-2,96 / -3,93
Geni sottoespressi dopo 16 ore rispetto al TNC al tempo 0	2-028H06	Actina alfa	Controllo della contrazione muscolare e del cuore	-2,75
	2-029C09	Sorcina (SR1)	Controllo dello sviluppo muscolare e del cuore, trasporto di piccole molecole, conservazione ferro intracellulare, regolazione dell'azione proteica, regolazione contrazione muscolo striato	-2,67
Geni sottoespressi dopo 26 ore rispetto al TNC al tempo 0	2-002H11	Timosin beta 10 (TMSB10)	Sviluppo spermatidi	-2,88
	2-023F10	Troponina T1	Regolazione contrazione muscolo	-4,33
	2-027F02	IGF2R	Trasduzione segnale, endocitosi mediata dal recettore	-5,44
	2-029D01	Proteina ribosomiale L14 (RPL14)	Biosintesi proteine	-2,56
	BL-010C12	PET112L	Biosintesi proteine	-2,73
	BL-010F12	Proteina ribosomiale L8 (RPL8)	Biosintesi proteine	-3,18
Geni sottoespressi dopo 16 ore rispetto al TNC dopo 16 ore	2-010G10	VAMP5	Sviluppo muscolo, trasporto non selettivo vescicole	-2,53
	2-017G02	Lipoproteina a bassa densità associata alla proteina 1 (LRP1)	Patogenesi, metabolismo lipidico, proliferazione cellulare	-2,67
	2-018F04	Fattore 1 associato alla differenziazione endoteliale (EDF1)	Processi di sviluppo, crescita e mantenimento cellulare	-2,85
	2-036G04	Filamina A, alfa (actin binding protein 280)(FLNA)	Neurogenesi, motilità cellulare, controllo della dimensione e forma cellula, riorganizzazione dell'actina del citoscheletro, recettore di superficie associato alla trasduzione del segnale	-3,26
Geni sottoespressi dopo 26 ore rispetto al TNC dopo 26 ore	2-005F09	NADUFS2	Complex I (NADH to ubiquinone)	-2,66
	BL-003C11	Dual specificity fosfatasi 1 (DUSP1)	Risposta stress ossidativo	-4,01

nel tessuto muscolare non sono ancora noti; è stato riportato che il glucosio aumenta IGF1R sulla superficie cellulare e che promuove l'esocitosi di insulina nelle cellule secernenti insulina (30,31). Le alterazioni geniche che abbiamo osservato possono ricorrere anche in altre cellule bersaglio come nelle cellule secernenti insulina dove un IGF1R diminuito potrebbe ridurre la secrezione di insulina, già constatato nei pazienti con cancro del pancreas (16). VAMP-5, che appartiene alla famiglia delle proteine SNARE, potrebbe facilitare la traslocazione di GLUT4 dal pool intracellulare alla membrana plasmatica (32). In questo contesto, una sottoespressione di VAMP-5 potrebbe determinare una ridotta espressione membranale di GLUT4, seguita da un ridotto trasporto di glucosio.

La sovraespressione osservata di alcuni geni coinvolti nella trasduzione del segnale intracellulare, come PAF1B1 e BCL-2, modificando l'espressione di diverse proteine ribosomiali, può portare ad un'alterazione nella biosintesi proteica (33-36). Infine, poichè abbiamo osservato una sovraespressione nelle serin proteasi, catepsina G, coinvolta nella degradazione del tessuto connettivo e attivazione delle caspasi (37), abbiamo controllato il catabolismo proteico misurando la concentrazione di tirosina nei surnatanti, dal momento che la tirosina rapidamente equilibra tra il pool intracellulare e il terreno e non è sintetizzata né degradata (38). Nei nostri modelli sperimentali, la tirosina aumentava nei mioblasti condizionati, indicando che la proteolisi supera la sintesi proteica e questo potrebbe portare ad atrofia muscolare. La sottoespressione di actina alfa, troponina T e filamina A possono contribuire nel determinare questa atrofia (39-40).

In conclusione, I nostri risultati dimostrano che i terreni condizionati dalle linee cellulari di cancro del pancreas aumentano la produzione di lattato e inducono la proteolisi, alterando i livelli di espressione di un considerevole numero di geni, non solo quelli coinvolti nella biosintesi e degradazione delle proteine e metabolismo glucidico, ma anche quelli coinvolti nel ciclo degli acidi tricarbossilici e nel traffico vescicolare

## BIBLIOGRAFIA

- Fogar P, Pasquali C, Basso D, Sperti C, Panozzo MP, Tessari G, D'Angeli F, Del Favero G, Plebani M. Diabetes mellitus in pancreatic cancer follow-up. *Anticancer Res* 1994;14:2827-2830.
- Czyzyk A, Szczepanik Z. Diabetes mellitus and cancer. *Eur J Int Med* 2000;11:245-252.
- Gullo L, Tomassetti P, Migliori M, Casadei R, Marrano D. Do early symptoms of pancreatic cancer exist that can allow an earlier diagnosis? *Pancreas* 2001;22:210-213.
- Silverman DT, Schiffman M, Everhart J, Goldstein A, Lillemoe KD, Swanson GM, Schwartz AG, Brown LM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Pottern LM, Hoover RN, Fraumeni Jr JF. Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1999;80:1830-1837.
- Silverman DT. Risk factors for pancreatic cancer: a case control study based on direct interviews. *Terat Carcinogen Mutagen* 2001;21:7-25.
- Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y, Kurosawa M, Ohno Y. Risk of pancreatic cancer in relation to alcohol drinking, coffee consumption and medical history: findings from the Japan collaborative cohort study for evaluation of cancer risk. *Int J Cancer* 2002;99:742-746.
- Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM, and the Italian Pancreatic Cancer Study Group. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1994;331:81-84.
- La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, D'Avanzo B, Boyle P. A case-control study of diabetes mellitus and cancer risk. *Br J Cancer* 1994;70:950-953.
- Permert J, Adrian TE, Jacobsson P, Jorfelt L, Fruin B, Larsson J. Is profound peripheral insulin resistance in patients with pancreatic cancer caused by a tumor-associated factor? *Am J Surg* 1993;165:61-67.
- Basso D, Brigato L, Veronesi A, Panozzo MP, Amadori A, Plebani M. The pancreatic cancer cell line MIA PaCa 2 produces one or more factors able to induce hyperglycemia in SCID mice. *Anticancer Res* 1995;15:2585-2588.
- Basso D, Valerio A, Brigato L, Panozzo MP, Miola M, Lucca T, Ujka F, Zaninotto M, Avogaro A, Plebani M. An unidentified pancreatic cancer cell product alters some intracellular pathways of glucose metabolism in isolated rat hepatocytes. *Pancreas* 1997;15:132-138.
- Wang F, Larsson J, Abdiu A, Gasslander T, Westermark P, Adrian TE, Permert J. Dissociated secretion of islet amyloid polypeptide and insulin in serum-free culture media conditioned by human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Int J Pancreatol* 1997;21:157-164.
- Ding X, Flatt PR, Permert J, Adrian TE. Pancreatic cancer cells selectively stimulate islet b cells to secrete amylin. *Gastroenterology* 1998;114:130-138.
- Valerio A, Basso D, Brigato L, Ceolotto G, Baldo G, Tiengo A, Plebani M. Glucose metabolic alterations in isolated and perfused rat hepatocytes induced by pancreatic cancer conditioned medium: a low molecular weight factor possibly involved. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:622-628.
- Liu J, Knezetic JA, Strömmer L, Permert J, Larsson J, Adrian TE. The intracellular mechanism of insulin resistance in pancreatic cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1232-1238.
- Basso D, Plebani M, Fogar P, Del Favero G, Briani G, Meggiato T, Panozzo MP, Ferrara C, D'Angeli F, Burlina A.  $\beta$ -cell function in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 1994;9:332-335.
- Mäkimattila S, Hietaniemi K, Kiviluoto T, Timonen T, Yki-Järvinen H. In vivo glucose-stimulated amylin secretion is increased in nondiabetic patients with pancreatic cancer. *Metabolism* 2001;50:1036-1042.
- Todorov P, Cariuk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature* 1996;379:739-742.
- Wigmore SJ, Todorov PT, Barber MD, Ross JA, Tisdale MJ, Fearon KCH. Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. *Br J Surg* 2000;87:53-58.
- Brown DR, Berkowitz DE, Breslow MJ. Weight loss is not associated with hyperleptinemia in humans with pancreatic cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:162-166.
- Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2002;2:862-871.
- Avogaro A, Toffolo G, Valerio A, Cobelli C. Epinephrine exerts opposite effects on peripheral glucose disposal and glucose-stimulated insulin secretion. A stable label intravenous glucose tolerance test minimal model study. *Diabetes* 1996;45:998-1007.
- Campanaro S, Romualdi C, Fanin M, Celegato B, Pacchioni

- B, Trevisan S, Laveder P, De Pittà C, Pegoraro E, Hayashi YK, Valle G, Angelici C, Lanfranchi G. Gene expression profiling in dysferlinopathies using a dedicated muscle microarray. *Hum Mol Gen* 2002;11:3283-3298.
24. Li J, Adrian TE. A factor from pancreatic and colonic cancer cells stimulates glucose uptake and lactate production in myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:626-633.
  25. Valerio A, Basso D, Mazza S, Baldo G, Tiengo A, Pedrazzoli S, Seraglia R, Plebani M. Serum protein profiles of patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis: searching for a diagnostic protein pattern. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001;15:2420-2425.
  26. Basso D, Valerio A, Seraglia R, Mazza S, Piva MG, Greco E, Fogar P, Gallo N, Pedrazzoli S, Tiengo A, Plebani M. Putative pancreatic cancer-associated diabetogenic factor: 2030 MW peptide. *Pancreas* 2002;24:8-14.
  27. Stryer L. *Biochemistry*, 3rd Ed. New York: W.H. Freeman & Company, 1988.
  28. Dictor N, Madar Z, Tirosh O.  $\alpha$ -lipoic acid inhibits glycogen synthesis in rat soleus muscle via its oxidative activity and the uncoupling of mitochondria. *J Nutr* 2002;132: 3001-3006.
  29. Fürstenberger G, Senn H-J. Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:298-302.
  30. hang Q, Berggren P-O, Tally M. Glucose increases both the plasma membrane number and phosphorylation of insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptors. *J Biol Chem* 1997;272:23703-23706.
  31. Zhang Q, Tally M, Larsson O, Kennedy RT, Huang L, Hall K, Berggren P-O. Insulin-like growth factor II signaling through the insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor promotes exocytosis in insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6232-6237.
  32. Kido Y, Nakae J, Accili D. The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:972-979.
  33. Arai H, Koizumi H, Aoki J, Inoue K. Platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). *J Biochem* 2002;131:635-640.
  34. Jansen B, Zangemeister-Wittke U. Antisense therapy for cancer - the time of truth. *Lancet Oncol* 2002;3:672-683.
  35. Ban N, Nissen P, Hansen J, Capel M, Moore PB, Steitz TA. Placement of protein and RNA structures into a 5 A-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* 1999;400:841-847.
  36. Kumar KU, Srivastava SP, Kaufman RJ. Double stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18. *Mol Cell Biol* 1999;19:1116-1125.
  37. Bird PI. Regulation of pro-apoptotic leucocyte granule serine proteinases by intracellular serpins. *Immun Cell Biol* 1999;77:47-57.
  38. Todorov PT, Deacon M, Tisdale MJ. Structural analysis of a tumor-produced sulphated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation. *J Biol Chem* 1997;272:12279-12288.
  39. Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 2000;80:1215-1265.
  40. Maki M, Kitaura Y, Satoh H, Ohkouchi S, Shibata H. Structures, functions and molecular evolution of the penta EF hand  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins. *Biochem Biophys Acta* 2002;1600:51-60.