

Abstract

Serum biomarker profile is a reliable and effective tool for diagnosis of several metabolic disorders, such as diabetes or cardiovascular diseases. Serum composition is affected by endogenous metabolism and nutritional intake as well. Indeed, dietary style, particularly quality and quantity of nutritional intake, can highly influence disease risk and progression while some nutrients act as bioactive compounds and modify pathogenetic mechanisms. In this regard, current literature indicates a major role of specific nutrient molecules from diet affecting specific metabolic pathways.

The aim of our project is to identify metabolic pathways regulated by nutrients, allowing to identify possible therapeutics targets in pathological states. We questioned whether human serum samples differentially selected for fatty acid profile and cholesterol levels could regulate gene expression using an *in vitro* model (hepatoma cell line, HepG2). These parameters were chosen as likely affected by dietary intake. Identifying hypercholesterolemic vs normocholesterolemic serum groups, we treated cells with individual sera from each group and we used DNA microarrays to measure transcript levels. Considering the most regulated genes and their involvement in metabolic pathways, we selected and validated, by Real Time-PCR, HMGCS2, GSTA1, ADH1, ELOVL2, UGT2A3, LEAP2, MTTP as up-regulated genes and ApoM, GDF15, Cyr61 as down-regulated genes. In order to correlate observed modulations to specific serum components, we analyzed the effect of polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), arachidonic acid (AA), and of saturated fatty acid stearic acid (SA), since polyunsaturated fatty acids are present in higher concentration in serum samples from hypercholesterolemic subjects. These nutrient molecules are important components of serum lipid profile, associated with dietary behavior and incidence of dyslipidemic diseases. Our results show significant regulations of HMGCS2 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymeA synthase 2), GSTA1 (glutathione S-transferase alpha 1), LEAP2 (liver expressed antimicrobial peptide 2), ApoM (apolipoprotein M) after DHA, EPA and AA treatment while SA did not affect these genes. Moreover 22(R)-hydroxycholesterol, a cholesterol metabolite, did not show any effect.

Subsequently, we focused our attention on the study of HMGCS2 regulation mechanisms, observing that both mRNA and protein levels are significantly increased after PUFA treatments, and that this up-regulations are contrasted by PPAR α antagonist treatments. We also evaluated other possible nutrients that can act on HMGCS2: glucose and fructose. Our results showed that glucose and fructose treatments induce significant up-regulations of HMGCS2 mRNA and protein levels, while PPAR α antagonist coadministration contrasts these effects. Therefore, we showed that PUFA, glucose and fructose effects on HMGCS2 expression may be a consequence of their interaction with PPAR α . On this basis, we considered the possible involvement of FoxO1 transcription factor in these regulations. We observed that PPAR α agonist and FoxO1 inhibitor coadministration effects on HMGCS2 are opposite. Then, our results showed that FoxO1 could intervene in PPAR α -mediated regulation mechanisms.

Data indicate that expression levels of the selected mRNAs, primarily of HMGCS2, could represent a reference of nutritional intake, PUFAs effects and dyslipidemic diseases pathogenesis.

Preliminary results obtained *in vivo* showed that the hepatic expression of HMGCS2 is affected by quality of fats intake, supporting the idea that their saturation may affect the regulation of this enzyme.

Sommario

Il profilo sierico, con particolare riferimento ai livelli di biomarkers, rappresenta uno strumento efficace ed affidabile per la diagnosi di malattie metaboliche, come il diabete o le malattie cardiovascolari. La composizione del siero è influenzata sia dal metabolismo endogeno che dall'apporto nutrizionale. In effetti, lo stile alimentare, con particolare riferimento alla qualità e alla quantità dell'apporto nutrizionale, può fortemente influenzare il rischio e la progressione di malattia, poiché alcuni nutrienti agiscono come composti bioattivi. A questo proposito, la letteratura attuale indica un importante ruolo di specifiche molecole nutrizionali provenienti dalla dieta che interessano specifiche vie metaboliche.

L'obiettivo del nostro progetto è quello di individuare pathways metabolici regolati da nutrienti, con lo scopo di identificare possibili target terapeutici in stati patologici. La prima ipotesi che abbiamo testato riguarda la possibilità di campioni di siero umano, selezionati per livelli di colesterolo e profilo in acidi grassi, di regolare l'espressione genica utilizzando un modello *in vitro* (cellule di epatoma umano, HepG2). Questi parametri sono stati scelti come probabilmente influenzati dall'apporto nutrizionale. Abbiamo classificato i sieri in due gruppi, ipercolesterolemico e normocolesterolemico, trattato le cellule con i sieri individuali di ciascun gruppo e misurato i livelli di trascrizione mediante tecnica di DNA microarray. Considerando i geni più regolati e il loro coinvolgimento nelle vie metaboliche, abbiamo selezionato e validato, mediante Real Time-PCR, HMGCS2, GSTA1, ADH1, ELOVL2, UGT2A3, LEAP2, MTTP come geni up-regolati e APOM, GDF15, Cyr61 come geni down-regolati. Per correlare le modulazioni osservate a specifici componenti del siero, abbiamo analizzato l'effetto degli acidi grassi polinsaturi, acido docosaesaenoico (DHA), acido eicosapentaenoico (EPA), acido arachidonico (AA), e dell'acido grasso saturo, acido stearico (SA), poiché gli acidi grassi polinsaturi sono presenti in più alta concentrazione nei campioni di siero provenienti dai soggetti ipercolesterolemici. Queste molecole nutrienti sono componenti importanti del profilo lipidico sierico, associate al comportamento alimentare e all'incidenza di malattie dislipidemiche. I nostri risultati mostrano regolazioni significative di HMGCS2 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymeA synthase 2), GSTA1 (glutathione S-transferase alpha 1), LEAP2 (liver expressed antimicrobial peptide 2), ApoM (apolipoprotein M) dopo trattamento con DHA, EPA e AA, mentre SA non ha influenzato questi geni. Inoltre, il 22(R)-idrossicolesterolo, un metabolita del colesterolo, non ha mostrato alcun effetto.

In seguito, abbiamo concentrato la nostra attenzione sullo studio dei meccanismi di regolazione di HMGCS2, osservando che i livelli di espressione sia dell'mRNA che della proteina sono significativamente aumentati dopo i trattamenti con i PUFA, e che questa up-regolazione è contrastata dal trattamento con l'antagonista di PPAR α . Abbiamo valutato anche il possibile coinvolgimento di altre due sostanze nutrienti nella regolazione di HMGCS2: glucosio e fruttosio. I nostri risultati hanno mostrato che il trattamento con i due monosaccaridi induce significative up-regolazioni dei livelli di espressione sia dell'mRNA che della proteina di HMGCS2; mentre, la concomitante somministrazione dell'antagonista di PPAR α contrasta questi effetti. Pertanto, abbiamo dimostrato che gli effetti di PUFA, glucosio e fruttosio sull'espressione di HMGCS2 possono essere una conseguenza della loro interazione con PPAR α . Su questa base, abbiamo considerato il possibile coinvolgimento del fattore di trascrizione FoxO1 in queste regolazioni. Abbiamo osservato che gli effetti della cosomministrazione dell'agonista di PPAR α e dell'inibitore FoxO1 sui livelli di espressione di HMGCS2 sono opposti. Inoltre, i nostri risultati hanno dimostrato che FoxO1 potrebbe intervenire nei meccanismi di regolazione PPAR α -mediati.

I dati indicano che i livelli di espressione delle specie di mRNA selezionate, con particolare riferimento a HMGCS2, potrebbero rappresentare un punto di riferimento nella relazione tra apporto nutrizionale, effetti dei PUFA e patogenesi di malattie dislipidemiche.

Risultati preliminari ottenuti in vivo hanno mostrato che l'espressione di HMGCS2, a livello epatico, varia in ratti alimentati con diete che differiscono qualitativamente nella quota lipidica, a sostegno dell'idea che gli acidi grassi sono nutrienti che possono influire sulla regolazione di questo fattore, e che l'alimentazione può influenzare la relativa via metabolica.