



Unione Europea



La tua
Campania
cresce in
Europa



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in Biologia dei Sistemi
Ciclo XIII — Anno di discussione 2015

Coordinatore: Chiar.mo Prof. *Antonietta Leone*

***Studio dell'espressione di geni coinvolti
in pathways metabolici regolati da
nutrienti***

settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/10

Dottorando

Dott. Maria Caterina De Rosa

Tutore

Chiar.mo Prof. Mario Felice Tecce

Alla mia famiglia

Abstract

Abstract.....1

Sommario

Sommario2

Capitolo I. Introduzione

1.1 Introduzione4

Capitolo II. Gli acidi grassi

2.1 Struttura degli acidi grassi 6
 2.2 Nomenclatura degli acidi grassi..... 8
 2.3 Acidi grassi saturi: risorse alimentari e funzioni biologiche..... 10
 2.4 Acidi grassi monoinsaturi in configurazione *cis*: risorse alimentari e funzioni biologiche..... 11
 2.5 Acidi grassi monoinsaturi in configurazione *trans*: risorse alimentari e funzioni biologiche..... 12
 2.6 Acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6: sintesi endogena 12
 2.7 Acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6: risorse alimentari 14
 2.8 Acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6: effetti biologici..... 15
 2.8.1 Substrato del metabolismo energetico 15
 2.8.2 Ruolo strutturale 15
 2.8.3 Attività funzionale..... 16
 2.9 Acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6: regolazione dell'espressione genica 17

Capitolo III. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2

3.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthases 19
 3.2 Chetogenesi..... 21
 3.3 Recettori nucleari..... 24
 3.3.1 PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor): sensore degli acidi grassi 25
 3.3.1.1 Isoforma PPAR α 27
 3.4 Isoforma 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2..... 27
 3.4.1 Aspetti molecolari dell'enzima 27
 3.4.2 Fibroblast Growth Factor 21 28
 3.5 Fattori in grado di regolare l'espressione di HMGCS2 29
 3.5.1 Nutrienti 29
 3.5.2 Sostanze endogene 29
 3.6 Ruolo di HMGCS2 nella genesi e nello sviluppo di patologie..... 30

Capitolo IV. Obiettivi del progetto

Obiettivi del progetto..... 32

Capitolo V. Risultati e discussione

5.1 Identificazione di geni differenzialmente espressi in cellule HepG2 trattate con differenti sieri umani..... 33
 5.2 Quantificazione degli mRNA differenzialmente espressi mediante Real Time-PCR..... 34
 5.3 Valutazione degli effetti degli acidi grassi e del 22(R)-idrossicolesterolo sulla espressione genica..... 35
 5.4 Ruolo di PPAR α nella regolazione di HMGCS2 e coinvolgimento di FoxO1 37
 5.4.1 Effetto dell' antagonista di PPAR α (GW6471) e dell'agonista di PPAR α (WY14643) sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2 37
 5.4.2 Effetto dell'inibitore di FoxO1 (AS1842856) sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2..... 37
 5.4.3 Effetto della cosomministrazione dell'agonista di PPAR α (WY14643) e dell'inibitore di FoxO1 (AS1842856) sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2..... 38
 5.5 Coinvolgimento di PPAR α nell'up-regolazione di HMGCS2 indotta dai PUFA ... 39
 5.5.1 Effetto degli acidi grassi sui livelli di espressione della proteina 39
 5.5.2 Effetto della cosomministrazione di PUFA e dell'agonista di PPAR α sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2..... 40
 5.6 Effetto della cosomministrazione di monosaccaridi e dell'agonista di PPAR α sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2..... 41
 5.6 Effetto di differenti varietà di olio di oliva sui livelli di espressione epatica di HMGCS2 in ratti alimentati con diete a diversa composizione lipidica..... 41

Capitolo VI. Conclusioni

Conclusioni 43

Capitolo VII. Materiali e Metodi

7.1 Linea cellulare e mezzo di coltura 46
 7.2 Crescita della linea cellulare eucariotica..... 46
 7.3 Propagazione della linea cellulare in coltura 46
 7.4 Congelamento delle cellule..... 46
 7.5 Preparazione delle sostanze da somministrare e trattamenti..... 46
 7.6 Estrazione RNA totale 47
 7.7 Analisi microarray 47
 7.8 Retrotrascrizione..... 48
 7.9 Real Time-PCR (Polymerase Chain Reaction): analisi dei geni target..... 48
 7.10 Isolamento della frazione mitocondriale e quantizzazione delle proteine..... 49
 7.11 Western Blotting 49
 7.12 Studio *in vivo* 50
 7.12.1 Animali 50

Indice

7.12.2 Protocollo sperimentale	50
7.12.3 Estrazione dell'RNA totale da tessuto	51
7.13 Analisi statistiche	52

Bibliografia

Bibliografia.....	53
-------------------	----

SEZIONE SPECIALE

Meccanismi molecolari degli effetti mediati da Ildr2 sul metabolismo lipidico epatico – regolazione dell'attività di ACC e HMG-CoA reduttasi tramite 14-3-3	63
--	----

Ringraziamenti

Ringraziamenti

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 somministrazione 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.

1.1 Introduzione

La composizione del siero umano è il risultato di un complesso metabolismo sia di molecole endogene sia derivanti dalla dieta. Una dieta ricca di molecole bioattive, come la Dieta Mediterranea, potrebbe contribuire a modificare il profilo sierico e di conseguenza influenzare il metabolismo generale ed i meccanismi molecolari coinvolti in processi fisiologici o patologici (Martinez-Gonzalez & Bes-Rastrollo, 2014). Il corrente paradigma in epidemiologia nutrizionale è quello di analizzare un modello dietetico, diversamente dai tradizionali approcci di analisi incentrati su singoli nutrienti o prodotti alimentari isolati. I modelli dietetici catturano le sinergie tra gli alimenti e permettono di valutare gli effetti cumulativi della dieta complessiva. Risulta, infatti, improbabile che modificare l'assunzione di singoli nutrienti o alimenti influisca sostanzialmente sugli esiti clinici (Martinez-Gonzalez & Bes-Rastrollo, 2014).

La tradizionale Dieta Mediterranea ha suscitato notevole interesse perché è stata dimostrata essere associata a un'aspettativa di vita vantaggiosa. Un'enorme crescita della qualità e della quantità delle prove scientifiche disponibili nel corso degli ultimi venticinque anni sostiene che la tradizionale Dieta Mediterranea potrebbe essere una delle più sane abitudini alimentari nel mondo e potrebbe essere la spiegazione plausibile per la maggiore longevità e tassi più bassi di malattie cardiovascolari nei paesi del Mediterraneo.

La quota lipidica sierica, le cui principali fonti sono colesterolo e trigliceridi, è stata ampiamente studiata per le sue implicazioni in processi fisiologici e patologici e, in particolare, la concentrazione di colesterolo è il punto di riferimento più importante nella valutazione del rischio cardiovascolare e progressione della malattia aterosclerotica (van Wijk *et al.*, 2009). Mentre singole molecole possono essere usate come riferimento diagnostico, è anche noto che l'assunzione con la dieta di singoli nutrienti influenza direttamente la loro concentrazione nel siero, come è stato mostrato per gli acidi grassi (Bethune *et al.*, 2006). Inoltre, è ragionevole considerare che i componenti del siero, anche derivanti dall'apporto nutrizionale, possono influenzare il metabolismo generale e, più in particolare, riguardare i meccanismi molecolari e le vie che collegano apporto nutrizionale e rischio di malattia cronica.

I lipidi rappresentano una classe eterogenea dal punto di vista chimico, per le loro differenti fonti alimentari o metaboliche e per i loro effetti biologici. Gli acidi grassi saturi tendono a far innalzare il livello di colesterolo nel sangue aumentando così il rischio di insorgenza di malattie cardiovascolari (Caggiula & Mustak, 1997); gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) reprimono l'espressione di geni che codificano enzimi lipogenici, glicolitici e colesterologeni, mentre aumentano l'espressione di geni che codificano enzimi coinvolti nella β -ossidazione a livello epatico e del muscolo scheletrico (Jump *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1997). Infatti, i correnti suggerimenti sui grassi alimentari propongono la sostituzione di acidi grassi saturi e *trans* nella dieta con acidi grassi mono e polinsaturi per la prevenzione delle malattie cardiovascolari. (Mensink *et al.*, 2003; Breslow, 2006; Carpentier *et al.*, 2006; Lichtenstein *et al.*, 2006; Erkkilä *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Warensjö *et al.*, 2008). I più importanti PUFA devono essere ottenuti dalla dieta perché non possono essere sintetizzati in modo efficiente nel corpo umano, per cui la loro assunzione alimentare influenza direttamente la composizione sierica di acidi grassi con differenti effetti biologici (Bethune *et al.*, 2006). Queste evidenze hanno permesso di confermare un ruolo predittivo del contenuto lipidico della dieta rispetto alla colesterolemia, con l'idea di considerare il dosaggio ematico dei principali acidi grassi polinsaturi come riferimento preventivo o diagnostico soprattutto nelle malattie legate alla dieta.

L'interesse scientifico nei confronti degli acidi grassi insaturi, nasce da uno studio di Bang del 1976, volto a scoprire il motivo della bassa incidenza di malattie cardiovascolari nella popolazione eschimese della Groenlandia. Dal confronto tra la suddetta popolazione

e un gruppo eschimese stanziatosi in Danimarca, emerse come la causa di questo singolare connotato non fosse da attribuire a fattori genetici bensì alla tradizionale dieta eschimese. Infatti, gli Eschimesi della Groenlandia, a differenza della controparte danese, facevano uso di questa dieta che seppur povera di carboidrati e cereali offriva effetti benefici per la salute grazie al largo consumo di acidi grassi polinsaturi (Bang *et al.*, 1980; Rissanen *et al.*, 2000).

Studi successivi hanno confermato come un apporto equilibrato di acidi grassi polinsaturi sia determinante per il mantenimento, miglioramento e recupero dello stato di salute. Ad esempio, in ambito epidemiologico, gli studi GISSI e DART (Marchiolia *et al.* 2007; Burr *et al.*, 1989) hanno mostrato in pazienti colpiti da infarto l'efficacia sia di una terapia che di una dieta ricca in acidi grassi polinsaturi n-3 e vitamina E nel ridurre la mortalità o l'incidenza di episodi recidivanti di infarto.

Al contrario, è riportata una correlazione proporzionale tra assunzione di acidi grassi n-6 o *trans* e rischio di malattie cardiovascolari (Erkkilä A, *et al.* 2008).

Quindi, vari studi nella letteratura scientifica hanno proposto un ruolo determinante per i livelli ematici di acidi grassi come biomarkers di riferimento clinico accanto al colesterolo (Crowe *et al.*, 2006; van Wijk *et al.*, 2009). Tuttavia, identificare il ruolo degli acidi grassi derivanti dall'alimentazione nella patogenesi di malattie risulta complicato in quanto questi nutrienti sono coinvolti in differenti funzioni fisiologiche, quali formazione di membrane, metabolismo energetico, meccanismi di segnalazione cellulare; inoltre, alcuni studi in vivo dimostrano che gli acidi grassi alimentari sono in grado di modulare l'espressione di un gran numero di geni (Eletto *et al.*, 2005; Knoch *et al.*, 2010). I dati descritti in precedenza nel nostro laboratorio mettono in evidenza per la prima volta una relazione funzionale e diretta tra la composizione lipidica sierica e l'espressione di geni coinvolti nella patogenesi di malattie dislipidemiche. Tali studi sono stati condotti utilizzando campioni di siero, provenienti da soggetti sani di sesso maschile, caratterizzati per profilo in acidi grassi, e classificati in due gruppi: normocolesterolemico e ipercolesterolemico. Si è potuto, quindi, considerare lo stato nutrizionale come causa principale di differenza tra i due gruppi. L'aggiunta diretta dei sieri al mezzo di coltura in cellule di epatoma umano (HepG2) ha determinato riduzione dell'espressione della proteina SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c) ed aumento di UGT1A1 (UDP-glucuronosyltransferase 1A1) (Zirpoli *et al.*, 2012).

2.1 Struttura degli acidi grassi

Gli acidi grassi (AG) sono costituenti fondamentali dei lipidi e ne determinano le proprietà fisiche e biologiche. Essi non si trovano liberi in natura (eccetto che in piccole quantità), bensì esterificati con il glicerolo (triacilgliceroli, glicerofosfolipidi) o al gruppo ossidrilico del colesterolo (esteri del colesterolo) e più raramente con legame carbamidico ad un amino gruppo di un amino alcol (es. sfingosina). Nei sistemi biologici solo una piccola frazione di acidi grassi è presente in forma non legata (AG liberi, AGL), ma comunque complessata a proteine specializzate, quali l'albumina plasmatica.

La struttura dei singoli acidi grassi determina la loro funzione biologica. Gli acidi grassi sono molecole idrofobiche composte da un gruppo acido carbossilico, un gruppo metilico ed una catena di atomi di carbonio ed idrogeno, come mostrato in figura 1A. Gli acidi grassi differiscono strutturalmente in quattro punti chiave: 1) la presenza e il numero di doppi legami tra gli atomi di carbonio, 2) il numero di atomi di carbonio, 3) la posizione dei doppi legami, 4) l'orientamento dei doppi legami (Kalish *et al.*, 2012).

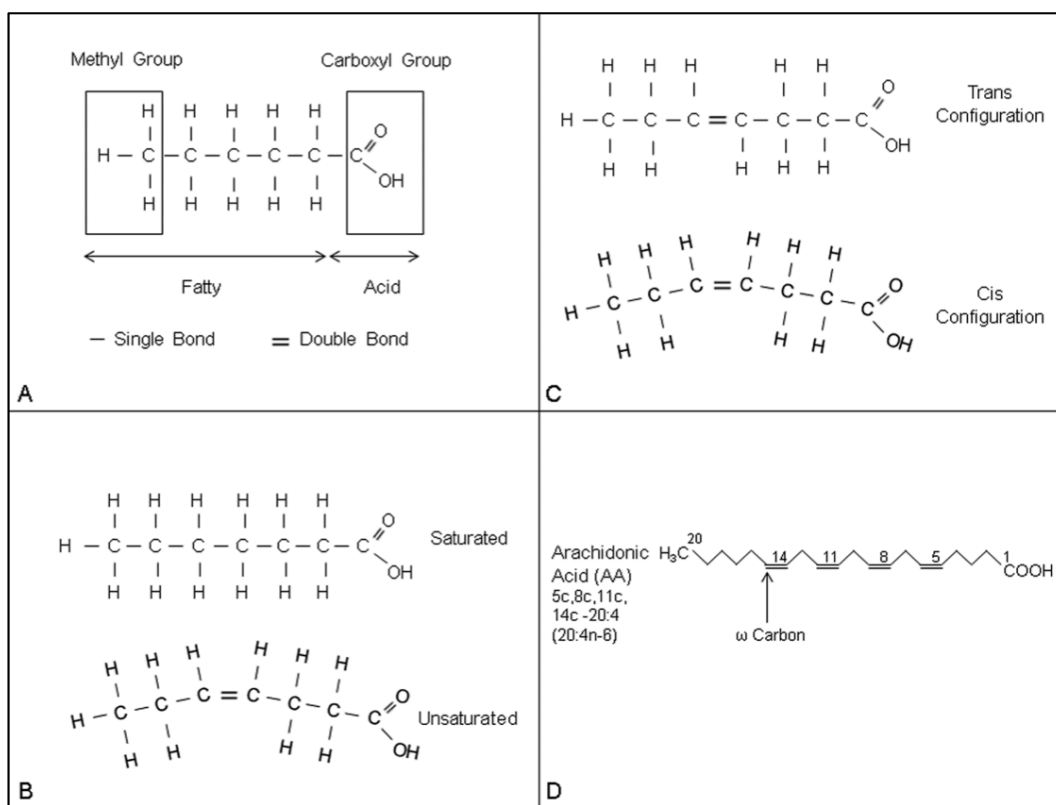


Figura 1. (A) Struttura degli acidi grassi, con il gruppo metile e carbossile evidenziati. (B) Gli acidi grassi insaturi contengono doppi legami tra atomi di carbonio; l'aggiunta di atomi di idrogeno per eliminare doppi legami crea acidi grassi saturi. (C) L'orientamento degli atomi di carbonio relativi ad un doppio legame può essere cis (stesso lato del doppio legame) o trans (lato opposto del doppio legame). (D) Scheletro strutturale dell'acido arachidonico, con indicato l'atomo di carbonio ω e nomenclatura sistematica (Kalish *et al.*, 2012).

Il tipo di legame tra gli atomi di carbonio determina se la molecola è saturata o insatura (Fig. 1B); infatti, in base all'assenza o alla presenza di doppi legami nella catena carboniosa, possono essere classificati come (Fig. 3):

- acidi grassi saturi (SFA, Saturated Fatty Acids) se non sono presenti doppi legami tra gli atomi di carbonio;
- acidi grassi monoinsaturi (MUFA, Monounsaturated Fatty Acids), se è presente un singolo doppio legame;
- acidi grassi polinsaturi (PUFA, Polyunsaturated Fatty Acids), se è presente più di un doppio legame.

Gli acidi grassi saturi possono essere divisi in categorie differenti in base alla lunghezza della catena carboniosa:

- acidi grassi a corta catena (SCFA), con 3-7 atomi di carbonio;
- acidi grassi a catena media (MCFA), con 8-10 atomi di carbonio;
- acidi grassi a catena lunga (LCFA), con 14-20 atomi di carbonio;
- acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA), oltre i 20 atomi di carbonio.

Gli acidi grassi insaturi sono generalmente divisi in tre classi sulla base della lunghezza della catena carboniosa:

- acidi grassi a corta catena, fino a 19 atomi di carbonio;
- acidi grassi a lunga catena, con 20-24 atomi di carbonio;
- acidi grassi a catena molto lunga, oltre i 25 atomi di carbonio.

I termini *cis* e *trans* sono usati per indicare la posizione relativa dei due atomi di carbonio connessi al doppio legame (Fig. 1C). Gli atomi sono *cis* se giacciono sullo stesso lato del doppio legame, questo porta ad un diverso orientamento degli atomi di carbonio adiacenti attraverso il doppio legame nella molecola risultante avente una struttura curva. Sono, invece, *trans* se si trovano sul lato opposto del doppio legame, in una struttura non curva. Quasi tutti gli acidi grassi insaturi presenti in natura sono *cis*, con il doppio legame più comunemente nella terza, sesta, o nona posizione rispetto al gruppo metilico terminale. La maggior parte degli acidi grassi *trans* derivano da idrogenazione, un processo di fabbricazione utilizzato per fare i grassi idrogenati.

Il grado di saturazione altera la temperatura di fusione degli acidi grassi. Gli acidi grassi saturi hanno un punto di fusione elevato, dovuto alla possibilità che essi hanno di realizzare una libera rotazione intorno ad ogni legame carbonio-carbonio, ciò conferisce a tali molecole flessibilità e la capacità di aggregarsi saldamente, così da avere una consistenza solida a temperatura ambiente. Gli acidi grassi insaturi, invece, hanno un punto di fusione inferiore rispetto agli acidi grassi saturi, in quanto i doppi legami producono ripiegamenti nella catena idrocarburica, di conseguenza non ci sono salde aggregazioni e le molecole riescono a stabilire solo deboli interazioni. Per rompere queste interazioni deboli è necessaria meno energia termica, e questo spiega come spesso questi acidi grassi assumano una consistenza fluida a temperatura ambiente. (Ratnayake & Galli, 2009).

Un acido grasso insaturo può divenire saturo se il doppio legame che unisce gli atomi di carbonio è eliminato con l'aggiunta di atomi d'idrogeno. Al contrario, l'aumento del numero di doppi legami, ovvero il passaggio da acidi grassi saturi a molecole progressivamente più insature, costituisce un elemento strutturale di primaria importanza funzionale: la presenza in serie di doppi legami conferisce alla catena carboniosa il progressivo incremento dei punti di torsione, proprio in corrispondenza del doppio legame. A livello tridimensionale ciò comporta la crescente tendenza dei PUFA ad assumere una conformazione meno rigida che, sul piano morfo-funzionale, corrisponde ad una crescente fluidità delle membrane entro cui i PUFA sono incorporati. Il grado di insaturazione condiziona anche le caratteristiche chimiche, in particolare, influenza la stabilità dei composti; infatti, all'aumentare del grado di insaturazione è maggiore la suscettibilità degli acidi grassi alle perossidazioni.

Gli acidi grassi sono i mattoni fondamentali di lipidi strutturalmente più complessi, tra cui gli esteri, trigliceridi, fosfolipidi e glicolipidi. Una molecola di estere si forma nella reazione tra un acido carbossilico ed un alcol. Tre acidi grassi in un legame estere

combinato con un glicerolo formano un triacilglicerolo, o comunemente definito un trigliceride (Fig. 2A). I fosfolipidi, componenti del doppio strato lipidico delle membrane cellulari (Fig. 2B), sono divisi in glicerofosfolipidi (fosfogliceridi) e sfingolipidi. Il primo è costituito da una spina dorsale idrofobica di un glicerolo e acidi grassi collegati attraverso un legame fosfodiesterico a un gruppo polare fosfato e un alcool. Il secondo è composto da uno scheletro di sfingosina e un acido grasso legato uno zucchero (Kalish *et al.*, 2012).

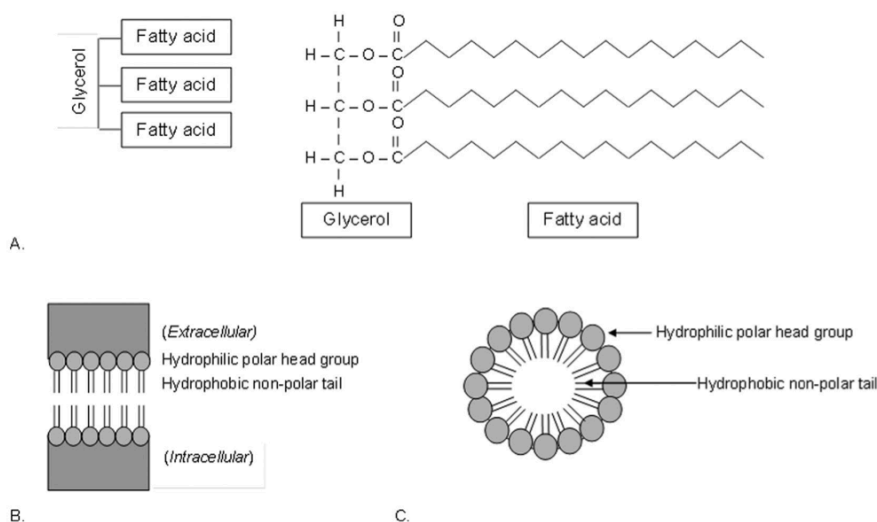


Figura 2. (A) Un trigliceride è composto da 3 acidi grassi uniti da glicerolo. (B) Schema della composizione del doppio strato fosfolipidico di una membrana cellulare. (C) Schema di un chilomicrone, particella lipoproteica che trasporta lipidi alimentari dall'intestino (Kalish *et al.*, 2012).

I grassi, come fonte di combustione, derivano da tre fonti: dieta, depositi e esportazione da un organo all'altro. I trigliceridi dalla dieta enterale sono emulsionati dai sali biliari per formare micelle nell'intestino. Le lipasi pancreatiche scindono i triacilgliceroli in acidi grassi liberi e 2-monoacilgliceroli. Questi sono incorporati in micelle, insieme a colesterolo esterificato e vitamine liposolubili (A, D, E e K). Questi componenti sono più piccoli e quindi possono diffondere attraverso l'epitelio intestinale, dove vengono riassorbiti e incorporati in molecole lipoproteiche chiamate chilomicroni (Fig. 2C). I chilomicroni entrano nel sistema linfatico, passando poi nel sangue e sono, infine, trasportati al muscolo e tessuto adiposo. La lipoproteina lipasi endoteliale digerisce i trigliceridi all'interno dei chilomicroni in acidi grassi e glicerolo, che possono essere sia assorbiti all'interno della cellula sia ossidati per produrre energia o immagazzinati come triacilgliceroli (Kalish *et al.*, 2012).

2.2 Nomenclatura degli acidi grassi

Numerosi sistemi di nomenclatura sono utilizzati per identificare gli acidi grassi. Il nome sistematico è definito in accordo all'International Union of Pure and Applied Chemists (IUPAC), e dipende dal numero totale di atomi di carbonio di cui la molecola è composta, dal numero di doppi legami presenti e dalla loro posizione.

Il nome di un acido grasso si forma dal nome dell'idrocarburo da cui deriva sostituendo la -o finale con la desinenza -oico.

Gli acidi grassi sono normalmente indicati con la lettera C, che indica il termine carbonio, seguita da un numero, che corrisponde al numero di atomi di carbonio contenuti

nella catena; seguono poi i due punti ed un secondo numero, che corrisponde al numero di doppi legami contenuti nell'acido grasso (es. acido linoleico C18:02).

Gli atomi di carbonio degli acidi grassi sono numerati a partire dal carbonio contenente il gruppo carbossilico. Gli atomi di carbonio 2 e 3 sono spesso indicati rispettivamente come α e β . L'atomo di carbonio metilico all'estremità distale della catena è chiamato anche carbonio ω o n .

La posizione dei doppi legami può essere indicata in due modi: nel primo gli atomi di carbonio della catena sono numerati a partire dal gruppo carbossiterminale e la posizione dei doppi legami è indicata dal simbolo Δ seguito dal numero esponente relativo (es. acido linoleico C18:02 $\Delta^{9,12}$, in questo caso sono presenti nella molecola due doppi legami, il primo tra gli atomi di carbonio 9 e 10, il secondo tra gli atomi di carbonio 12 e 13); nel secondo metodo la posizione di un doppio legame può essere indicata dalla classe ω o n di appartenenza. La classe n dipende dalla localizzazione del primo doppio legame, a partire dal gruppo metilico in posizione distale (es. acido linoleico C18:02 $n-6$) (Stryer *et al.*, 1996).

La figura 1D mostra la nomenclatura e la struttura dell'acido arachidonico (AA). La struttura è raffigurata come uno scheletro carbonioso in cui ciascun punto di flesso denota un atomo di carbonio (Kalish *et al.*, 2012).

In relazione alla classe n di appartenenza gli acidi grassi insaturi possono venire divisi in serie:

- $n-9$, oleica
- $n-7$, palmitoleica
- $n-6$, linoleica
- $n-3$, linolenica

Gli acidi grassi sono costituiti da una catena carboniosa, in genere a numero pari di atomi di carbonio, di solito compresi tra 12 e 24, i più comuni sono quelli a 16 e 18 atomi (Fig. 3).

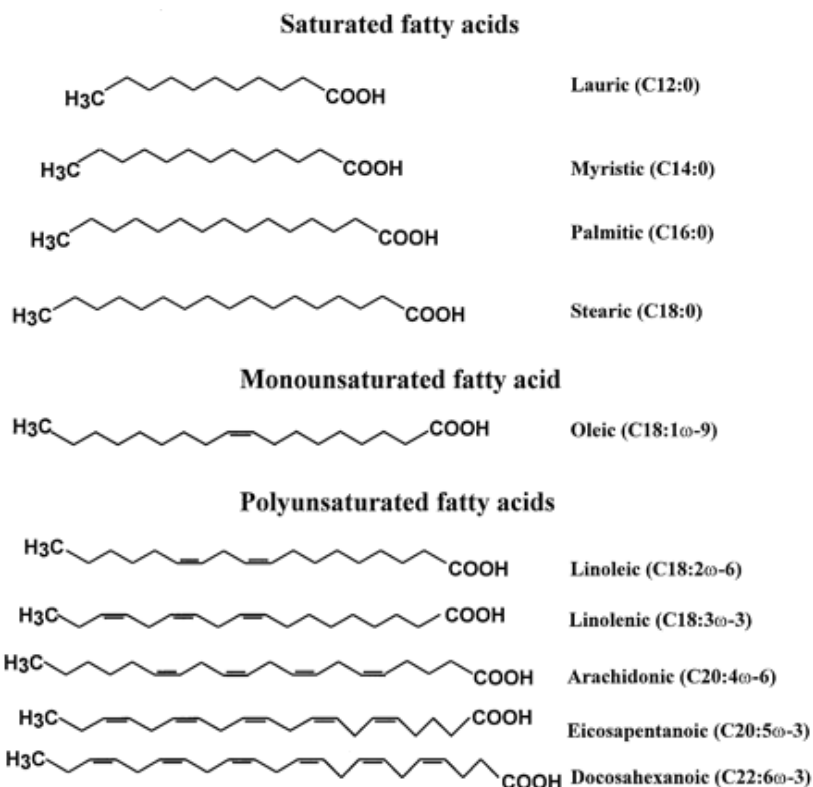


Figura 3. Classificazione degli acidi grassi saturi, mono- e polinsaturi.

2.3 Acidi grassi saturi: risorse alimentari e funzioni biologiche

Gli acidi grassi saturi a corta catena includono l'acido acetico (2:0), propionico (3:0) e butirrico (4:0), che si formano durante la fermentazione della fibra nel colon prossimale. Essi sono rapidamente assorbiti; l'acido acetico e in parte il propionico sono riassorbiti dal circolo portale, trasportati al fegato e trasformati in glucosio (acido propionico) e acidi grassi (acido acetico). Questo processo può coprire il 10-20% del dispendio energetico a riposo (REE, resting energy expenditure) del corpo umano. È importante sottolineare che l'acido butirrico e parzialmente anche il propionico sono usati nel metabolismo, proliferazione e replicazione cellulare in colonociti.

Altre funzioni degli acidi grassi saturi nel colon includono la stimolazione di:

- 1) assorbimento di acqua, sodio, cloruro e bicarbonato;
- 2) flusso di sangue attraverso la mucosa del colon;
- 3) proliferazione di colonociti;
- 4) produzione di muco;
- 5) riproduzione limitata di batteri saprofiti e putrefazione a causa della diminuzione di acidità (Compher *et al.*, 1997).

Gli acidi grassi a media catena comprendono l'acido caproico (6:0), caprilico (8:0), e caprico (10:0), che sono direttamente riassorbiti e trasportati dalla vena porta. Il loro trasferimento intramitocondriale non ha bisogno della presenza di carnitina o di carnitina palmitoil transferasi. Emulsioni di grassi contenenti trigliceridi a catena media (MCT) sono utilizzate come supporto nutrizionale nella nutrizione enterale. Questi hanno minor tempo biologico e maggiore stabilità alla lipoperossidazione. Queste emulsioni inibiscono anche la diminuzione del REE durante periodi di restrizione calorica. Per tali motivi, essi sono

raccomandati in alcuni casi di regime dietetico restrittivo per individui obesi (Hainer *et al.*, 1994).

Gli acidi grassi saturi a lunga catena includono l'acido laurico (12:0), miristico (14:0), palmitico (16:0), e stearico (18:0), che hanno potenziale aterogenico e trombogenico. Questi acidi grassi, ricavati principalmente da olio di cocco, olio di palmisto, burro di cacao, burro di karitè (Akihisa *et al.*, 2010; Di Vincenzo *et al.*, 2005) e burro di illipè, rappresentano l'80-90% del totale di acidi grassi saturi provenienti dall'assunzione di cibo. Fonti animali di LCFA sono burro, strutto e sego di bovini (Larsson & Quinn, 1994).

Il consumo di acidi grassi saturi a lunga catena aumenta i livelli di colesterolo, ovvero quelli di lipoproteine a bassa densità (LDL), associato ad un aumento di mortalità per malattia coronarica (CHD) (Astrup *et al.*, 2011). L'effetto di aumento di colesterolo LDL diminuisce nella direzione 12:0 – 14:0 – 16:0 (Bysted *et al.*, 2005; Tholstrup & Samman, 2004). D'altra parte, l'effetto di riduzione delle lipoproteine ad alta densità (HDL) diminuisce nella direzione 14:0 – 12:0 – 16:0 (Tholstrup *et al.*, 1994; Tholstrup *et al.*, 2003). Al contrario, alcuni studi hanno dimostrato che l'acido stearico (18:0) diminuisce i livelli di colesterolo LDL ed aumenta quelli di colesterolo HDL, che può suggerire proprietà antiaterogeniche dell'acido grasso (Sanders *et al.*, 2001; Tholstrup *et al.*, 1994). Inoltre, è stato dimostrato che l'acido stearico non innalza l'infiammazione postprandiale. Tuttavia, è stato suggerito che tale acido grasso ha un più alto potenziale protrombotico rispetto ad altri LCFA saturi, anche se questo punto è sotto discussione (Tholstrup, 2005).

Gli acidi grassi a catena molto lunga comprendono l'acido arachico (20:0), beenico (22:0), lignocerico (24:0), cerotico (26:0), montanico (28:0) e melissico (30:0), che appaiono in concentrazioni significative in malattie metaboliche ereditarie, per esempio Sindrome di Zellweger, malattia di Refsum, malattia di Menkes (Gotto, 2004). Gli individui che soffrono di questi disturbi possono beneficiare di somministrazione di PUFA n-3.

2.4 Acidi grassi monoinsaturi in configurazione *cis*: risorse alimentari e funzioni biologiche

Rappresentanti principali di questo gruppo di acidi grassi sono l'acido oleico (18:1n-9c), vaccenico (Raff *et al.*, 2006) (18:1n-7c) e palmitoleico (16:1n-7c). Altri MUFA sintetizzati endogenamente, l'acido miristoleico (14:1n-5c), gondoico (20:1n-9c), erucico (22:1n-9c) e nervonico (24:1n-9c), sono presenti solo in concentrazioni minori. Acidi grassi monoinsaturi non sintetizzati *de novo* sono l'acido gadoleico (20:1n-11c) e cetoleico (22:1n-11c). L'acido erucico, la cui principale fonte è l'olio di colza, è cardiotossico (Heggveit *et al.*, 1973). Esperimenti con acido erucico in ratti hanno mostrato una maggiore deposizione di grasso cui fa seguito la formazione di lesioni miocardiche (Beare-Rogers & Nera, 1972; Beare-Rogers & Gordon, 1976). In studi sull'uomo, è stato osservato che l'acido erucico riduce il numero di piastrine e la loro anisotropia di membrana (Stockler *et al.*, 1997).

L'acido oleico (18:1n-9c) ha proprietà antiaterogeniche e antitrombotiche, infatti, è stato mostrato aumentare il rapporto colesterolo-HDL/LDL e ridurre l'aggregazione di trombociti. L'incorporazione di acido oleico in esteri del colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi di particelle di lipoproteine aumenta la resistenza alla lipoperossidazione. La sostituzione di SFA con acido oleico riduce la concentrazione di trigliceridi, colesterolo LDL, aumenta la concentrazione di colesterolo HDL, e regola la sensibilità all'insulina (Riccardi *et al.*, 2004). L'olio d'oliva, principale fonte alimentare di acido oleico, è stato anche testato sperimentalmente per il suo ruolo protettivo nella carcinogenesi (Costa *et al.*, 2011) e per il suo effetto nella risposta infiammatoria (Rodrigues *et al.*, 2010).

2.5 Acidi grassi monoinsaturi in configurazione *trans*: risorse alimentari e funzioni biologiche

Queste sono molecole hanno caratteristiche chimico fisiche simili a quelle degli acidi grassi saturi, influenzando le proprietà della membrana cellulare in modo simile agli SFA. I principali MUFA *trans* sono l'acido elaidico (18:1n-9t) e *trans*-vaccenico (18:1n-7t). Gli acidi grassi *trans* sono di derivazione esogena. Il loro effetto aterogenico (Dyerberg *et al.*, 2004) si presume essere superiore a quella degli SFA. Inoltre, i MUFA *trans* sono due volte più attivi rispetto agli acidi grassi saturi nell'innalzare i livelli di colesterolo LDL diminuendo quelli di colesterolo HDL (Booker & Mann, 2008; Osso *et al.*, 2008). Principali fonti alimentari di acidi grassi *trans* sono addensamento o riduzione (come margarine da oli vegetali idrogenati utilizzando un catalizzatore improprio) e burro (gli AG *trans* nel latte provengono dal tratto gastrointestinale dei ruminanti). I grassi idrogenati sono utilizzati principalmente in pasticceria e nell'industria "fast-food" (Salisbury *et al.*, 2011). Tuttavia, i progressi nell'industria di trasformazione alimentare hanno ormai ridotto la produzione di acidi grassi *trans*.

2.6 Acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6: sintesi endogena

I principali PUFA da un punto di vista nutrizionale sono rappresentati dalla classe degli n-3 e degli n-6. Il precursore degli acidi grassi n-3 è l'acido α -linolenico (ALA, 18:3), quello degli n-6 è l'acido linoleico (LA, 18:2). Poiché questi due acidi grassi non possono essere sintetizzati nell'organismo e devono essere introdotti con la dieta, sono definiti acidi grassi essenziali (EFA, Essential Fatty Acids); infatti, sono necessari al benessere dell'organismo umano (sintesi di prostaglandine e leucotrieni). La mancata sintesi di ALA e LA è una conseguenza dell'assenza di desaturasi che dovrebbero introdurre doppi legami in posizione 3 e in posizione 6 (a partire dall'estremità metilica). Le principali fonti di acidi grassi n-6 sono foglie verdi (spinaci), legumi, frutta secca, oli vegetali quali olio di mais, cartamo e soia; mentre le principali fonti di acidi grassi n-3 sono i pesci quali salmone, trota e tonno (Marszalek & Lodish, 2005).

ALA e LA come tali, non svolgono una precisa funzione fisiologica, salvo quella di essere utilizzati come fonte di energia. Comunque, una volta entrati nel compartimento cellulare, possono essere trasformati a livello microsomiale in acidi grassi polinsaturi a lunga catena (≥ 20 atomi di carbonio e ≥ 3 doppi legami). Il più importante PUFA della serie n-6 è l'acido arachidonico (AA, 20:4), mentre l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6) sono i maggiori PUFA della serie n-3.

Entrambe le serie di PUFA n-6 e n-3 vengono incorporate nelle membrane biologiche, sotto forma di componenti di glicolipidi e fosfolipidi dove assicurano, in particolare EPA e DHA, il giusto grado di fluidità, permeabilità e modulazione. Inoltre, liberati dai fosfolipidi di membrana sono precursori di molecole definite eicosanoidi, importanti mediatori di numerose reazioni cellulari. A livello delle membrane cellulari le due classi di acidi grassi competono per lo stesso sistema enzimatico, in quanto il loro metabolismo è completamente separato e non è possibile una loro interconversione, infatti, un acido grasso n-3 non può essere trasformato in un acido grasso n-6 o viceversa. La conversione degli AG in derivati a maggior numero di atomi di carbonio ed a più elevato grado di insaturazione avviene mediante l'intervento di enzimi specializzati (rispettivamente elongasi e desaturasi) prevalentemente localizzati a livello del reticolo endoplasmatico (microsomi). Le elongasi sono sistemi enzimatici che aggiungono due atomi di carbonio (un residuo di acetato) all'acido grasso di partenza, mediante un processo che sostanzialmente riproduce in senso inverso quello della β -ossidazione degli AG. Questi enzimi non sono particolarmente selettivi e la loro attività non è influenzata da fattori esogeni (apporto alimentare di AG, fattori endocrini, farmacologici o tossicologici).

Le desaturasi sono enzimi in grado di inserire doppi legami nella catena carboniosa, conferendo in questo modo specificità e funzione biologica per ciascun acido grasso. Le desaturasi sono attivate per esempio dai carboidrati o dall'insulina; inibite o bloccate, invece, da condizioni quali digiuno, diete ricche in colesterolo, grassi saturi, acidi grassi *trans* derivati dalla trasformazione degli oli vegetali, iperglicemia, alcool, invecchiamento, adrenalina (azione mediata da β -recettori), glucocorticoidi, diete ipoproteiche, virus oncogeni, radiazioni ionizzanti. (Schmitz & Ecker, 2008).

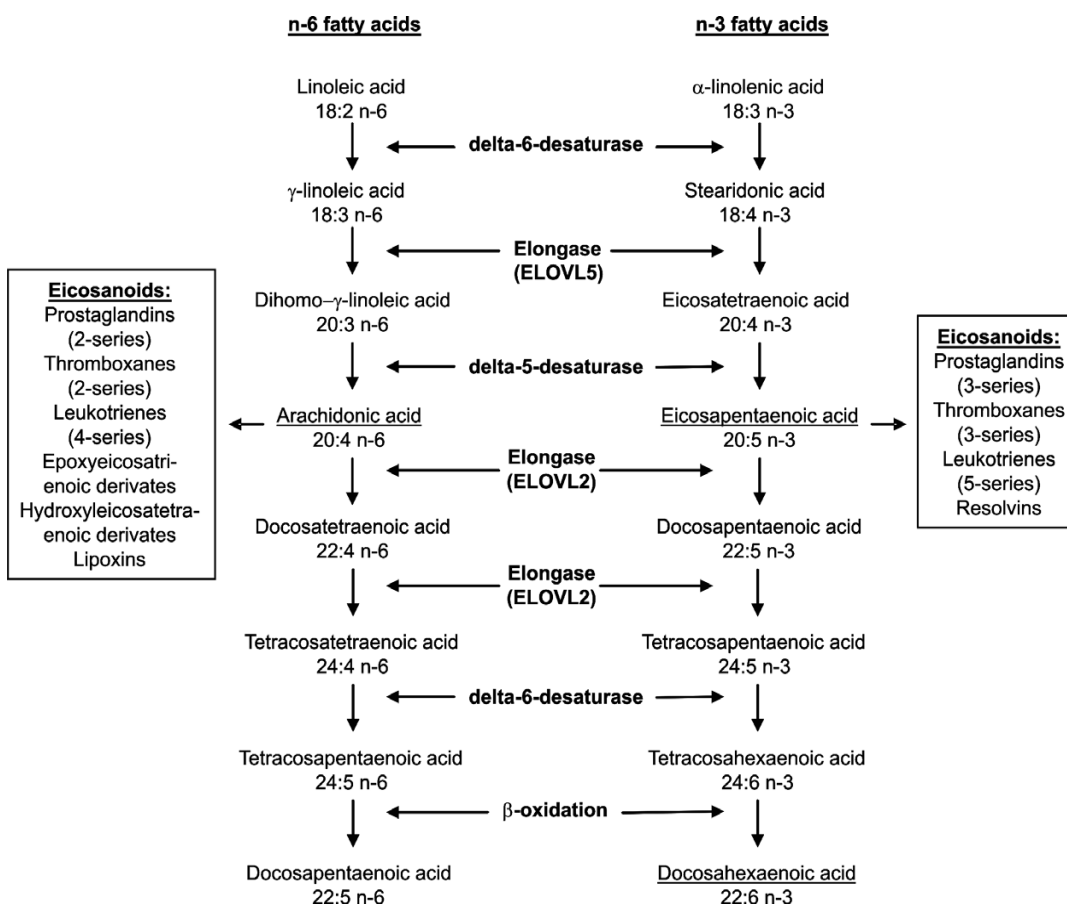


Figura 4. Metabolismo degli acidi grassi n-3 e n-6.

Quindi, le vie metaboliche della serie linoleica e α -linolenica utilizzano gli stessi enzimi per le reazioni di allungamento e desaturazione che dall'acido linoleico e α -linolenico conducono, rispettivamente, alla formazione di AA e di EPA. Quest'ultimo può ulteriormente essere allungato e desaturato a DHA, che costituisce una riserva di EPA e può, quindi, esercitare i suoi effetti cellulari sia direttamente che indirettamente tramite riconversione in EPA (Fig. 4).

La competizione per lo stesso sistema enzimatico e la variabile disponibilità di acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6 influenzano la tipologia di metaboliti prodotti dal sistema enzimatico. Se l'assunzione di acidi grassi n-6 è maggiore di quelli n-3, maggiore sarà la produzione di metaboliti dell'AL (quali AA) e minore quella dei metaboliti dell'ALA (quali EPA e DHA), e viceversa. Ciò ha importanti implicazioni pratiche se si considera che tali metaboliti hanno effetti biologici profondamente diversi.

L'efficienza di trasformazione dei precursori in forme mature è più alta nelle donne rispetto agli uomini, grazie agli effetti regolatori realizzati dagli estrogeni. Durante la gravidanza tale up-regolazione consente di rispondere al fabbisogno di DHA del feto (Burdge, 2004).

È bene precisare che i mammiferi, a differenza delle piante e dei cianobatteri, non possono convertire l'acido linoleico in α -linoleico a causa della mancanza dell'enzima di conversione ω -3-desaturase (Pereira et al., 2004).

2.7 Acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6: risorse alimentari

Considerando che la sintesi endogena di acidi grassi n-3 e n-6 non è sufficiente a soddisfare il fabbisogno individuale giornaliero, nasce la necessità di un apporto aggiuntivo proveniente dall'alimentazione.

Le maggiori fonti alimentari di AA sono rappresentate da cibi di origine animale quali uova, carne, pesce. EPA e DHA si trovano soprattutto nel pesce azzurro che vive in mari freddi come salmone, sardine, aringa, merluzzo, sgombro, e provengono soprattutto dalle alghe eterotrofe fotosintetiche di cui i pesci si nutrono.

Al fine di proteggere l'ecosistema oceano, alcune ricerche si sono concentrate sulla possibilità di individuare fonti alternative di n-3. Le fonti principalmente considerate sono l'acido stearidonico (SDA) e l'olio di alghe. L'acido stearidonico è in grado di influenzare positivamente il metabolismo lipidico degli n-3. Questo acido grasso è presente nell'olio delle piante Boraginaceae, Primulaceae e Cannabaceae; la coltivazione delle stesse potrebbe rappresentare un valido fornitore di n-3. SDA è sintetizzato a partire dall'acido linolenico mediante una desaturazione catalizzata dall'enzima *delta-6-desaturase*; negli uomini l'attività di tale enzima è inefficiente e di conseguenza la tappa che lo coinvolge è un punto debole del pathway n-3. La diretta assunzione da parte dell'uomo di SDA permette di superare la tappa catalizzata dall'enzima limitante, determinando un aumento della produzione endogena di EPA (Lenihan-Geels et al., 2013). Una seconda fonte alternativa di acidi grassi essenziali della serie n-3 potrebbero essere le microalghe. Le alghe sono il primo anello della catena alimentare dell'oceano e molte sono le specie in grado di fornire a vari livelli EPA e DHA; per questo si ritiene che se si riuscissero a superare i problemi legati ai costi e ai metodi di estrazione e purificazione, le microalghe potrebbero rappresentare la principale fonte di n-3 della dieta umana. Il DHA è anche prodotto commercialmente da *Cryptocodinium cohnii* che è un microorganismo del genere *Schizochytrium*.

Il latte materno umano ha un contenuto apprezzabile di AA e DHA particolarmente elevato rispetto al latte di altre specie di mammiferi, in cui viceversa sono presenti in genere livelli più elevati di proteine. Il relativamente alto rapporto di acidi grassi polinsaturi a lunga catena delle due serie nel neonato, è stato associato all'alto fabbisogno di questi composti per lo sviluppo di vari sistemi, in particolare il sistema nervoso centrale (SNC) che ne è particolarmente ricco, ed il sistema cardiovascolare, entrambi caratterizzati dall'alto sviluppo di membrane in sistemi specializzati di distribuzione di fluidi o messaggi (chimici o fisici) da un centro alla periferia. Inoltre, è suggerito il consumo di pesce, in particolare di pesce grasso poiché la parte dotata di effetti protettivi è quella lipidica, con obiettivo di prevenzione cardiovascolare.

In base ai *Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana* (LARN) stabiliti dalla Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU), per soggetti adulti, l'assunzione di n-6 dovrebbe essere tale da fornire il 4-8% delle calorie giornaliere e il consumo di n-3 dovrebbe essere quello corrispondente allo 0,5-2% delle calorie giornaliere (SINU, 2012).

Il fabbisogno di acidi grassi essenziali varia nel caso siano presenti condizioni patologiche come l'artrite reumatoide, tumore mammario e asma, ad esempio in soggetti

aventi quest'ultimo disturbo, un rapporto tra n-6 e n-3 di 10/1 potrebbe comportare conseguenze avverse (Simopoulos, 2006). Anche particolari stati fisiologici, come la crescita e la gravidanza, richiedono un diverso apporto di polinsaturi; in particolare, in queste condizioni la quantità di PUFA richiesta è superiore alla norma, in quanto essi hanno il compito di favorire lo sviluppo cerebrale del bambino; di contro carenze di PUFA sono causa di disturbo dell'attenzione e difficoltà nell'apprendimento (Richardson & Puri, 2002).

Fino allo scorso secolo, il rapporto n-6/n-3 nell'alimentazione era pari a 1; mentre le attuali diete occidentali si caratterizzano per un rapporto n-6/n-3 di circa 15/1, questa è una tra le principali cause dell'incremento di patologie cardiovascolari, infiammatorie e cancro. Ciò che sottolinea come sia necessario mantenere un corretto bilancio tra n-6 e n-3 è l'attività antagonista di queste due serie. Non è possibile, però, definire un rapporto ottimale valido per tutti gli individui; il rapporto è vincolato dai fattori di rischio a cui è esposto il soggetto considerato e, quindi, dalla condizione patologica che si vuole prevenire. Ad esempio, per la prevenzione di patologie cardiovascolari un rapporto 4/1 è associato ad una riduzione della mortalità per infarto del 70 % mentre un rapporto 2,5/1 riduce la proliferazione cellulare di pazienti con cancro colon rettale (Simopoulos, 2006).

2.8 Acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6: effetti biologici

2.8.1 Substrato del metabolismo energetico

Gli acidi grassi sono la principale fonte di riserva energetica della maggior parte degli organismi viventi, 1g di acidi grassi mediante il meccanismo della β -ossidazione può fornire una quantità di 9 kcal. Il sito di conservazione dei grassi è dato dalle cellule del tessuto adiposo, anche se una piccola parte di essi è presente nel sangue e nelle cellule dei diversi organi. Quando se ne presenta la necessità, le diverse cellule dell'organismo, sono in grado di usare direttamente gli acidi grassi come fonte di energia.

2.8.2 Ruolo strutturale

Gli acidi grassi polinsaturi sono componenti delle membrane plasmatiche delle cellule, hanno il compito di mantenere fluide le membrane. Sono principalmente implicati nell'attività strutturale gli acidi grassi a lunga catena DHA e EPA (Boelen *et al.*, 2013).

Il DHA ha prevalentemente una funzione strutturale; infatti, è maggiormente presente nei fosfolipidi dei sinaptosomi cerebrali, nella retina e nei fosfolipidi dei canali intramembrana del sodio. Esso svolge, quindi, un ruolo importante nello sviluppo e nella maturazione cerebrale, dell'apparato riproduttivo e del tessuto retinico.

Gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena n-6 hanno, anch'essi, un ruolo strutturale. L'AA è presente nei fosfolipidi di membrana ed è importante, opportunamente bilanciato con il DHA, nello sviluppo embrionale e nell'accrescimento del bambino.

Studi recenti mostrano come gli n-3 oltre ad impattare sull'organizzazione fisica e biochimica della membrana, siano anche implicati nel movimento flip-flop dei fosfolipidi e coinvolti nell'organizzazione dei lipid rafts (Shaikh *et al.*, 2012). I lipid rafts sono zattere lipidiche transienti, formate da sfingolipidi e colesterolo la cui funzione è compartimentalizzare le proteine e determinare il signaling di membrana (Lingwood *et al.*, 2010). Studi realizzati su cellule di linfoma di topo EL4 e linfociti B hanno dimostrato che il DHA è in grado di perturbare i lipid rafts sia dello strato interno che esterno della membrana, con solo un lieve impatto sulle porzioni non-rafts di membrana. Tale azione del DHA è dovuta alla flessibilità conformazionale della catena acilica che rende la molecola poco affine al colesterolo e alle ordinate catene aciliche degli acidi grassi saturi che compongono le zattere. Modifiche sui lipid rafts comportano una diversa distribuzione delle

proteine poste lateralmente ad esse e, di conseguenza, cambiamenti nei meccanismi di signaling in cui le cellule sono coinvolte (Shaikh, 2012; Shaikh *et al.*; 2012).

2.8.3 Attività funzionale

Gli acidi grassi polinsaturi sono precursori degli eicosanoidi, una famiglia di mediatori chimici che regolano i meccanismi dell'infiammazione. Gli enzimi lipossigenasi e ciclossigenasi convertono gli acidi grassi n-3 in fattori anti-infiammatori, gli n-6 in fattori pro-infiammatori. Poiché le due classi di acidi grassi competono per gli stessi enzimi, l'effetto immunomodulatorio dei PUFA è influenzato dal rapporto n-6/n-3 presente (Lenihan-Geels *et al.*, 2013; Ferrucci *et al.*, 2006; Simopoulos, 2002).

L'EPA è il principale precursore delle prostaglandine della serie 3, le quali posseggono una importante attività antiaggregante piastrinica (Schmitz & Ecker, 2008).

L'attività biologica degli acidi grassi n-3 (antiaterogena, antinfiammatoria, antitrombotica) dipende dal prevalere dei fattori protettivi su quelli inducenti rischio. L'assunzione di acidi grassi n-3 incrementa: la formazione di prostaglandine PGI₃; la produzione di leucotrieni B₅ (molto meno infiammatori rispetto ai leucotrieni B₄), di interleuchina 2, dell'EDRF (Endothelial Derived Relaxing Factor); l'attività fibrinolitica; la deformazione degli eritrociti; l'aumento delle HDL (Schmitz & Ecker, 2008).

Di conseguenza, essendo la classe degli n-3 associata sia ad alti livelli di markers anti-infiammatori che a down-regolazione di citochine pro-infiammatorie, ha effetti benefici in pazienti affetti da patologie che si caratterizzano per attiva infiammazione, quali artrite reumatoide, morbo di Crohn e psoriasi (Ferrucci *et al.*, 2006).

Al contrario, a partire dagli n-6 sono prodotte le prostaglandine, trombossani, leucotrieni e lipossine, tutti fattori pro-infiammatori che contribuiscono alla viscosità del sangue, vasocostrizione, formazione di trombi ed ateromi.

In particolare, l'AA incrementa la formazione di prostaglandine della serie 2 (attraverso la via ciclossigenasica) dando luogo alla formazione di intermedi metabolici ad attività pro-infiammatoria e aggregante piastrinica (trombossano A₂); del PAF (Platelet Activating Factor) e del PDGF (Platelet Derived Growth Factor); delle LDL, delle VLDL, dei trigliceridi; della viscosità ematica. Dall'acido arachidonico tramite la via lipossigenasica si formano i leucotrieni 4, che hanno una azione broncocostrittrice (ruolo importante nell'anafilassi insieme alle SRSA – Slow Reacting Substance of Anaphylaxis) (Schmitz & Ecker, 2008).

Quindi, gli effetti biologici degli acidi grassi della serie n-6 e della serie n-3 pur avendo come siti della loro azione gli stessi elementi cellulari (mastociti, neutrofilii, eosinofili, macrofagi, trombociti, endotelio vasale) sono spesso di tipo opposto.

Gli acidi grassi polinsaturi sono in grado di influenzare l'assetto lipidico dell'organismo, in particolare, modulano le concentrazioni plasmatiche di trigliceridi. È bene ricordare che l'elevata concentrazione dei trigliceridi nel sangue è associata ad un incremento del rischio di patologie cardiovascolari. A tal riguardo, da evidenze epidemiologiche emerge che, l'assunzione di acidi grassi saturi, presenti ad esempio nella carne, innalza la trigliceremia post-prandiale (con conseguente riduzione dei livelli di HDL e promozione di piccole e dense particelle di LDL nel sangue). Al contrario l'assunzione di DHA e EPA riduce i livelli di trigliceridi nel plasma, grazie alla capacità di questi acidi grassi essenziali di ottimizzare il metabolismo dei triacilgliceroli; viene offerta, in questo modo, protezione dal rischio di malattie cardiovascolari (Roche *et al.*, 2000; Weber & Raederstorff, 2000).

Poiché l'infiammazione costituisce un fattore determinante nel processo di carcinogenesi, gli acidi grassi polinsaturi modulando la risposta infiammatoria, si configurano, anche, come fattori di rischio e progressione per tali patologie (Lenihan-Geels *et al.*, 2013).

2.9 Acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6: regolazione dell'espressione genica

I PUFA giocano un ruolo chiave nella progressione o prevenzione delle malattie umane quali obesità, diabete, cancro, patologie cardiache e neurologiche, soprattutto influenzando la composizione lipidica delle membrane cellulari, il metabolismo, i pathways di trasduzione del segnale, e mediante controllo diretto dell'espressione genica.

Variazione in quantità o in qualità nella dieta di questi macronutrienti possono comportare notevoli cambiamenti fisiologici, molti dei quali sono tessuto-specifici.

I PUFA mostrano regolazione dell'espressione genica in diversi tessuti, compresi cervello, fegato, cuore e tessuto adiposo. Questi acidi grassi reprimono l'espressione di geni che codificano enzimi lipogenici, glicolitici e colesterologeni, mentre aumentano l'espressione di geni che codificano enzimi coinvolti nella β -ossidazione a livello epatico e del muscolo scheletrico (Jump et al., 1994; Clarke et al., 1997). L'immediato risultato di questi eventi è una riduzione della lipogenesi ed un aumento dell'ossidazione degli acidi grassi e della chetogenesi. Quindi, i PUFA sono efficaci agenti ipolipidemici.

Uno squilibrio tra acidi grassi saturi vs insaturi o n-6 vs n-3 è stato visto come cruciale nello sviluppo e nella progressione di diverse malattie croniche. Conseguentemente sia studi clinici controllati che ricerche di base hanno focalizzato l'attenzione nel capire gli effetti biochimici e molecolari di questi nutrienti in condizioni fisiologiche o patologiche.

Gli acidi grassi agiscono su componenti regolatori, strutturali e metabolici nelle cellule. Molti di questi effetti possono essere legati a cambi di composizione di membrana con conseguente azione sui meccanismi di *cell signaling* (Jump et al., 2002; Hwang et al., 2002). Inoltre, i loro derivati possono fungere da ormoni e quindi legarsi e regolare l'attività di recettori nucleari controllando le maggiori *networks* coinvolte nel metabolismo cellulare (Gottlicher et al., 1992). In letteratura scientifica, numerosi studi riportano che alcuni fattori trascrizionali sono regolati, direttamente o indirettamente, dagli acidi grassi (Fig. 5).

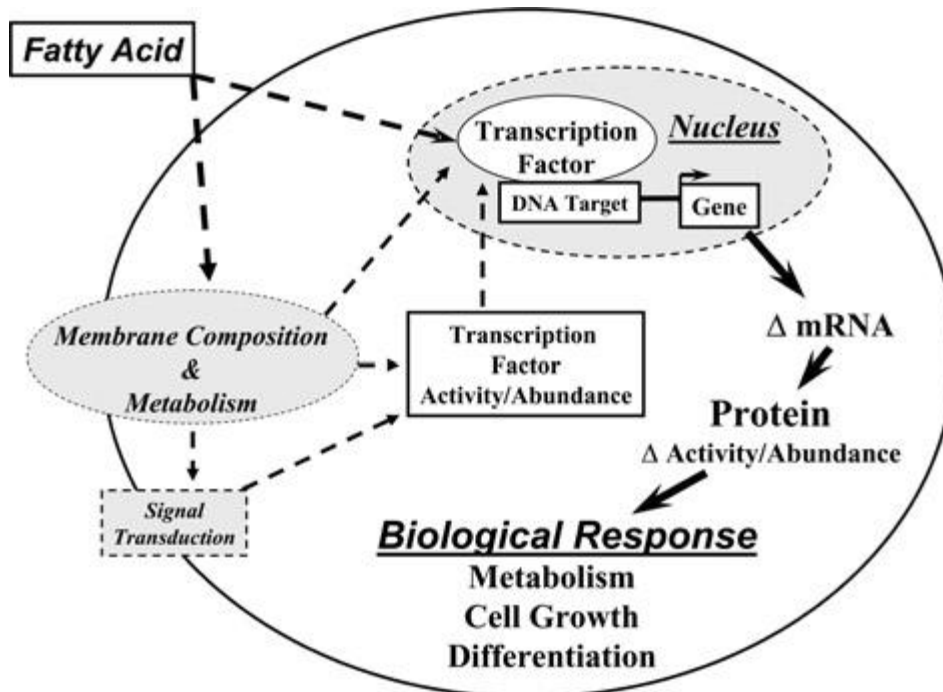


Figura 5. Regolazione della trascrizione genica da parte degli acidi grassi.

Gli acidi grassi polinsaturi sono, infatti, in grado di regolare diversi pathways metabolici, servendosi di due meccanismi. Il primo prevede un diretto legame a recettori nucleari, come *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* (PPAR), *Liver X Receptor* (LXR) e *Hepatic Nuclear Factor-4 α* (HNF-4 α). Il secondo meccanismo prevede il controllo dell'abbondanza nucleare di fattori di trascrizione. Esempi di fattori trascrizionali regolati dagli acidi grassi sono: *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1* (SREBP-1), *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells* (NF κ B), *Carbohydrate Regulatory Element Binding Protein* (ChREBP) e *Maxlike Factor X* (MLX); in questo caso gli acidi grassi non agiscono legandosi direttamente ai fattori (Jump, 2002; Jump, 2008).

Da studi *in vivo* e su colture cellulari emerge come, gli acidi grassi polinsaturi siano, in particolare, coinvolti nella regolazione del metabolismo epatico di carboidrati e lipidi, agendo principalmente sui pathway regolati da LXR e PPAR α (Jump, 2008).

Metodi computazionali di simulazione dinamica molecolare hanno confermato che sia l'EPA che il DHA sono agonisti di PPAR α e γ e inibiscono invece NF-KB (Gani *et al.*, 2008). Questo suggerisce un meccanismo diretto dei PUFA n-3 nella regolazione di geni target e nell'effetto anti-infiammatorio. Inoltre, gli n-3 possono attivare attraverso PPAR α i geni coinvolti nel metabolismo ossidativo dei AG, con conseguente riduzione sia a livello epatico che ematico dei trigliceridi.

Attualmente, gli studi relativi all'interazione degli acidi grassi n-3 con LXR hanno mostrato un effetto tessuto-specifico (Pawar *et al.*, 2002). *In vitro*, ad esempio nelle cellule di rene embrionale umano *Hek 293*, i PUFA sopprimono l'espressione di SREBP-1c attraverso il legame competitivo con LXR, di conseguenza bloccano l'interazione tra l'eterodimero LXR/RXR alla sequenza LXRE nel promotore di SREBP-1c (Yoshikawa *et al.*, 2002; Ou *et al.*, 2001). Mentre studi *in vivo* sull'espressione genica epatica hanno mostrato che l'attività di LXR non è antagonizzata dai PUFA (Pawar *et al.*, 2002).

Anche HNF-4 α interagisce con gli acidi grassi e i loro metaboliti (Petrescu *et al.*, 2002). Mentre i grassi saturi attivano questo fattore di trascrizione (14:0 o 16:0), il legame con 18:3 n-3, 20:5 n-3 o 22:6 n-3 inibisce l'azione di HNF-4 α sulla trascrizione genica (Hertz *et al.*, 1998).

Tra i meccanismi indiretti invece possiamo descrivere come esempio l'interazione tra gli acidi grassi e SREBP. Trattamenti *in vitro* di MUFA o PUFA portano ad un arricchimento in membrana di fosfo e sfingolipidi legati a grassi insaturi. Questo evento promuove la redistribuzione del colesterolo dalle membrane plasmatiche al reticolo endoplasmatico. Inoltre l'attività della sfingomielinasi viene indotta, ottenendo il rilascio di ceramide, quale importante molecola di segnale (Worgall *et al.*, 2002). La conseguenza è la soppressione del processo proteolitico del precursore di SREBP nella sua forma matura e riduzione dei livelli nucleari di SREBP.

In cellule di epatoma umano, gli insaturi (AA EPA e DHA) sopprimono selettivamente i livelli del messaggero di SREBP-1c, mentre nessun effetto viene riscontrato con la somministrazione di acidi grassi saturi (SA) (Caputo *et al.*, 2010).

Il gruppo di ricerca di Deng ha riportato che la regione LXRE nel promotore di SREBP non è implicata nell'effetto soppressivo dei PUFA su SREBP. Studi a riguardo devono essere ancora approfonditi, indicando attualmente i PUFA come regolatori a *feedback* negativo di SREBP.

Enfatizzando quindi l'importante relazione tra nutrienti e meccanismi genici, il nostro laboratorio ha condotto uno studio *in vivo*, in cui si è confrontato due tipologie di diete isocaloriche, ma la cui fonte di grassi nella prima derivava dall'olio d'oliva e dall'olio di pesce, mentre nella seconda dal burro, e valutando poi l'effetto delle due diete sull'espressione genica nel tessuto epatico (Eletto *et al.*, 2005).

3.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthases

L'enzima *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase* (HMGCS) catalizza la condensazione di acetoacetil-CoA e acetil-CoA per formare HMG-CoA e CoA libero.

L'attività di HMGCS è localizzata in due differenti compartimenti cellulari, il citosol e i mitocondri, portando alla classificazione di due distinte isoforme caratterizzate da diversi ruoli fisiologici: HMGCS1, anche definita citosolica; HMGCS2, anche chiamata mitocondriale.

Nel 1975 il gruppo di studio di Lane ha caratterizzato le due isoforme (Clinkenbeard *et al.*, 1975; Reed *et al.*, 1975) come differenti entità chimiche, lasciando qualche incertezza su come un solo gene possa produrre queste due proteine che catalizzano la stessa reazione. Nel 1986, il gruppo di Goldstein e Brown ha riportato la clonazione e il sequenziamento, prima del cDNA [Gil *et al.*, 1986 a] e poi del gene [Gil *et al.*, 1986 b] del citosolico HMG-CoA sintetasi del criceto. L'esistenza di due geni è stata saldamente stabilita nel 1990, quando è stato clonato il cDNA, e poi il gene, della HMG-CoA sintasi mitocondriale di ratto [Gil-Gomez *et al.*, 1993]. Anche se la percentuale d'identità in amminoacidi tra HMGCS citosolica di criceto e quella mitocondriale di ratto era alta (65%), apparve chiaro che si trattasse dei prodotti di due geni diversi, e che essi fossero diversamente regolati. La sintasi citosolica è repressa con il digiuno e il colesterolo alimentare [Royo *et al.*, 1991]. Al contrario, la HMG-CoA sintasi mitocondriale aumenta con il digiuno.

È nella regione del promotore che si riscontrano le principali differenze tra i due geni [Gil *et al.*, 1986 b; Gil-Gomez *et al.*, 1993]. Il promotore di HMGCS1 contiene regioni SRE (Sterol Regulatory Elements) riconosciute dai fattori SREBP-1 e SREBP-2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein) [Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1993], che non sono state osservate nel promotore della sintasi mitocondriale. Sul promotore di quest'ultima è presente la zona PPRE (Peroxisome Proliferator Regulatory Element) riconosciuta da PPAR (Peroxisome Proliferator Regulatory Receptor), e non rilevato nel promotore della sintasi citosolica [Hahn & Tallar, 1987]. Queste differenze dimostrano che i due geni, seppur catalizzando la stessa reazione, sono responsabili del controllo di due diversi pathways: HMGCS citosolico è un sito di controllo della via biosintetica degli isoprenoidi; HMGCS mitocondriale è un importante sito di controllo del pathway di chetogenesi (Hegardt, 1999).

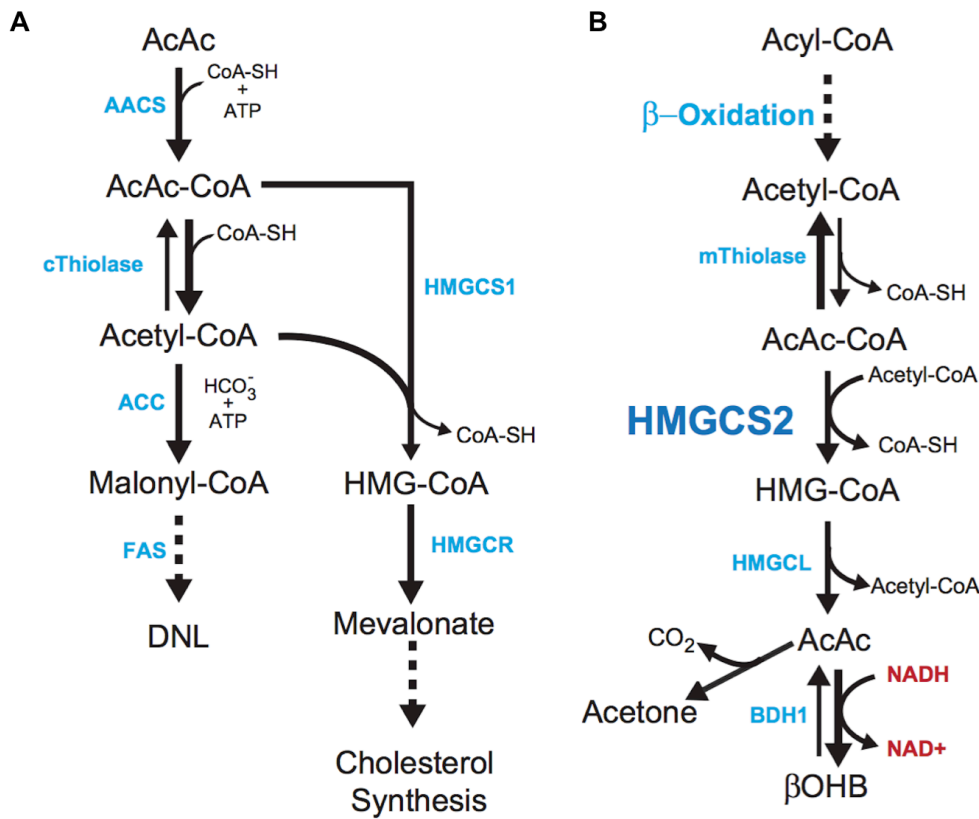


Figura 6. A) La lipogenesi *de novo* citoplasmatica e la sintesi del colesterolo sono destini metabolici non ossidativi dei corpi chetonici. **B)** La chetogenesi epatica all'interno dei mitocondri è la fonte primaria di corpi chetonici circolanti. AcAc, acetoacetate; βOHB, β-hydroxybutyrate; BDH1, βOHB dehydrogenase; AACS, acetoacetyl-CoA synthetase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; AcAc-CoA, acetoacetyl-CoA; ATP, adenosine triphosphate; CoA-SH, free coenzyme A; FAS, fatty acid synthase; HMG-CoA, 3-hydroxymethylglutaryl-CoA; HMGCL, HMG-CoA lyase; HMGCR, HMG-CoA reductase; PDH, pyruvate dehydrogenase; TCA, tricarboxylic acid; mThiolase, mitochondrial thiolase; cThiolase, cytoplasmic thiolase (Cotter *et al.*, 2013).

La proteina HMGCS1 è espressa in maniera ubiquitaria, con prevalenza nel fegato e livelli molto bassi in cuore, placenta e pancreas (Mascarò *et al.*, 1995). Questo enzima è coinvolto nel pathway dell'acido mevalonico, via metabolica che porta alla sintesi del colesterolo, ubiquinone, dolicolo, gruppo isopenteniladenosina e gruppo farnesile (Hegardt, 1999). Infatti, il composto HMG-CoA prodotto dall'enzima citosolico è trasformato in mevalonato, per azione dell'enzima *HMG-CoA reductase*. Questo rappresenta il punto di avvio del pathway degli isoprenoidi (Hegardt, 1999) (Fig. 6A).

Il sottotipo HMGCS2 è coinvolto nella sintesi dei corpi chetonici ed insieme all'enzima CPT1A (*Carnitine Palmitoyltransferase 1A*, responsabile dell'ingresso di acetyl-CoA nel mitocondrio) è uno dei suoi principali punti di regolazione (Casals *et al.*, 1992). Il composto HMG-CoA prodotto dall'enzima mitocondriale è trasformato in acetoacetato per azione dell'enzima *HMG-CoA lyase*. L'acetoacetato è poi trasformato in idrossibutirrato e acetone (corpi chetonici) (Hegardt, 1999) (Fig. 6B). L'espressione più alta di HMGCS2 si riscontra nel fegato, che, infatti, è il principale organo regolatore della sintesi dei corpi chetonici. L'isoforma mitocondriale è presente in alte quantità anche nella mucosa del colon; non ci sono evidenze sperimentali che ne spiegano il motivo, però è ipotizzato che il meccanismo di chetogenesi avvenga anche a tale livello e che a contribuire alla sintesi dei

corpi chetonici siano l'acido butirrico e l'acido propionico, prodotti dei processi di fermentazione, caratteristici di questo comparto. Modeste quantità della proteina sono state riscontrate anche a livello di cuore, muscolo scheletrico, testicoli e rene. La localizzazione di HMGCS2 a livello renale è spiegata dal fatto che quest'organo è responsabile del mantenimento dei livelli di corpi chetonici nel sangue. Il ruolo di HMGCS2 nei restanti tessuti non è ancora chiaro (Mascarò *et al.*, 1995).

3.2 Chetogenesi

La chetogenesi è il meccanismo biochimico mediante cui l'organismo in assenza di carboidrati usa gli acidi grassi per produrre energia. Tale processo, anche noto come "pathway HMG-CoA", si svolge essenzialmente nel fegato, in misura inferiore nell'intestino di mammiferi lattanti, nei reni e negli astrociti corticali al fine di proteggere il metabolismo mitocondriale dei neuroni. (Hedgardt, 1999; Martinez-Outschoorn *et al.*, 2012).

La chetogenesi prevede la sintesi di corpi chetonici a partire da acetil-CoA.

La molecola acetil-CoA, formata nel fegato in seguito alla mobilizzazione e al catabolismo degli acidi grassi, può essere ossidata nel ciclo dell'acido citrico oppure trasformata in corpi chetonici. Quest'ultimo caso si verifica quando la principale fonte energetica dell'organismo, il glucosio, scarseggia. Poiché in queste condizioni c'è la necessità di aumentare il processo di gluconeogenesi, l'acetil-CoA non può essere ossidato attraverso il ciclo di Krebs, in quanto alcuni intermedi del ciclo stesso, come l'ossalacetato, sono impiegati nella gluconeogenesi, allora l'acetil-CoA prodotto è accumulato per la chetogenesi (Fig. 7).

Piccole quantità di corpi chetonici sono prodotte durante momenti di digiuno e in caso di intensa attività fisica. In condizioni fisiologiche, la concentrazione di corpi chetonici nel sangue è poco inferiore a 3 mg/100 ml, mentre l'escrezione urinaria è circa 125 mg/24 h. I valori aumentano vertiginosamente in caso di dieta non equilibrata (ricca di grassi e proteine, ma povera di carboidrati) e in stati patologici come il diabete (Nelson *et al.*, 2000; Meertens *et al.*, 1998). In tali circostanze è necessario intervenire, perchè la produzione di corpi chetonici in quantità superiori alle capacità degli organi extraepatici di utilizzarli, potrebbe generare condizioni note come chetosi e acidosi. Si parla di chetosi quando i livelli di corpi chetonici nel sangue raggiungono concentrazioni di 90 mg/ml mentre l'escrezione urinaria diviene di 5000 mg/24 h. Invece, il termine acidosi si riferisce ai bassi valori di pH del sangue causati dall'accumulo di acetoacetato e D-β-idrossibutirrato; l'acidosi estrema porta al coma e in alcuni casi alla morte (Nelson *et al.*, 2006).

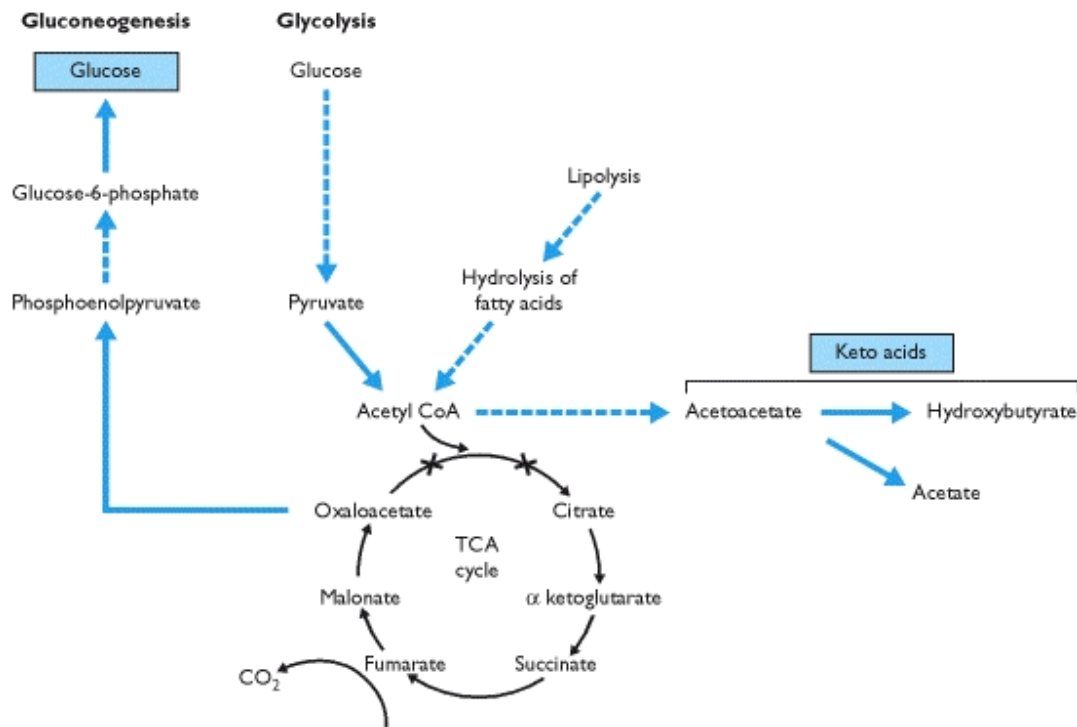


Figura 7. Vie metaboliche in cui è coinvolto l'acetil-CoA.

Le reazioni biochimiche della chetogenesi avvengono tutte a livello della matrice mitocondriale. L'enzima *thiolase* catalizza la condensazione di due molecole di acetil-CoA in acetoacetil-CoA. A partire da questo composto, mediante una reazione catalizzata da *3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2*, è sintetizzato 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Grazie all'enzima *HMG-CoA lyase* usando come substrato HMG-CoA è prodotto il primo corpo chetonico, l'acetoacetato. Dalla decarbossilazione dell'acetoacetato si ottiene l'acetone, questa reazione avviene spontaneamente o per opera dell'*acetoacetate decarboxylase*; mentre dalla riduzione dell'acetoacetato, per opera della *D-β-idrossibutyrate dehydrogenase*, si ottiene il D-β-idrossibutirrato (Fig. 8).

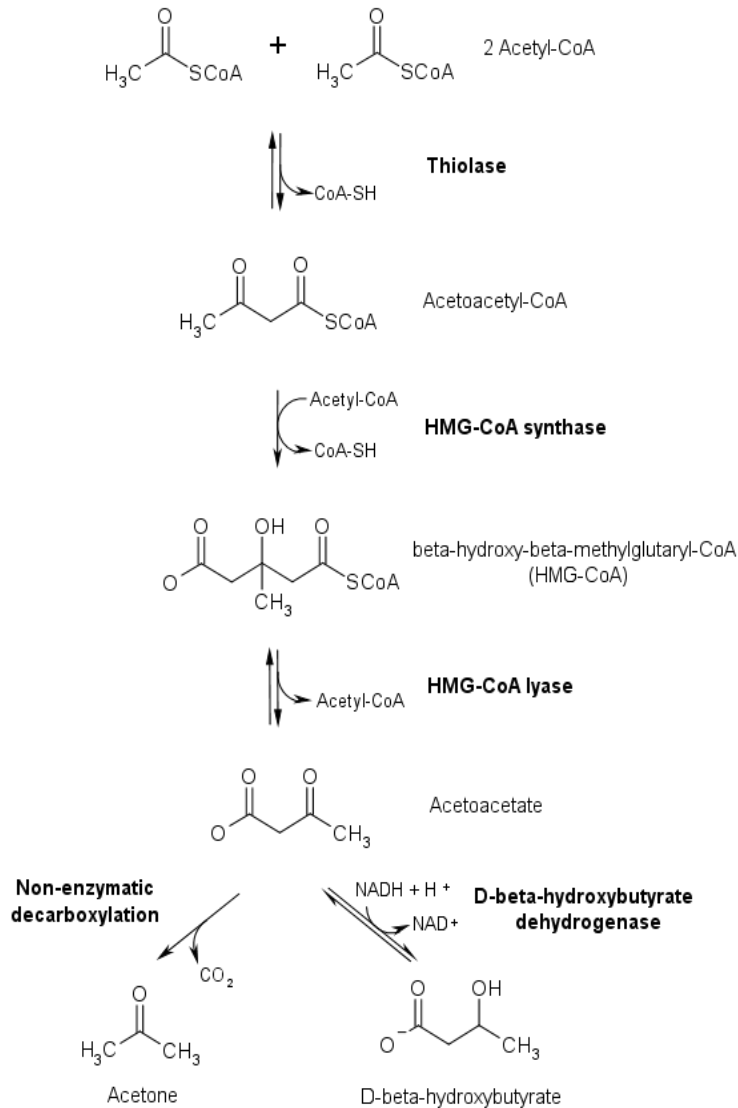


Figura 8. Formazione dei corpi chetonici dall'acetil-CoA.

Dei tre corpi chetonici, l'acetone è quello che viene prodotto in quantità più basse, si tratta di un composto volatile che viene eliminato con la respirazione; tuttavia, un'overproduzione può essere tossica per l'organismo. L'acetoacetato e il D-β-idrossibutirrato sono rilasciati nel sangue e trasportati a tessuti extraepatici. In tali siti, il D-β-idrossibutirrato è ossidato ad acetoacetato, che viene attivato mediante la formazione di un tioestere con il coenzima A, l'acetoacetyl-CoA. Quest'ultimo composto è scisso dalla *thiolase* in due molecole di acetyl-CoA, convogliate poi nel ciclo di Krebs per soddisfare le richieste energetiche. I corpi chetonici rimpiazzano il glucosio come substrato energetico di muscoli, corteccia renale e soprattutto cervello (Nelson *et al.*, 2006).

Da ricerche è emerso che cambiamenti nei livelli di chetogenesi epatica sono accompagnati da equivalenti cambiamenti nei livelli dell'espressione di HMGCS2. Da ciò si è dedotto che tale enzima costituisce il principale punto di controllo del meccanismo di

formazione dei corpi chetonici (Casals *et al.*, 1992). La sintesi di HMGCS2 è regolata dal pathway diretto da *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR).

3.3 Recettori nucleari

I recettori nucleari funzionano come fattori di trascrizione che si attivano per mezzo di ligandi specifici regolando l'espressione di geni bersaglio che agiscono in diversi processi quali riproduzione, sviluppo e metabolismo generale.

Queste proteine sono state inizialmente identificate come mediatori del segnale per gli ormoni steroidei e forniscono un importante anello di congiunzione tra la regolazione trascrizionale e fisiologica.

Oggi il genoma umano contiene 48 membri di questa famiglia di fattori di trascrizione.

La super famiglia include non solo i recettori classici endocrini che mediano l'azione degli ormoni steroidei, degli ormoni tiroidei e delle vitamine liposolubili, A e D, ma comprendono un vasto numero di recettori definiti recettori nucleari orfani (così definiti poiché il ligando endogeno al quale essi rispondono era inizialmente sconosciuto).

Recenti scoperte hanno suggerito che i classici recettori nucleari per gli ormoni, molti dei recettori orfani, funzionano come sensori dei lipidi che rispondono al contenuto di lipidi cellulare ed infine modificano l'espressione dei geni per proteggere la cellula da un sovraccarico di lipidi.

L'organizzazione strutturale dei recettori nucleari è simile, nonostante le numerose variazioni nella sensibilità del ligando.

Queste proteine sono costituite da (Fig. 9):

- una regione amino-terminale che ospita una funzione di attivazione trascrizionale (AF-1) ligando-indipendente;
- un core DNA-binding domain, che contiene due anelli, di circa 15 residui ciascuno, le cosiddette zing fingers (dita per lo zinco), il cui nodo consiste in un complesso di 4 residui di cisteina che circondano un atomo di zinco; si tratta di strutture presenti in molte proteine che regolano la trascrizione del DNA, e si ritiene che le dita si avvolgano attorno all'elica del DNA;
- una regione cardine che conferisce flessibilità alle proteine nel riconoscere simultaneamente la dimerizzazione del recettore e il DNA-binding;
- una vasta regione carbossi-terminale che comprende il dominio di legame con il ligando (ligand-binding), l'interfaccia di dimerizzazione e il ligand-dependent activation function (AF-2) (Jonker *et al.*, 2009).



Figura 9. Struttura dei recettori nucleari: funzione di attivazione 1 N-terminale (AF-1), dominio di legame al DNA (DBD) costituito da due dita di zinco (ZF), regione cerniera, dominio di legame del ligando (LBD), e C-terminale AF-2 (Jonker *et al.*, 2009).

In seguito al legame con il ligando, i recettori nucleari subiscono un cambio conformazionale che permette di separarsi dal co-repressore e facilitare l'avvolgimento delle proteine co-attivatrici così da determinare l'attivazione trascrizionale (Caruso *et al.*, 1994). Per mantenere lo stato fisiologico normale, l'attività spaziale e temporale dei

recettori nucleari deve essere controllata sia dall'espressione tessuto-specifica dei recettori che dalla disponibilità del ligando.

Possiamo classificare i recettori nucleari in due principali gruppi.

Il primo è rappresentato dai recettori nucleari classici degli ormoni steroidei. Membri di questo gruppo includono i recettori per i glucocorticoidi (GR), mineralcorticoidi (MR), estrogeni (ER), androgeni (AR) e progesterone (PR).

I recettori steroidei si legano al DNA come omodimeri ed i loro ligandi sono esclusivamente i prodotti delle ghiandole endocrine. Dopo la sintesi gli ormoni steroidei circolano nel corpo grazie ai loro tessuti bersaglio dove si legano ai loro recettori con alta affinità.

Nei vertebrati il sistema dei recettori steroidei regola una varietà di eventi metabolici cruciali ed eventi di sviluppo, includendo la differenziazione sessuale, la riproduzione, il metabolismo dei carboidrati e il bilancio elettrolitico.

Il secondo riguarda i recettori, una volta definiti orfani, che funzionano come eterodimeri con il recettore X per i retinoidi (RXR).

Al contrario dei recettori steroidei endocrini, l'attività dei recettori orfani adottati è dipendente dai livelli di lipidi assunti con la dieta. Membri di questo gruppo includono i recettori PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), LXR (liver X receptors), FXR (farnesoid X receptor), SXR/PXR (steroid and xenobiotic receptor/pregnane X receptor) e CAR (constitutive androstane receptor).

Alcuni di questi recettori, tra cui PPAR ed LXR possono funzionare come sensori per i lipidi. Il legame del ligando con ciascun recettore attiva una cascata metabolica che mantiene l'omeostasi dei lipidi controllando la trascrizione di una comune famiglia di geni coinvolti nel metabolismo, nell'immagazzinamento, nel trasporto e nell'eliminazione dei lipidi.

3.3.1 PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor): sensore degli acidi grassi

I PPAR costituiscono una classe di recettori nucleari regolati da specifici ligandi che modulano l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico e glucidico, ed interagiscono con i recettori LXR e RXR. Giocano ruoli essenziali nel regolare la differenziazione cellulare, lo sviluppo, il metabolismo e la carcinogenesi degli organismi superiori. (Zhang *et al.*, 2012).

Sono stati identificati tre sottotipi del recettore nucleare: PPAR α , PPAR β e PPAR γ codificati da geni distinti (Fruchart, 2013).

Sebbene la sequenza del dominio di legame al ligando delle isoforme mostri il 60-70% di similarità, esse si differenziano per organizzazione, distribuzione e funzione.

- PPAR α è espresso in tessuti con metabolismo attivo come fegato, tessuto adiposo bruno, rene, cuore e muscolo scheletrico. È implicato nella regolazione del metabolismo dei lipidi, nell'omeostasi energetica e nel processo infiammatorio.

- PPAR β (anche nota come PPAR δ) è abbondantemente distribuito in diversi tessuti, controlla le concentrazioni lipidiche nel sangue e la sensibilità all'insulina. In pazienti con diabete di tipo 2, tale isoforma diminuisce la resistenza all'insulina e decrementa la quantità di glucosio nel sangue.

- PPAR γ è prevalentemente espresso in tessuto adiposo, muscolo liscio vascolare e macrofagi. Il recettore può aumentare la differenziazione delle cellule adipose e contribuisce all'omeostasi del glucosio, infatti, aumenta la sensibilità all'insulina nel muscolo scheletrico e nel fegato (Zhang *et al.*, 2012).

I recettori nucleari PPARs sono attivati da ligandi endogeni (prostaglandine, leucotrieni, acidi grassi) oppure da agonisti sintetici (glitazoni e fibrati) e formano eterodimeri con RXR. Una volta attivato, il complesso eterodimerico subisce un

cambiamento conformazionale che porta alla transrepressione o alla transattivazione di geni target (Fig. 10). Un esempio di meccanismo di transrepressione è dato dal legame del recettore ai fattori trascrizionali coinvolti nei processi infiammatori come *Activator Protein-1* (AP-1). Nel processo di transattivazione, PPAR lega una regione sul promotore del gene target definita “elemento di risposta al recettore nucleare (NNRE)” o più comunemente nota come “elemento di risposta a PPAR (PPRE)” e un cofattore attiva il complesso così formato dando inizio alla trascrizione.

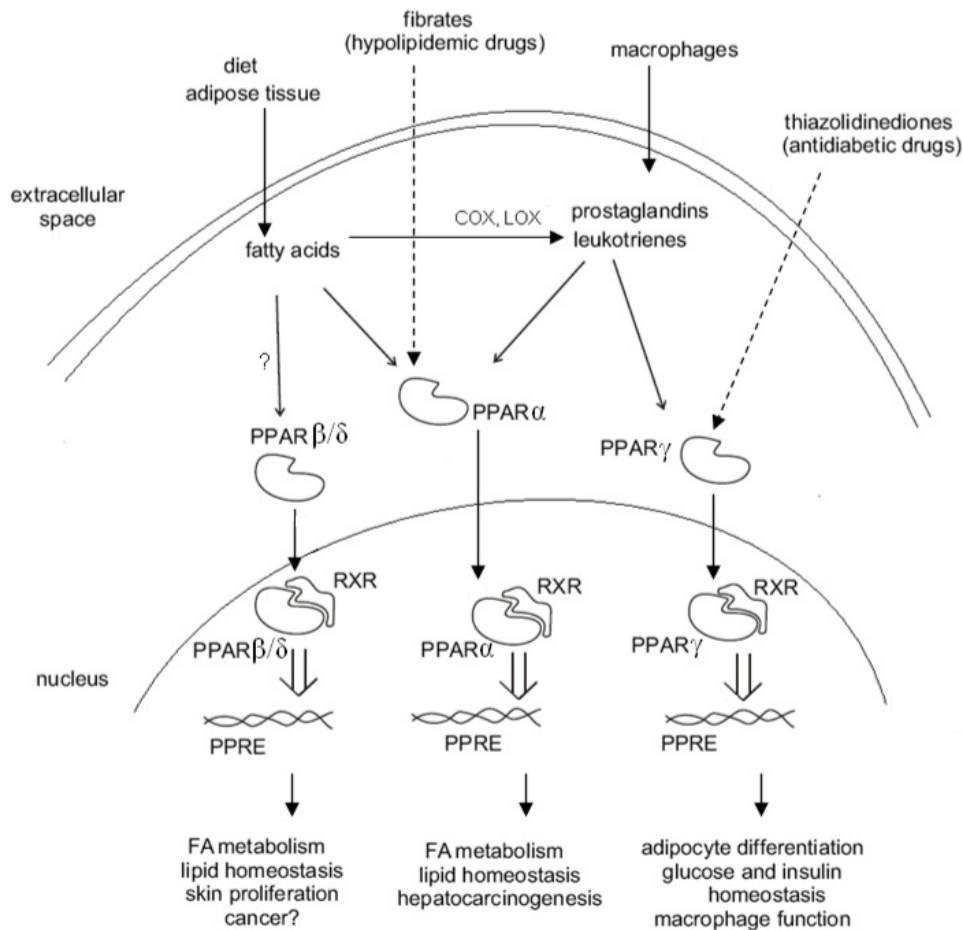


Figura 10. Meccanismo d'azione dei recettori PPAR. COX, ciclossigenasi; LOX, lipossigenasi (Kremmyda *et al.*, 2011).

Una delle peculiarità dei recettori PPAR è la capacità della loro tasca di legame al ligando di avvolgere un gran numero di sostanze. Essa fornisce una varietà di potenziali punti di contatto, che occupati determinano cambiamenti conformazionali del recettore; di conseguenza ciascuna isoforma PPAR può indurre un enorme range di effetti biologici in base all'agonista legato (Fig. 10). Il numero di possibili effetti è incrementato se si considera che la concentrazione dei ligandi e la loro affinità al recettore varia tra i diversi tessuti, organi e individui. Inoltre, c'è la possibilità per un ligando di agire come agonista pieno in un tessuto che ha sufficienti quantità di cofattore e come agonista parziale in un tessuto con quantità di cofattore più basse (Fruchart, 2013).

3.3.1.1 Isoforma PPAR α

Il gene che codifica per PPAR α si trova sul braccio lungo del cromosoma 22.

Tale recettore regola l'espressione di proteine coinvolte nel metabolismo lipidico extracellulare, ossidazione degli acidi grassi, infiammazione e chetogenesi. I principali target di PPAR α sono *Carnitine Palmitoyltransferase 1* (CPT1A) impegnato nell'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi a lunga catena (Vilà-Brau *et al.*, 2011); geni che si occupano della formazione e assemblaggio di lipoproteine come *Apolipoprotein A1*, *Apolipoprotein A2* e *Apolipoprotein A-V*; il gene HMGCS2 responsabile della formazione dei corpi chetonici (Hsu *et al.*, 2001; Fruchart, 2013). Tra i geni target di PPAR α rientrano anche fattori di trascrizione responsabili della formazione di molecole coinvolte nel processo infiammatorio vascolare, come *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B), in tal caso però l'azione del recettore è di tipo inibitoria (Fruchart *et al.*, 2013).

Il principale stimolo fisiologico di PPAR α è il digiuno, in questa condizione dal tessuto adiposo vengono liberati acidi grassi che, giunti nel fegato, fungono da ligandi dell'isoforma α . L'attivazione del recettore contribuisce così al rifornimento energetico degli organi mediante l'ossidazione degli acidi grassi e la formazione dei corpi chetonici (Miyazaki *et al.*, 2004).

Comune è l'uso clinico di agonisti sintetici di PPAR α , questi diminuiscono la concentrazione plasmatica di lipoproteine ricche in trigliceridi, aumentano i livelli di HDL, favoriscono la stabilità delle placche aterosclerotiche e riducono l'accumulo di grasso epatico. Quindi l'attività di PPAR α aiuta a regolare il peso corporeo ed è oggi considerato un target anti-obesità. Sono usati, a fini terapeutici, agonisti doppi PPAR α/γ oppure PPAR α/δ per il contemporaneo trattamento di una serie di sbilanci cardiometabolici (Zhang *et al.*, 2012; Fruchart, 2013).

3.4 Isoforma 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2

3.4.1 Aspetti molecolari dell'enzima

Nell'uomo, il gene che codifica per HMGCS2 si trova sul braccio corto del cromosoma 1, ha una lunghezza di circa 25 kb e contiene 10 esoni (Boukaftane & Mitchell, 1997). La proteina codificata da esso è formata da 508 amminoacidi (Mascarò *et al.*, 1995).

Come anticipato nel paragrafo 3.1, l'attività trascrizionale di HMGCS2 è conseguente al legame del complesso PPAR α -RXR all'elemento di risposta al recettore nucleare presente sul promotore dell'enzima (NNRE).

Esperimenti di immunofluorescenza hanno evidenziato che HMGCS2 autoregola la propria trascrizione nucleare; ovvero, l'enzima modula, a sua volta, l'attività di PPAR α e l'instaurarsi di questo feedback positivo determina la sintesi di nuove proteine HMGCS2. Infatti, la sintasi mitocondriale pur essendo localizzata nei mitocondri, in presenza di PPAR α si accumula in parte a livello nucleare, entra in relazione con il complesso recettoriale e ne stimola l'azione. Non si conosce il meccanismo che permette ad una proteina avente una sequenza segnale mitocondriale di raggiungere un altro comparto, però studi dimostrano che a mediare l'interazione tra la HMGCS2 e PPAR α è il motivo LXXLL presente sull'enzima. Tale regione non è una caratteristica esclusiva della sintasi mitocondriale, infatti, sono state identificate una o più copie della sequenza nei cofattori di recettori nucleari: *Steroid Receptor Coactivator 1* (SRC-1), *CREB Binding Protein* (CBP) e *Receptor-Interacting Protein 140* (RIP-140). Si ipotizza che una seconda caratteristica, in grado di favorire l'interazione tra PPAR α e HMGCS2, sia l'attività acetiltransferasica di quest'ultima. Ad avvalorare questa ipotesi è il fatto che diversi coattivatori di recettori nucleari sono acetilati e agiscono come acetiltransferasi. Il fine del feedback positivo in cui

HMGCS2 è coinvolto è quello di incrementare la propria espressione in risposta alle condizioni metaboliche e fisiologiche che richiedono un aumento della formazione di corpi chetonici (Meertens *et al.*, 1998).

Si esclude la possibilità che HMGCS2 agisca da cofattore di PPAR α per favorire l'espressione degli altri geni target del recettore (Vilà-Brau *et al.*, 2011).

PPAR α non è l'unico recettore nucleare in grado di influenzare l'attività di HMGCS2, oltre ad esso ci sono: *COUP Transcription Factor* (COUP-TF) ed *Hepatocyte Nuclear Factor 4* (HNF-4). Il recettore COUP-TF può avere un duplice ruolo sull'espressione di HMGCS2, ovvero, da un lato può attivare la trascrizione del gene, legando la regione del promotore GC box, attraverso l'interazione con il fattore Sp1; dall'altro, può competere con PPAR α -RXR per il legame a NRRE, in tal caso impedisce l'attività trascrizionale dell'eterodimero ed assume una funzione inibente. Anche il recettore HNF-4 reprime i livelli d'espressione della sintasi mitocondriale attraverso la competizione con l'eterodimero PPAR-RXR per il legame al promotore dell'enzima (Fig. 11). Il recettore PPAR α e i suoi antagonisti COUP-TF e HNF-4 lavorano come sensori lipostatici che mediano il livello trascrizionale di enzimi coinvolti nel catabolismo degli acidi grassi e nella chetogenesi (Hegardt, 1999).

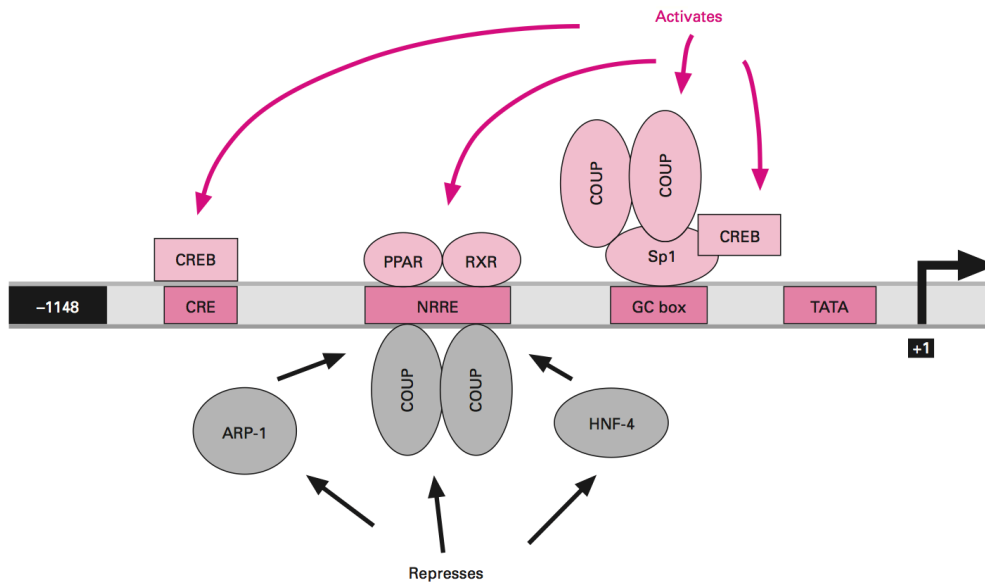


Figura 11. Promotore di HMGCS2. I fattori di trascrizione PPAR, RXR, Sp1 e CREB legano il promotore della sintasi mitocondriale in siti diversi, attivandone la trascrizione. Altri fattori di trascrizione, come HNF-4 e ARP-1, ne reprimono la trascrizione competendo con l'eterodimero PPAR-RXR al sito NRRE. COUP-TF può attivare o reprimere la trascrizione, dipendentemente dal sito di legame e dal tessuto (Hegardt, 1999).

3.4.2 Fibroblast Growth Factor 21

Il gruppo di lavoro di Vilà-Brau ha dimostrato che l'enzima HMGCS2 è in grado di stimolare l'espressione del gene *Fibroblast Growth Factor 21* (FGF21), mediante un meccanismo SirT1-dipendente. FGF21 è una molecola di signaling indotta in stato chetonico, mentre la proteina SirT1 è una deacetilasi NAD⁺ dipendente, la cui delezione a livello epatico altera il pathway diretto da PPAR α , soprattutto l'induzione di FGF21. E' stato visto come sia proprio l'attività di HMGCS2, attraverso la generazione di acetoacetato, a

modulare SirT1 e, di conseguenza, ad operare un'influenza sull'attività di FGF21. Infatti, in seguito all'overespressione della sintasi mitocondriale si registrano elevati livelli di FGF21, mentre una down-regolazione di HMGCS2 comporta una riduzione dei livelli della molecola di signaling, a prescindere dalla presenza o meno di PPAR α . Anche se HMGCS2 influenza FGF21, gli altri geni target di PPAR α rimangono invariati (Vilà-Brau *et al.*, 2011).

3.5 Fattori in grado di regolare l'espressione di HMGCS2

L'espressione di HMGCS2 è altamente regolata, sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale. Le quantità di proteina presenti sono influenzate da nutrienti, sostanze endogene, inclusi ormoni circolanti, e fattori coinvolti nello sviluppo, ad esempio l'espressione è maggiore durante il periodo neonatale (Boukaftane *et al.*, 1997) (Fig.12).

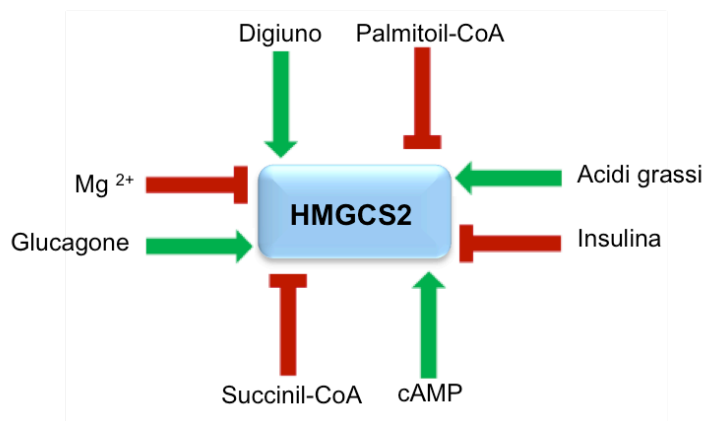


Figura 12. Fattori che influenzano l'espressione di HMGCS2.

3.5.1 Nutrienti

- La mancata assunzione di alimenti, quindi una condizione di **digiuno**, favorisce l'espressione dell'isoforma mitocondriale mentre reprime la sintesi di quella citosolica. (Hegardt *et al.*, 1999).

- Gli **acidi grassi** inducono la trascrizione del gene HMGCS2 (Rodriguez *et al.*, 1994). Da studi è emerso che per la scarsa solubilità in acqua, il passaggio di queste sostanze al nucleo è coadiuvato da *Fatty Acid Binding Proteins* (FABPs) (Benjamin *et al.*, 2013; Velkov, 2013). Le FABPs appartengono alla classe delle *ligand binding protein* (LBP) le quali sono proteine tessuto specifiche che costituiscono un elegante meccanismo di controllo del flusso di ligandi ai recettori nucleari. Le FABPs hanno massa molecolare di circa 15 kDa, sono shuttles presenti nel fegato e nell'intestino che legano gli acidi grassi con alta affinità, promuovono la loro interazione con il ligand binding domain di PPAR α e favoriscono così l'attività trascrizionale del recettore (Velkov, 2013).

3.5.2 Sostanze endogene

- Il **magnesio (Mg²⁺)** ha attività inibitoria su HMGCS2, mentre la sintesi di HMGCS1 è promossa dal catione (Hegardt *et al.*, 1999).

- Il **palmitoil-CoA** inibisce l'attività dell'isoforma mitocondriale con una K_i di 0.5 μ M (K_i è una costante di inibizione ed identifica l'equilibrio dell'inibitore "i" con l'enzima libero) (Hegardt *et al.*, 1999).

- Il **succinil-CoA** regola l'attività dell'enzima, non solo inibendone l'espressione del 50% ad una concentrazione 0.2 mM, ma è anche l'unico tioestere in grado di inattivare la proteina servendosi di una modificazione covalente, ovvero, una succinilazione. Poiché c'è una correlazione negativa tra l'attività di HMGCS2 e il contenuto di succinil-CoA nei mitocondri, sostanze endogene in grado di modulare le quantità di questo tioestere influenzano anche l'attività della sintasi mitocondriale. Ad esempio, il glucagone abbassa il contenuto di succinil-CoA nei mitocondri del fegato, quindi favorisce l'attività di HMGCS2 e di conseguenza la formazione dei corpi chetonici. Lo stesso accade in presenza di acetyl-CoA che realizza una desuccinilazione spontanea. Invece il 2-ossoglutarato favorendo le quantità di succinil-CoA nel mitocondrio, riduce l'espressione di HMGCS2 (Hegardt *et al.*, 1999).

- L'**AMP ciclico** favorisce l'espressione di HMGCS2. Questo nucleotide ciclico è indispensabile per l'attività di una chinasi che fosforila la proteina CREB. Il fattore trascrizionale CREB a sua volta lega il promotore dell'isoforma mitocondriale e ne promuove la trascrizione (Hegardt *et al.*, 1999).

- In presenza di **insulina** diminuiscono i livelli di HMGCS2. Quest'ormone influenza l'espressione del gene per la sintasi mitocondriale in tre modi: diminuisce la sensibilità di AMP ciclico alla chinasi, attiva la fosfoenolpiruvato carbossichinasi che è un enzima inibitore della trascrizione di HMGCS2 e infine favorisce il meccanismo di succinilazione (Casals *et al.*, 1992).

- Il **glucagone**, per contro, induce la trascrizione di HMGCS2 attraverso attivazione di cAMP (Hegardt *et al.*, 1999).

3.6 Ruolo di HMGCS2 nella genesi e nello sviluppo di patologie

Riguardo all'influenza che i corpi chetonici hanno sul processo di carcinogenesi ci sono ancora punti non chiari. Ricerche condotte dal gruppo di Martinez-Outschoorn dimostrano che la produzione di corpi chetonici e la loro riutilizzazione possono determinare crescita tumorale e metastasi. Dall'analisi di fibroblasti resi chetogenici per overespressione di HMGCS2 e di *D-beta-Hydroxybutyrate Dehydrogenase* (BHD1), è emerso che i corpi chetonici prodotti da queste cellule sono in grado di migrare nel vicino tessuto tumorale mammario favorendone l'espansione. Questo studio ha posto le basi ad una potenziale terapia anti-cancro avente come protagonisti HMGCS2 ed altri enzimi responsabili delle tappe di chetogenesi (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2012).

Al contrario da uno studio del gruppo di Camarero si evince che nel cancro al colon l'overespressione di HMGCS2 potrebbe inibire l'espansione tumorale. E' stato osservato che un ruolo di primo piano nello sviluppo della massa tumorale in questo tratto intestinale è svolto da Myc. Tra le attività, che il fattore trascrizionale Myc svolge in tale contesto, c'è la down-regolazione di HMGCS2. Ci sono quindi i presupposti per pensare che l'attività di HMGCS2 e, di conseguenza, la produzione di corpi chetonici potrebbero ostacolare la carcinogenesi a livello del colon (Camarero *et al.*, 2006).

La proteina HMGCS2 è anche coinvolta nello sviluppo di complicanze nei soggetti diabetici. In tali individui a causa di carenze di insulina è favorita l'espressione della sintasi mitocondriale e quindi il processo di chetogenesi. In particolare, nel 20-40% di pazienti con diabete di tipo 2 si riscontra una notevole produzione di corpi chetonici a livello renale, sito in cui, in condizioni fisiologiche, la presenza dell'enzima è molto bassa. Il rene diventa un organo chetogenico, la maggior parte dei corpi chetonici si accumula a livello del tubulo prossimale, dove si manifestano: l'induzione di TGF-1, overespressione di collagene I e transizione del tessuto da epiteliale a mesenchimale, fenomeni che determinano fibrosi del tessuto. L'insieme di questi cambiamenti che colpiscono l'organo, causa una disfunzione renale nota come nefropatia diabetica (Fig. 13). Quindi, HMGCS2 potrebbe rappresentare un eventuale target terapeutico per la cura delle complicanze renali (Zhang *et al.*, 2011).

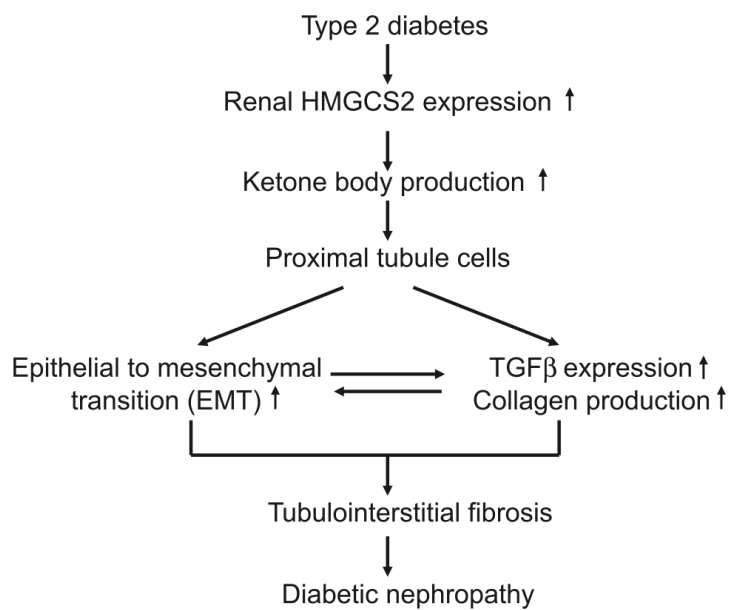


Figura 13. Illustrazione dei meccanismi coinvolti nell'aumento di chetogenesi renale e corpi chetonici associati a rene diabetico in topi (Zhang *et al.*, 2011).

Obiettivi del progetto

La composizione del siero è il risultato di un complesso metabolismo sia di molecole endogene che derivanti dalla dieta e l'insieme di questi fattori potrebbe contribuire sinergicamente alla modulazione genica, influenzando in maniera diretta sia condizioni fisiologiche che patologiche.

Infatti, le abitudini alimentari, con particolare riferimento all'eccesso lipidico e all'apporto energetico, sono strettamente correlate all'incidenza di patologie ad ampia diffusione quali obesità, diabete, malattie cardiovascolari, steatosi epatica e patologie neoplastiche. Inoltre, vari studi hanno proposto un ruolo determinante per i livelli ematici di acidi grassi polinsaturi (PUFA) come biomarkers di riferimento clinico insieme al colesterolo (Caggiula & Mustak, 1997; Crowe *et al.*, 2006). Definire il ruolo degli acidi grassi derivanti dall'alimentazione nella patogenesi di malattie risulta, tuttavia, complicato in quanto questi nutrienti sono coinvolti in differenti funzioni fisiologiche (formazione di membrane, metabolismo energetico, segnalazione cellulare), e sono in grado di modulare l'espressione di un gran numero di geni (Eletto *et al.*, 2005; Knoch *et al.*, 2010).

I dati descritti in precedenza nel nostro laboratorio hanno messo a confronto gli effetti sull'espressione genica di campioni di siero provenienti da soggetti di sesso maschile ipercolesterolemici e normocolesterolemici. I pazienti sono stati discriminati sulla base dei rispettivi livelli di colesterolo nel siero e, dal momento che nessun altro sintomo patologico era presente, lo stato nutrizionale è stato assunto come la principale causa dei diversi effetti osservati tra i due gruppi. I sieri ipercolesterolemici e normocolesterolemici hanno mostrato diversi profili lipidici, e la loro aggiunta diretta al terreno di coltura in cellule di epatoma umano HepG2 ha influenzato l'espressione genica. Le cellule trattate con sieri ipercolesterolemici hanno mostrato livelli di espressione ridotti dell'mRNA di SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein 1c), e aumentati di UGT1A1 (UDP-glucuronosyltransferase 1A1), rispetto alle cellule trattate con sieri normocolesterolemici (Zirpoli *et al.*, 2012). Mentre questi mRNA sono stati scelti sulla base delle precedenti informazioni, nel presente studio è stato valutato l'effetto di questi sieri sull'intero genoma, con l'obiettivo di individuare i più rilevanti mRNA regolati dall'apporto nutrizionale senza geni candidati. Gli mRNA selezionati sono stati poi rapportati al profilo lipidico sierico, sia nella frazione colesterolemica che in acidi grassi, con lo scopo di identificare pathways metabolici regolati da nutrienti.

5.1 Identificazione di geni differenzialmente espressi in cellule HepG2 trattate con differenti sieri umani

Sono stati analizzati mediante tecnica di DNA microarray gli RNA isolati da cellule di epatoma umano, HepG2, trattate ed incubate, nello studio precedente (Zirpoli *et al.*, 2012), con i singoli sieri umani. Tali studi sono stati condotti utilizzando campioni di siero, provenienti da soggetti sani di sesso maschile, caratterizzati per profilo in acidi grassi (sia i principali derivati dalla dieta che quelli metabolicamente sintetizzati), e classificati in due gruppi: normocolesterolemico vs ipercolesterolemico. Si è potuto, quindi, considerare lo stato nutrizionale come causa principale di differenza tra i due gruppi (Zirpoli *et al.*, 2012). Le cellule sono state trattate con 32 sieri, sedici ipercolesterolemici e sedici normocolesterolemici. Per minimizzare l'effetto di variabilità in coltura cellulare, gli RNA ottenuti sono stati uniti in otto gruppi: ogni gruppo è stato costituito dagli RNA relativi ai trattamenti con quattro differenti sieri, ottenendo, quindi, quattro gruppi per i sieri ipercolesterolemici e quattro gruppi per i sieri normocolesterolemici. Le tabelle 1 e 2 riportano la lista di mRNA risultanti come down- o up-regolati in seguito ad analisi dei dati di microarray con il software del produttore. In ogni tabella, per ogni mRNA differenzialmente espresso, è riportato il simbolo del gene (Gene Symbol), il numero di accesso GeneBank e il fold change differenziale. Questo numero risulta da un algoritmo che normalizza i segnali di espressione all'interno dei singoli microarray e valuta la variabilità tra i replicati tecnici. È stata analizzata la differenza di espressione considerando un fold change pari a ± 1.5 come minimo rilevante. I dati provenienti dai trattamenti con i sieri normocolesterolemici sono stati utilizzati come controllo. Pertanto, le riduzioni dei livelli di trascritti nei trattamenti con i sieri ipercolesterolemici sono stati indicati con numeri negativi, e l'aumento dei livelli di trascritti con numeri positivi. I valori derivano dalla media del confronto tra ogni gruppo normocolesterolemico con tutti i gruppi ipercolesterolemici. Gli mRNA riportati nelle tabelle 1 e 2 sono quelli con i più alti valori differenziali negativi e positivi.

Gene Symbol	GENEBANK accession n.	Gene Name	Fold Change
Cyr61	NM_001554.3	Homo sapiens cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (cyr61), mRNA.	-2,11
GDF15	NM_004864.1	Homo sapiens growth differentiation factor 15 (GDF15), mRNA.	-1,90
ApoM	NM_019101.2	Homo sapiens apolipoprotein M (ApoM), mRNA.	-1,80
LOC441019	XM_498969.2	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC441019 (LOC441019), mRNA.	-1,54
MT2A	NM_005953.2	Homo sapiens metallothionein 2A (MT2A), mRNA.	-1,51
EMP3	NM_001425.1	Homo sapiens epithelial membrane protein 3 (EMP3), mRNA.	-1,50
NES	NM_006617.1	Homo sapiens nestin (NES), mRNA.	-1,50

Tabella 1. Specie di mRNA down-regolate nel confronto, mediante DNA microarray, tra RNA totale estratto da cellule in coltura trattate con i sieri ipercolesterolemici contro gli RNA estratti da cellule trattate con i sieri normocolesterolemici.

Gene Symbol	GENEBANK accession n.	Gene Name	Fold Change
LEAP2	NM_052971.2	Homo sapiens liver expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2), mRNA.	1,78
GSTA1	NM_145740.3	Homo sapiens glutathione S-transferase alpha 1 (GSTA1), mRNA.	1,58
HMGCS2	NM_005518.2	Homo sapiens 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial) (HMGCS2), nuclear gene encoding.	1,58
LOC647169	XM_930196.1	PREDICTED: Homo sapiens similar to glutathione S-transferase alpha 3 (LOC647169), mRNA.	1,58
UGT2A3	NM_024743.2	Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 2 family, polipeptide A3 (UGT2A3), mRNA.	1,58
GSTA2	NM_000846.4	Homo sapiens glutathione S-transferase alpha 2 (GSTA2), mRNA.	1,52
ADH1	NM_000667.2	Homo sapiens alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide (ADH1A), mRNA.	1,51
ELOVL2	NM_017770.2	Homo sapiens elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2,SUR4/Elo3, yeast)-like 2 (ELOVL2), mRNA	1,50
MTTP	NM_000253.1	Homo sapiens microsomal triglyceride transfer protein (MTTP), mRNA	1,48

Tabella 2. Specie di mRNA up-regolate nel confronto, mediante DNA microarray, tra RNA totale estratto da cellule in coltura trattate con i sieri ipercolesterolemici contro gli RNA estratti da cellule trattate con i sieri normocolesterolemici.

5.2 Quantificazione degli mRNA differenzialmente espressi mediante Real Time-PCR

Per confermare l'espressione differenziale osservata con i microarray, le specie di mRNA selezionate sono state anche analizzate mediante Real Time-PCR. Dieci mRNA differenziali sono stati scelti per ulteriori analisi sulla base del loro alto valore di fold change e del loro possibile ruolo biologico in effetti nutrizionali. Ogni mRNA è stato testato all'interno di due gruppi finali di RNA estratti dalle cellule trattate con i campioni di siero ipercolesterolemico e normocolesterolemico.

La figura 14 mostra una significativa up-regolazione dei livelli degli mRNA di *glutathione S-transferase alpha 1* (GSTA1), *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymeA synthase 2* (HMGCS2) e *alcohol dehydrogenase 1A* (ADH1A) in cellule trattate con i sieri ipercolesterolemici verso quelle trattate con i sieri normocolesterolemici. Inoltre, la Fig. 14 mostra significative up-regolazioni dei livelli di espressione degli mRNA di *liver expressed antimicrobial peptide 2* (LEAP2), *UDP glucuronosyltransferase 2A3* (UGT2A3), *elongation of very long chain fatty acids 2* (ELOVL2) e *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP) e down-regolazione dei livelli degli mRNA di *cysteine-rich angiogenic inducer 61* (Cyr61), *growth differentiation factor 15* (GDF15) e *apolipoprotein M* (ApoM). Questi dati confermano le regolazioni osservate dall'analisi microarray.

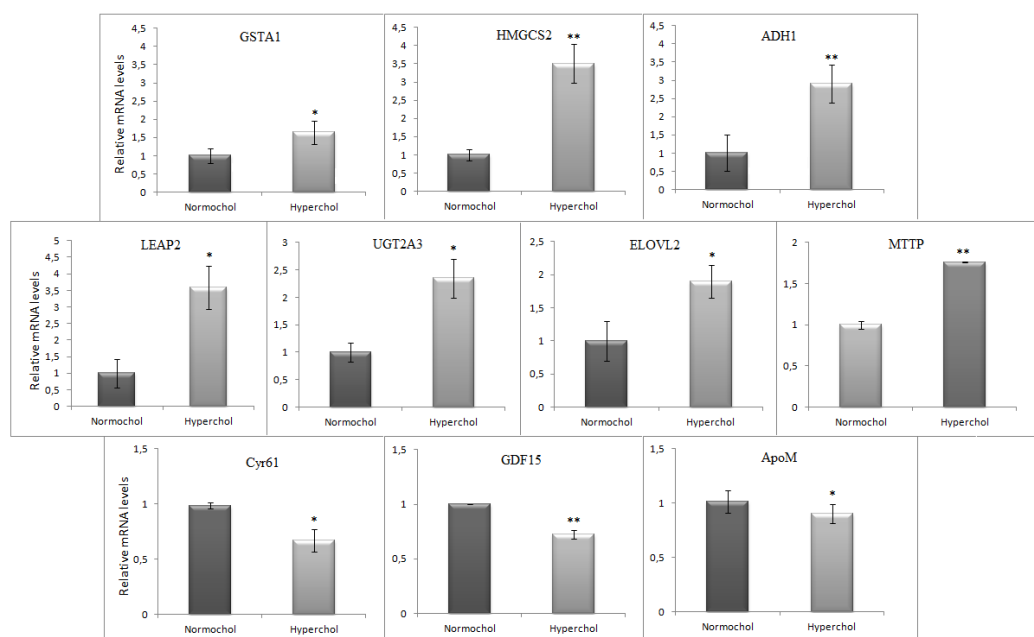


Figura 14. Quantificazione mediante Real Time-PCR degli mRNA differenzialmente espressi in cellule HepG2. Sono stati analizzati i livelli di mRNA di GSTA1, HMGCS2, ADH1, LEAP2, UGT2A3, ELOVL2, MTTP, Cyr61, GDF15 e ApoM, e i livelli relativi di mRNA sono stati determinati calcolando il rapporto tra i valori provenienti dalle cellule trattate con i sieri ipercolesterolemici rispetto a quelli provenienti dalle cellule trattate con i sieri normocolesterolemici. I dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

5.3 Valutazione degli effetti degli acidi grassi e del 22(R)-idrossicolesterolo sull'espressione genica

I campioni di siero utilizzati in questo studio sono stati precedentemente caratterizzati per i loro livelli di acidi grassi e i dati hanno mostrato una maggiore concentrazione di PUFA, DHA, EPA e AA, nei campioni di siero ipercolesterolemico, anche se in percentuale di acidi grassi il DHA è maggiore all'interno dei campioni normocolesterolemici (Zirpoli *et al.*, 2012). Per valutare se le espressioni differenziali ottenute dai due gruppi potessero essere correlate a componenti propri del siero e, più specificamente, agli acidi grassi, sono stati saggiati gli effetti di diversi PUFA sui geni selezionati. Cellule HepG2 sono state trattate con DHA, EPA, AA e anche con un acido grasso saturo, l'acido stearico (SA), 50 μ M per 16 h. Le cellule sono state anche trattate con 22(R)-idrossicolesterolo (22R-HC), un analogo solubile del colesterolo (Midzak *et al.*, 2011), per valutare anche il ruolo di questo nutriente e componente sierico su geni selezionati.

La figura 15A mostra i livelli di mRNA di HMGCS2 ottenuti da analisi di Real Time-PCR. L'espressione è risultata significativamente aumentata dopo trattamento con i PUFA rispetto al controllo, mentre SA e 22R-HC non hanno influenzato tale espressione genica. Un effetto simile è stato osservato per GSTA1 (Fig. 15B), poiché il livello di mRNA è risultato significativamente aumentato dopo il trattamento con i PUFA, mentre SA e 22R-HC non hanno avuto alcun effetto. La figura 15C mostra anche l'effetto dei PUFA sui livelli di mRNA di ApoM. In questo caso, l'effetto degli acidi grassi polinsaturi è stato quello di ridurre leggermente il livello di mRNA, mentre l'acido grasso saturo e il 22R-HC non hanno

influenzato tale espressione genica. Abbiamo confermato che la somministrazione di PUFA ha indotto le stesse regolazioni geniche ottenute dal trattamento con i sieri ipercolesterolemici.

Il trattamento con i PUFA ha ridotto i livelli di espressione dell'mRNA di LEAP2 (Fig. 15D), mentre SA e 22R-HC non hanno avuto alcun effetto. Per questo gene i PUFA hanno mostrato un'azione opposta rispetto a quella osservata in seguito al trattamento con i sieri ipercolesterolemici, che hanno aumentato il livello di mRNA di LEAP2.

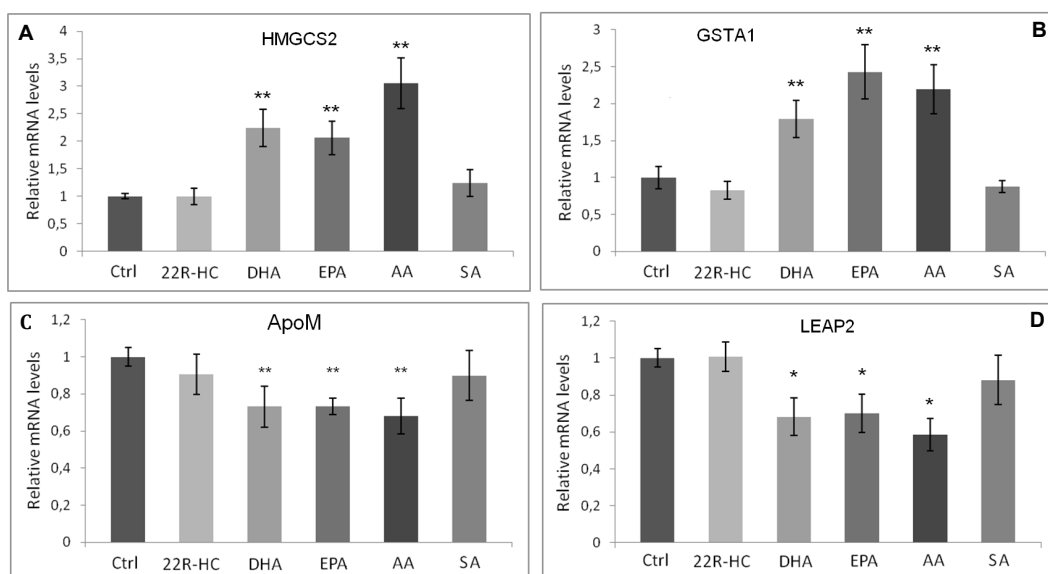


Figura 15. I PUFA modulano i livelli di espressione dell'mRNA di HMGCS2 (A), GSTA1 (B), ApoM (C) e LEAP2 (D). Le cellule HepG2 sono state trattate con DHA, EPA, AA e SA 50 μ M per 16h ed anche con 22R-HC 25 μ M per 48h. Dopo i trattamenti, gli mRNA sono stati estratti e analizzati mediante Real Time-PCR. I livelli relativi di mRNA sono stati determinati calcolando il rapporto tra i segnali normalizzati di trattamento e controllo. I dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

PUFA, SA e 22R-HC non hanno influenzato in modo significativo i livelli di espressione degli mRNA di ADH1, UGT2A3, ELOVL2, MTTP, Cyr61 e GDF15, che sono stati anche selezionati tra i geni più regolati tra i due gruppi sierici (dati non riportati).

HMGCS2 è un enzima mitocondriale che catalizza la prima reazione chetogenesi, producendo HMG-CoA da acetil-CoA e acetoacetile-CoA (Vilà-Brau *et al.*, 2011), fornendo energia derivata dai lipidi durante il digiuno. HMGCS2 è trascrizionalmente regolato da PPAR α (Liu *et al.*, 2008; Rakhshandehroo *et al.*, 2009) e questo recettore nucleare potrebbe essere cruciale per la regolazione operata dai PUFA (Nakamura *et al.*, 2004). GSTA1 agisce nella detossificazione di composti elettrofili dal glutatione, tra cui sostanze cancerogene, farmaci, tossine e prodotti di stress ossidativo (Morel *et al.*, 1994; Salinas & Wong, 1999). ApoM è associata a diverse lipoproteine ed è coinvolto nel trasporto dei lipidi (Dahlbäck & Nielsen, 2006). La sua espressione è regolata da fattori di trascrizione che controllano il metabolismo lipidico epatico come *Hepatic Nuclear Factor 1 α* (HNF 1 α), *Liver Receptor Homolog 1* (LRH 1) e *Forkhead box A2* (Foxa2) (Mosialou *et al.*, 2010; Wolfrum *et al.*, 2008). LEAP2 come peptide antimicrobico rientra nel sistema immunitario innato dei vertebrati.

5.4 Ruolo di PPAR α nella regolazione di HMGCS2 e coinvolgimento di FoxO1

5.4.1 Effetto dell'antagonista di PPAR α (GW6471) e dell'agonista di PPAR α (WY14643) sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2

Considerando l'importante ruolo metabolico di HMGCS2, per ottenere ulteriori dettagli sul suo meccanismo di regolazione, è stato analizzato l'effetto di GW6471, un antagonista sintetico di PPAR α , e di WY14643, un agonista sintetico di PPAR α . Infatti, numerosi studi dimostrano che HMGCS2 è un gene bersaglio PPAR α (Liu *et al.*, 2008, Rakhshandehroo *et al.*, 2009), è stata mostrata interazione della proteina con il recettore nucleare e up-regolazione della trascrizione del proprio gene (Kostiuk *et al.*, 2010). La figura 16 mostra l'effetto di queste molecole sui livelli di espressione di HMGCS2 in accordo con tali studi. In particolare, il riquadro A illustra una significativa riduzione del livello di mRNA di HMGCS2 dopo inibizione di PPAR α con GW6471 5 μ M per 24 h e un aumento rilevante dopo il trattamento con WY14643 50 μ M per 24 h. Queste regolazioni sono state confermate anche dall'analisi Western Blot delle proteine mitocondriali (Fig. 16, riquadro B).

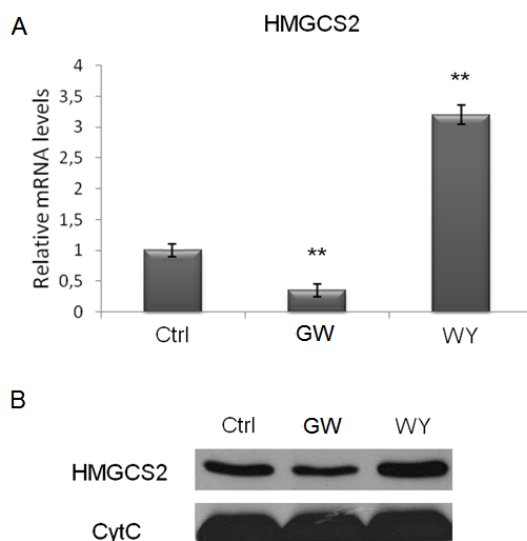


Figura 16. Coinvolgimento di PPAR α nella regolazione di HMGCS2. Le cellule HepG2 sono state trattate con GW6471 (GW) 5 μ M, agonista di PPAR α , o con WY14643 (WY), antagonista di PPAR α , per 24 h. Dopo i trattamenti, sono stati estratti gli mRNA e l'espressione di HMGCS2 è stata analizzata mediante Real Time-PCR (riquadro **A**). Sono state estratte le proteine mitocondriali e i livelli di proteina di HMGCS2 sono stati analizzati mediante Western Blot utilizzando il Cyt C come controllo per la normalizzazione (riquadro **B**). I livelli relativi di mRNA sono stati determinati calcolando il rapporto tra i segnali normalizzati di trattamento e controllo. I dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$.

5.4.2 Effetto dell'inibitore di FoxO1 (AS1842856) sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2

L'analisi della sequenza del promotore di HMGCS2 ha mostrato la presenza di specifiche sequenze regolate dai fattori di trascrizione della famiglia Fox (Forkhead box protein) (Nadal *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2007). Per questo motivo è stato valutato il

ruolo FoxO1 nella regolazione HMGCS2, considerando anche il suo coinvolgimento nella modulazione di pathways metabolici, quali lipogenesi e glicolisi.

FoxO1 è uno dei mediatori trascrizionali chiave nel signaling dell'insulina e del glucosio. FoxO1 gioca un ruolo centrale nella regolazione della produzione di glucosio nel fegato attraverso la regolazione di geni gluconeogenici, quali *glucosio-6-fosfatase (G6Pase)* e *fosfoenolpiruvato-carbossichinasi (PEPCK)*. Inoltre, FoxO1 riduce l'utilizzazione di glucosio e la sintesi dei lipidi mediante riduzione dell'attività di *Chrebp*, con effetto su i suoi geni target: *liver-pyruvate kinase (Lpk)*, uno dei principali enzimi coinvolti nella glicolisi; e geni lipogenici, quali *acetyl-CoA carboxylase (ACC)* e *fatty acid synthase (FAS)*.

In assenza di stimoli cellulari, FoxO1 è localizzato nel nucleo, dove regola la trascrizione dei propri geni target. L'attività trascrizionale di FoxO1 è regolata dall'insulina attraverso fosforilazione da parte di *Akt* (sulla Ser-256) e successiva esclusione nucleare, legata alla proteina chaperone 14-3-3; nel citoplasma è inattivo e va incontro a degradazione via ubiquitina-proteasoma.

Le cellule HepG2 sono state trattate con un inibitore sintetico di FoxO1, AS1842856, 1 μ M, per 16h, osservando una significativa down-regolazione dei livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2 (Fig. 17). Tali risultati hanno, quindi, suggerito un possibile coinvolgimento di FoxO1 nella regolazione di HMGCS2.

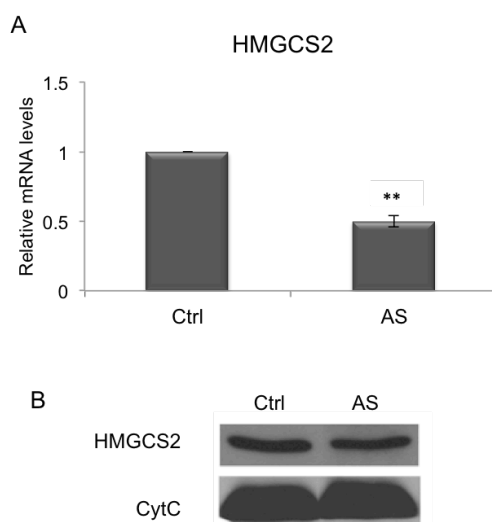


Figura 17. Coinvolgimento di FoxO1 nella regolazione di HMGCS2. Le cellule HepG2 sono state trattate con AS1842856 (AS) 1 μ M, inibitore sintetico di FoxO1 per 16 h. Dopo i trattamenti, sono stati estratti gli mRNA e l'espressione di HMGCS2 è stata analizzata mediante Real Time-PCR (riquadro **A**). Sono state estratte le proteine mitocondriali e i livelli di proteina di HMGCS2 sono stati analizzati mediante Western Blot utilizzando il Cyt C come controllo per la normalizzazione (riquadro **B**). I livelli relativi di mRNA sono stati determinati calcolando il rapporto tra i segnali normalizzati di trattamento e controllo. I dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$.

5.4.3 Effetto della cosomministrazione dell'agonista di PPAR α (WY14643) e dell'inibitore di FoxO1 (AS1842856) sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2

Per valutare una possibile correlazione tra i meccanismi esercitati dal fattore di trascrizione e il recettore nucleare, è stato valutato, in cellule HepG2, l'effetto della cosomministrazione dell'agonista di PPAR α (50 μ M) e dell'inibitore di FoxO1 (1 μ M) sui

livelli di espressione sia della proteina che del messaggero di HMGCS2, osservando risultati comparabili.

La cosomministrazione di AS1842856 e WY14643 ha mostrato che l'inibizione di FoxO1 contrasta l'aumento di HMGCS2 prodotto dall'attivazione di PPAR α , sia dell'mRNA che della proteina di HMGCS2 (Fig. 18).

Quindi, è possibile ipotizzare il coinvolgimento di FoxO1 nella regolazione di HMGCS2 indotta da PPAR α .

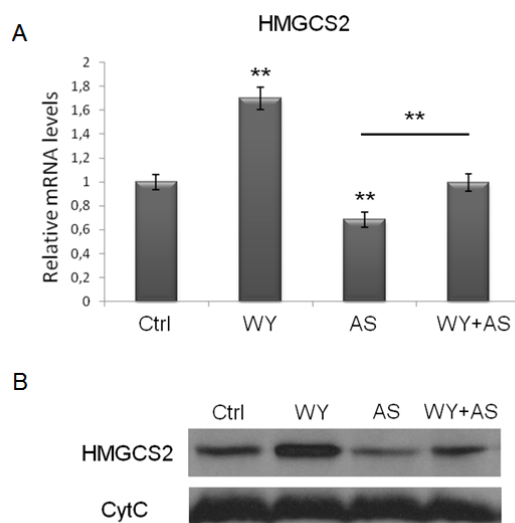


Figura 18. Coinvolgimento di FoxO1 nella regolazione di HMGCS2. Il riquadro **A** mostra i cambiamenti dei livelli di mRNA di HMGCS2 dopo il trattamento con WY14643 50 μ M, da solo o in combinazione con AS1842856 (AS) 1 μ M, per 16 h. Sono state estratte le proteine mitocondriali e i livelli di proteina di HMGCS2 sono stati analizzati mediante Western Blot utilizzando il Cyt C come controllo per la normalizzazione (riquadro **B**). I livelli relativi di mRNA sono stati determinati calcolando il rapporto tra i segnali normalizzati di trattamento e controllo. I dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$.

5.5 Coinvolgimento di PPAR α nell'up-regolazione di HMGCS2 indotta dai PUFA

5.5.1 Effetto degli acidi grassi sui livelli di espressione della proteina di HMGCS2

Nelle stesse condizioni sperimentali usate in precedenza, è stato valutato l'effetto degli acidi grassi sui livelli di espressione della proteina di HMGCS2. Le cellule HepG2 sono state trattate con gli acidi grassi polinsaturi DHA, EPA, AA, e con l'acido grasso saturo SA, alla concentrazione 50 μ M per 16h. Alla fine dei trattamenti sono state isolate le proteine mitocondriali e analizzati i livelli di espressione della proteina mediante analisi Western Blot. I segnali sono stati normalizzati mediante analisi dei livelli di Citocromo C.

I risultati mostrano che i livelli di espressione della proteina di HMGCS2 risultano significativamente aumentati in seguito al trattamento con i PUFA rispetto al controllo, al contrario l'acido stearico non produce alcun effetto (fig. 19). È stato osservato, quindi, per la proteina un andamento analogo a quello osservato in precedenza per il messaggero.

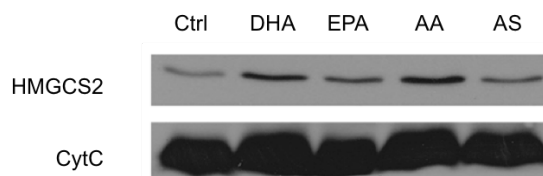


Figura 19. Effetto dei PUFA sui livelli di espressione della proteina di HMGCS2. Le cellule HepG2 sono state trattate con DHA, EPA, AA e SA 50 μ M per 16 h. Dopo i trattamenti sono state estratte le proteine mitocondriali, e i livelli di proteina di HMGCS2 sono stati analizzati mediante Western Blot utilizzando il Cyt C come controllo per la normalizzazione. L'immagine è rappresentativa di tre replicati biologici.

5.5.2 Effetto della cosomministrazione di PUFA e dell'agonista di PPAR α sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2

Per identificare un possibile meccanismo nell'up-regolazione di HMGCS2 indotta dai PUFA, è stato valutato il ruolo di PPAR α . La figura 20 (riquadro A) mostra i livelli di espressione dell'mRNA di HMGCS2 dopo trattamento con i PUFA (50 μ M) da soli e in combinazione con GW6471 (5 μ M) per 16h. L'aumento dei valori di HMGCS2 indotto da DHA, EPA e AA, risulta significativamente ridotto dall'inibizione di PPAR α , dimostrando un importante ruolo di PPAR α nella regolazione di HMGCS2 indotta dagli acidi grassi polinsaturi. Queste modulazioni sono state confermate dall'analisi Western Blot delle proteine mitocondriali (Fig. 20, riquadro B).

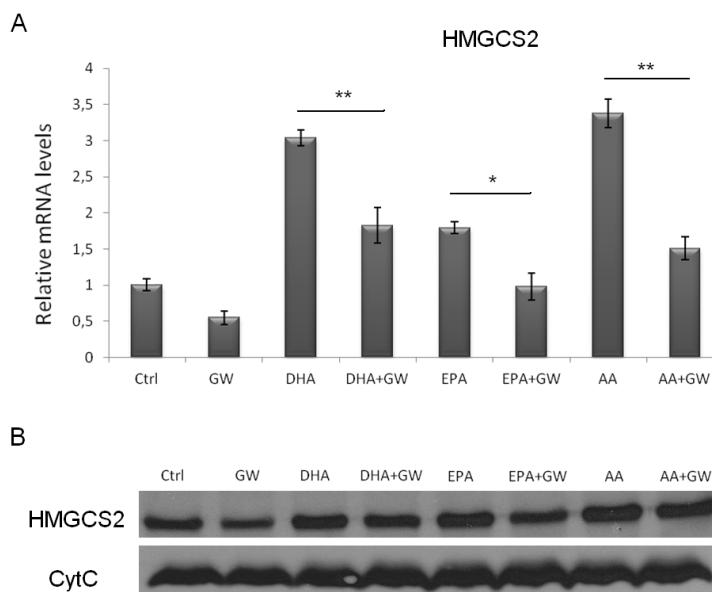


Figura 20. PPAR α è coinvolto nell'up-regolazione di HMGCS2 indotta dai PUFA. Le cellule HepG2 sono state trattate con DHA, EPA e AA 50 μ M, da soli o in combinazione con l'agonista di PPAR α , GW6471 5 μ M, per 16 h. Dopo i trattamenti, sono stati estratti gli mRNA e l'espressione di HMGCS2 è stata analizzata mediante Real Time-PCR (riquadro A). Sono state estratte le proteine mitocondriali e i livelli di proteina di HMGCS2 sono stati analizzati mediante Western Blot utilizzando il Cyt C come controllo per la normalizzazione (riquadro B). I livelli relativi di mRNA sono stati determinati calcolando il rapporto tra i segnali normalizzati dell'associazione, PUFA+GW, rispetto ai singoli PUFA. I dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * p <0.05, ** p <0.01.

5.6 Effetto della cosomministrazione di monosaccaridi e dell'agonista di PPAR α sui livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2

Successivamente, è stato valutato il coinvolgimento, nella regolazione di HMGCS2, di altri due nutrienti: glucosio e fruttosio.

È stato valutato l'effetto della cosomministrazione di glucosio o fruttosio e dell'antagonista di PPAR α (GW6471) sui livelli di espressione del messaggero di HMGCS2.

Le cellule HepG2 sono state trattate con glucosio o fruttosio (25mM per 48h), GW (10 μ M per 24h), e con le stesse sostanze in cosomministrazione, utilizzando gli stessi tempi e le stesse concentrazioni. Alla fine dei trattamenti sono stati valutati mediante Real Time-PCR i livelli di espressione dell'mRNA di HMGCS2.

I nostri risultati hanno mostrato che i livelli di espressione del messaggero di HMGCS2 risultano significativamente aumentati in seguito al trattamento con i due monosaccaridi, mentre, in entrambi i casi, l'aggiunta dell'antagonista contrasta questa up-regolazione (Fig. 21, riquadri A e B).

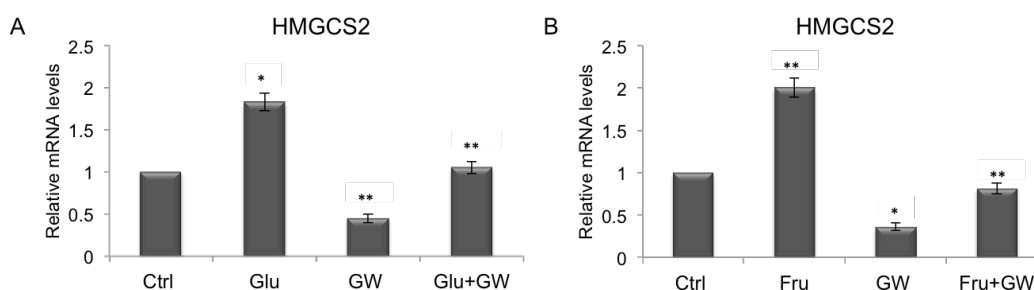


Figura 21. PPAR α è coinvolto nell'up-regolazione di HMGCS2 indotta dai monosaccaridi glucosio e fruttosio. Le cellule HepG2 sono state trattate con glucosio (Glu; riquadro **A**) e fruttosio (Fru; riquadro **B**) 25 mM, da soli o in combinazione con l'agonista di PPAR α , GW6471 5 μ M, per 16 h. Dopo i trattamenti, sono stati estratti gli mRNA e l'espressione di HMGCS2 è stata analizzata mediante Real Time-PCR. I dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.7 Effetto di differenti varietà di olio di oliva sui livelli di espressione epatica di HMGCS2 in ratti alimentati con diete a diversa composizione lipidica

Numerosi studi sulla chemioprevenzione mostrano particolare interesse ai benefici sulla salute della dieta Mediterranea, della quale l'olio d'oliva è un componente importante. Tale alimento contiene una vasta gamma di sostanze chemiopreventive quali tocoferoli, composti polifenolici, squalene, ma è soprattutto ricco di acidi grassi mono e polinsaturi. La presenza di questi tipi di grassi è stata mostrata come estremamente efficace nella nutrizione preventiva (Eletto *et al.*, 2005; Evans, 2011; Pawles, 2010).

Quindi, la qualità della quota lipidica nella dieta ed in particolare il contenuto in acidi grassi polinsaturi n-3 ed n-6 è interessante oggetto di studio (Simopoulos *et al.*, 1999). Risulta, di conseguenza, importante approfondire gli effetti molecolari di questi grassi alimentari, in particolare relativamente all'olio di oliva, e più specificamente relativamente alla sua composizione, finora solo parzialmente definiti, e soprattutto focalizzare l'interesse sui meccanismi di regolazione genica di tali nutrienti.

Questo studio è stato progettato per valutare l'effetto di differenti varietà di olio d'oliva del territorio cilentano, caratterizzate per profilo in acidi grassi, sull'espressione genica di HMGCS2.

Tre gruppi di cinque ratti ciascuno sono stati alimentati rispettivamente con tre differenti diete, per due settimane. Tutte le diete sono state caratterizzate da identica composizione dei maggiori principi alimentari (proteine 20%, carboidrati 56% e lipidi 22% dell'energia totale), differenziandosi soltanto nella qualità dei lipidi. La quota lipidica della dieta controllo conteneva esclusivamente grassi animali saturi, derivati dal burro; mentre le due diete sperimentali contenevano grassi insaturi derivati dall'olio di oliva. Queste differivano però per varietà di olio, la prima (*Cilentana 4*) caratterizzata da un contenuto in acido linoleico che rientra nella media (circa 6% del contenuto di acidi grassi totale), la seconda (*Salella*) caratterizzata, invece, da un alto contenuto dello stesso acido grasso (circa 17% del contenuto di acidi grassi totale) (Tabella 4).

Alla fine della dieta sono stati analizzati i livelli sierici di trigliceridi e colesterolo, non osservando sostanziali differenze tra i gruppi (dati non mostrati) ed è stato prelevato il fegato al fine di rilevare differenze di espressione genica, tramite Real Time-PCR, rispetto al diverso contenuto lipidico delle diete.

I risultati hanno mostrato lieve, ma significativa down-regolazione dei livelli di espressione dell'mRNA di HMGCS2 nei campioni provenienti dal fegato di ratti alimentati con diete contenenti grassi insaturi (oli d'oliva) rispetto a quelli alimentati con la dieta contenente grassi saturi (burro). Mentre, non è stata osservata differenza significativa tra i due diversi oli d'oliva, da ricondurre, quindi, al diverso contenuto di acido linoleico (Fig. 22).

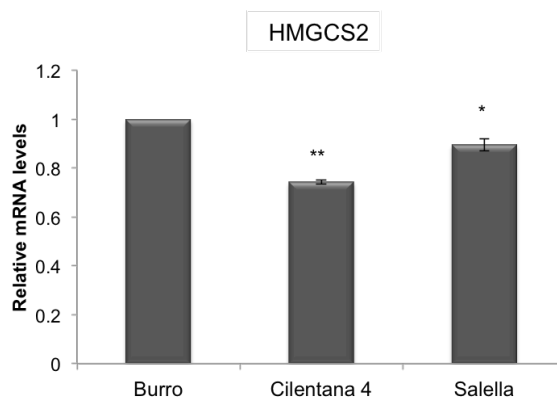


Figura 22. Effetto delle diete sui livelli epatici di HMGCS2. Alla fine dell'alimentazione con le diete sperimentali, sono stati estratti gli mRNA da tessuto epatico e l'espressione di HMGCS2 è stata analizzata mediante Real Time-PCR. I livelli relativi di mRNA sono stati determinati calcolando il rapporto tra i segnali normalizzati dei due oli d'oliva rispetto al burro. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Conclusioni

La composizione sierica dipende qualitativamente e quantitativamente dal metabolismo endogeno e dall'apporto nutrizionale. Le concentrazioni sieriche di numerosi componenti sono comunemente usate come biomarker diagnostici di condizioni cliniche. Numerosi componenti lipidici sierici e livelli di lipoproteine sono tipicamente associati con l'apporto nutrizionale di grassi. Quindi, nella connessione generale tra stile nutrizionale e stato di salute, i livelli lipidici sierici e l'assunzione di lipidi sono considerati fattori di rischio per malattie cardiovascolari ed altre patologie croniche (Mensink *et al.*, 2003; Breslow, 2006; Carpentier *et al.*, 2006; Lichtenstein *et al.*, 2006; Erkkilä *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Warensjö *et al.*, 2008). Dal momento che alcuni nutrienti, per esempio gli acidi grassi polinsaturi, hanno specifiche attività biologiche è concepibile ipotizzare che la loro presenza nel siero sia in grado di esercitare specifici processi fisiopatologici.

Abbiamo precedentemente dimostrato che la somministrazione *in vitro* di campioni di siero provenienti da soggetti di sesso maschile ipercolesterolemici e normocolesterolemici regola differenzialmente l'espressione di geni candidati (Zirpoli *et al.*, 2012). Poiché la causa più comune di ipercolesterolemia è lo stile nutrizionale, abbiamo considerato questo come la causa principale di differenza tra i due gruppi sierici, che hanno mostrato anche differenze rilevanti nel profilo di acidi grassi, saturi, insaturi e polinsaturi. In questo studio, gli RNA estratti da cellule HepG2 trattate con questi campioni di siero, sono stati analizzati mediante tecnica di microarray per valutare gli effetti sull'espressione dell'intero complesso di mRNA cellulare. L'obiettivo è stato quello di identificare il maggior numero di specie di mRNA differenziali in questa condizione, senza considerare l'espressione di geni candidati. Pertanto, è stato considerato che gli mRNA risultanti maggiormente differenziali, come mostrato nelle tabelle 1 e 2, sono, almeno quantitativamente, i più rilevanti. Anche se non è possibile immaginare un possibile ruolo per i prodotti codificati da tutti questi geni all'interno dei meccanismi che legano l'apporto nutrizionale di lipidi e la patogenesi di malattie, si può notare che molti di loro sono coinvolti nel metabolismo lipidico e in processi di detossificazione. 3-idrossi-3-metilglutaril-Coenzima A sintasi 2 (HMGCS2), per esempio, è un enzima mitocondriale coinvolto nel pathway di chetogenesi e glutatione S-transferasi alpha 1 (GSTA1) è coinvolto nella detossificazione di composti elettrofili.

Abbiamo poi valutato quali di questi geni è stato influenzato da PUFA e colesterolo. Nessuno degli mRNA, che sono stati anche validati mediante Real Time-PCR, è risultato essere regolato mediante aggiunta a colture cellulari di 22 (R)-idrossicolesterolo (22R-HC), un analogo solubile del colesterolo. Questo permette di concludere che, mentre i due gruppi di siero, utilizzati per studiare l'espressione differenzialmente indotta, sono stati innanzitutto discriminati sulla base della concentrazione di colesterolo, altri componenti accanto al colesterolo, eventualmente derivanti dalla nutrizione, potrebbero spiegare le regolazioni osservate. Perciò, abbiamo analizzato quale degli mRNA differenzialmente espressi, derivanti dal confronto tra campioni ipercolesterolemici e normocolesterolemici, fossero anche regolati da singoli acidi grassi.

È noto che l'apporto nutrizionale di PUFA influenza la loro concentrazione sierica (Bethune *et al.*, 2006), inoltre questi nutrienti hanno azioni biologiche molto specifiche (Chawla *et al.*, 2001), che influenzano membrane e molecole di segnalazione, essendo anche in grado di regolare specifici pathways attraverso recettori e regolazione dell'espressione genica (Jump, 2004). L'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6, n-3), l'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5, n-3) e l'acido arachidonico (AA, C20:4, n-6) sono risultati modulare l'espressione di soli quattro dei geni confermati da analisi PCR (Fig. 15). I livelli di mRNA di HMGCS2 e GSTA1 sono risultati significativamente aumentati dopo il trattamento PUFA, mentre quelli degli mRNA di APOM e LEAP2 sono diminuiti (Fig. 15).

L'acido grasso saturo (acido stearico, SA, C18:0) non ha indotto regolazione di nessuno degli mRNA selezionati.

HMGCS2 è un enzima mitocondriale che catalizza la prima reazione chetogenesi producendo HMG-CoA da acetil-CoA e acetoacetil-CoA (Vilà-Brau *et al.*, 2011), fornendo energia derivate dai lipidi durante i periodi di digiuno. HMGCS2 è trascrizionalmente regolato da PPAR α (Liu *et al.*, 2008; Rakhshandehroo *et al.*, 2009) e questo recettore nucleare potrebbe essere cruciale per la regolazione operata dai PUFA (Nakamura *et al.*, 2004).

GSTA1 agisce nella detossificazione di composti elettrofilici dal glutatione, tra cui sostanze cancerogene, farmaci, tossine e prodotti di stress ossidativo (Morel *et al.*, 1994; Salinas & Wong, 1999).

ApoM è associata a diverse lipoproteine ed è coinvolto nel trasporto dei lipidi (Dahlbäck & Nielsen, 2006). La sua espressione è regolata da fattori di trascrizione che controllano il metabolismo lipidico epatico come *Hepatic Nuclear Factor 1 α* (HNF 1 α), *Liver Receptor Homolog 1* (LRH 1) e *Forkhead box A2* (Foxa2) (Mosialou *et al.*, 2010; Wolfrum *et al.*, 2008).

LEAP2 come peptide antimicrobico rientra nel sistema immunitario innato dei vertebrati (Krause *et al.*, 2003).

Considerando che i livelli di LEAP2 sono risultati aumentati dai trattamenti con i sieri ipercolesterolemici rispetto ai trattamenti con i sieri normocolesterolemici, ma, a differenza di HMGCS2 e GSTA1, diminuiti di PUFA, è probabile che in questo caso le regolazioni sieriche siano dovute ad altri componenti.

HMGCS2 è stato selezionato per ulteriori analisi sulla base dei risultati che lo indicano come il gene più modulato e del suo ruolo nell'omeostasi lipidica. Inoltre, gli effetti dei PUFA sui suoi livelli di espressione sono ancora da chiarire. Numerosi studi dimostrano che HMGCS2 è un gene bersaglio di PPAR α (Liu *et al.*, 2008, Rakhshandehroo *et al.*, 2009), questa proteina ha mostrato di interagire con PPAR α e di up-regolare la trascrizione del suo stesso gene (Kostiuk *et al.*, 2010). In accordo con questi studi, i nostri dati mostrano che l'inibizione di PPAR α con GW6471 ha ridotto i livelli di mRNA e di proteina di HMGCS2, mentre il trattamento con l'agonista di PPAR α WY14643 li ha aumentati. Inoltre, altri autori hanno mostrato specifiche sequenze sul promotore di HMGCS2, regolate dai fattori di trascrizione della famiglia Fox (Forkhead box proteins) (Nadal *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2007). Per questo motivo abbiamo valutato il ruolo FoxO1 nella regolazione di HMGCS2, considerando anche il suo coinvolgimento nella modulazione di pathways metabolici quali lipogenesi e glicolisi (Ido-Kitamura *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). I dati mostrano che i trattamenti con l'inibitore sintetico di FoxO1, AS1842856 (AS), ha prodotto una significativa down-regolazione dei livelli di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2. Tuttavia la somministrazione contemporanea di AS1842856 e WY14643 ha mostrato che l'inibizione di FoxO1 è in grado di ridurre l'aumento di HMGCS2 ottenuto per attivazione di PPAR α . Pertanto, FoxO1 potrebbe essere un fattore importante nella regolazione HMGCS2 indotta da PPAR α . Poiché i PUFA sono considerati importanti ligandi di PPAR α (Nakamura *et al.*, 2004), abbiamo anche indagato su un possibile ruolo di questo recettore nucleare nell'up-regolazione di HMGCS2 indotta dai PUFA. Gli aumenti di espressione dell'mRNA e della proteina di HMGCS2, indotti da DHA, EPA e AA, sono stati significativamente ridotti dall'inibizione di PPAR α , dimostrando un ruolo importante di PPAR α nella regolazione HMGCS2 indotta dai PUFA (Fig. 20).

Inoltre, abbiamo osservato il coinvolgimento di PPAR α nella regolazione di HMGCS2 mediata da altri due nutrienti, glucosio e fruttosio. Infatti, l'inibizione del recettore nucleare con GW6471 riduce l'up-regolazione dell'mRNA di HMGCS2 indotta dai due monosaccaridi (Fig. 21).

I nostri dati hanno descritto la capacità di campioni di siero ipercolesterolemici di influenzare specificamente l'espressione genica in cellule epatiche. Abbiamo mostrato un elenco di mRNA differenzialmente espressi e, tra questi, quattro geni sono stati specificamente interessati dai singoli acidi grassi polinsaturi. Analogamente, è quindi possibile che anche *in vivo* questi geni siano interessati dalle concentrazioni sieriche di PUFA. L'espressione dei fattori selezionati, in particolare HMGCS2, potrebbe quindi rappresentare un punto di riferimento nel rapporto tra apporto nutrizionale, effetto 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 questa via metabolica.

7.1 Linea cellulare e mezzo di coltura

La linea cellulare utilizzata è: HepG2, cellule di epatoblastoma umano. Il mezzo di coltura utilizzato è costituito come segue: EMEM (Minimum Essenzial Medium Eagle con Earle's Balanced soluzione salina, senza

- L-Glutamina, Biowhittaker) a cui è stato aggiunto:
- FBS (Siero fetale bovino): 10% (v/v) (Sigma)
- NEAA (Aminoacidi non essenziali): 1% (v/v) (Biowhittaker)
- Glutamina: 1% (v/v) (Biowhittaker)
- Penicillina: 100 mU/ml (Biowhittaker)
- Streptomicina: 100 µg/ml (Biowhittaker)

Le altre soluzioni necessarie per il mantenimento in coltura della linea cellulare sono:

- PBS 1X (Dulbecco's phosphate buffered saline) soluzione salina tamponata con fosfato: priva di Calcio e Magnesio, pH 7,4 contenente 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄.
- Tripsina-EDTA: 500mg/L tripsina (1:250), 200mg/L EDTA in PBS, pH 7,4.

7.2 Crescita della linea cellulare eucariotica

Le cellule eucariotiche, scongelate rapidamente a 37°C, sono state risospese in mezzo completo fresco e coltivate in piastre di plastica per colture cellulari. Sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C in un'atmosfera al 5% di CO₂ ed al 95% di aria ad umidità relativa del 90%.

7.3 Propagazione della linea cellulare in coltura

Dalla piastra di cellule subconfluenti è stato rimosso il mezzo di coltura, lavata con PBS 1X ed è stata aggiunta tripsina-EDTA, che lasciata agire per 5 minuti a temperatura ambiente, permette alle cellule di staccarsi dalla piastra. È stato aggiunto il mezzo completo per neutralizzare l'effetto della tripsina, raccolto il tutto e centrifugato a 1200 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione è stato rimosso il soprannatante e risospeso in mezzo di coltura completo fresco. Si procede a seminare le cellule in nuove piastre.

7.4 Congelamento delle cellule

È stato rimosso il mezzo di coltura, è stato lavato due volte con PBS 1X, è stata aggiunta tripsina-EDTA per staccare le cellule dalla piastra che sono state risospese in mezzo completo. A questo punto si è proceduti a centrifugare a 1200 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente.

Le cellule, staccate e centrifugate, sono state risospese in una quantità opportuna di mezzo completo a cui è stato aggiunto il 5% di DMSO (Dimetilsolfossido), agente crioprotettivo.

Le cellule sono state aliquotate in tubi adattati al congelamento, congelate a -80°C e in seguito conservate in azoto liquido.

7.5 Preparazione delle sostanze da somministrare e trattamenti

L'RNA estratto dalle cellule HepG2 trattate con i campioni di siero umano è stato ottenuto come descritto in precedenza (Zirpoli et al., 2012). Brevemente, le cellule sono state seminate in piastre con una densità pari a $2,5 \times 10^6$ cellule/piastra, dopo aver

effettuato la conta al microscopio con *Trypan-blue stain* 0.4% (Bio-Whittaker), in camera citometrica (camera di Burker) e lasciate in incubatore.

Dopo 24h dalla semina, le cellule epatiche, con una confluenza del 70%, sono state trattate ed incubate per 48h con il 10% di siero umano in nuovo mezzo di coltura, ciascuno in duplicato biologico.

Per i trattamenti con le singole sostanze, le cellule HepG2 sono state seminate con una densità pari a $2,5 \times 10^6$ cellule/piastra e lasciate aderire per 24h. Il mezzo è stato poi sostituito con mezzo fresco privo di siero per i trattamenti con le specifiche sostanze.

Gli acidi grassi (Sigma; DHA, EPA, AA e SA, 50 μ M, 16h) e il 22-R-idrossicolesterolo (Cayman Chemical; 5, 10, 25 μ M, 24h e 48h) sono solubilizzati in Etanolo e ciascun acido grasso è cosomministrato con la BSA-fatty acid free in rapporto molare 2:1 prima di aggiungerli al mezzo. La soluzione di BSA (Sigma) è solubilizzata in 0,9% NaCl.

GW6471, WY14643 e AS1842856 sono solubilizzati in DMSO e usati 5 μ M per 24h, 50 μ M per 24h e 1 μ M per 16h, rispettivamente.

Come controllo negativo, le cellule sono state in coltura con i veicoli utilizzati per solubilizzare le sostanze. Ogni trattamento è stato eseguito almeno in triplicato biologico.

7.6 Estrazione RNA totale

Dopo i tempi specifici di trattamento, è stato allontanato il mezzo di coltura e sono stati effettuati due lavaggi con PBS 1X. In ogni piastra è stato aggiunto un opportuno volume di TriZOL (Invitrogen Co.); dopo aver omogenato, si è proceduto alla purificazione dell'RNA mediante cloroformio. Successivamente si è realizzata la precipitazione dell'RNA con alcool isopropilico. Il pellet di RNA totale è stato lavato con etanolo al 75% e lasciato asciugare. Infine, il pellet è stato solubilizzato in H₂O DEPC (acqua trattata con dietil-piropicarbonato (Sigma) per inibire l'azione dell'RNasi).

Terminata l'estrazione, è stata controllata l'integrità dell'RNA su gel all'1,2% di agarosio (Sigma). Nel gel è stato aggiunto Etidio Bromuro (0.5 μ g/ μ L) (Sigma) che ha permesso la visualizzazione dell' RNA, quando esposto ad una lampada UV.

L'RNA è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm.

7.7 Analisi microarray

La concentrazione dell'RNA è stata determinata mediante lo spettrofotometro Nanodrop (NanoDrop, Wilmington, Delaware, USA) e la sua qualità è stata valutata con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Milano, Italia). Per ogni campione, 500 ng di RNA totale sono stati sintetizzati in cRNA biotinilato utilizzando il kit di Illumina RNA Amplification (Ambion, Inc., Austin, TX). Sintesi è stata effettuata secondo le istruzioni del produttore. La concentrazione e la qualità di cRNA sono state valutate come descritto sopra.

Da sedici RNA per ogni gruppo (ipercolesterolemico vs normocolesterolemico) (Zirpoli *et al.*, 2012) sono stati ottenuti quattro gruppi di RNA ognuno contenete quattro differenti RNA. Questa strategia ha permesso ridurre differenze non specifiche, aumentando la sensibilità di queste procedure (Kendziorski *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2003).

Da ognuno di questi campioni raggruppati, sono stati prodotti tre replicati tecnici e poi 750ng cRNA sono stati ibridati per 18 h con HumanHT12 BeadChips v.4.0 Expression (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) secondo il protocollo fornito dal produttore. I chip ibridati sono stati lavati e colorati con streptavidina coniugata con Cy3 (GE Healthcare Milano, Italia). I BeadChips sono stati essiccati e scansionati con Illumina BeadArray Reader (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) (Nassa *et al.*, 2014).

Per l'analisi dei dati, i file di intensità sono stati caricati nel software v.2010.3 Illumina GenomeStudio per il controllo qualità e analisi di espressione genica. Innanzitutto,

l'algoritmo di normalizzazione quantile è stato applicato al set di dati per correggere errori sistematici. Per l'analisi di espressione differenziale, sono stati raggruppati replicati tecnici di ciascun campione e i geni con un valore p inferiore a 0,05, corrispondente ad un tasso di falsi positivi del 5%, sono stati considerati come rilevati. I geni differenzialmente espressi sono stati selezionati con Diff Score cutoff settato a ± 30 , corrispondente ad un valore p di 0,001 (Mutarelli *et al.*, 2008).

7.8 Retrotrascrizione

Le reazioni di trascrizione inversa sono state eseguite a partire da 3 μg di RNA totale.

È stata preparata una miscela di reazione iniziale avente: 3 μg di RNA, 1 μL di 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Random primer e 1 μL di 10 mM (ciascuno) dNTP mix in un volume totale di 13 μL .

La mix è stata incubata per 5 minuti a 65 °C, posta in ghiaccio, sono stati aggiunti ad essa 4 μL di 5 \times RT buffer e 2 μL di 0.1 M ditiotreitolo (Invitrogen Co.). Successivamente la miscela è stata incubata per 2 minuti a 25°C ed è stato aggiunto 1 μL di enzima Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase. Sono seguite una fase di 10 minuti a 25°C, una fase di 50 minuti a 42°C e uno stadio di disattivazione dell'attività dell'enzima di 15 minuti a 70 °C. Infine, sono stati aggiunti 2 μL RNase H (Invitrogen Co.) che insieme alla successiva incubazione a 37°C per 20 minuti, hanno avuto come scopo quello di eliminare gli ibridi di RNA/cDNA.

7.9 Real Time-PCR (Polymerase Chain Reaction): analisi dei geni target

Gli esperimenti di Real-Time PCR sono stati condotti utilizzando la mix di reazione LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Applied Science, Germany) contenente l'agente intercalante SYBR Green. Il segnale di fluorescenza, dovuto al SYBR Green, è stato monitorato per quantizzare i prodotti di amplificazione specifici in ogni ciclo di PCR mediante LyghtCycler con software 3.5.3 (Roche Applied Science, Germany).

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate con una miscela contenente il cDNA ottenuto, 8 μL della mix di reazione avente SYBR Green, 1 μL di ogni specifica coppia di primer (PRIMM, Milan, Italy), ed acqua PCR grade (Roche) per un volume finale di 16 μL .

Sono state utilizzate le seguenti coppie di primers:

- 18S
Fw: 5' – CGATGCTCTTAGCTGAGTGT – 3'
Rv: 5' – GGTCCAAGAATTTACCTCT – 3'
- ADH1
Fw: 5' – AGG AAT CTG GCA CAG ATG – 3'
Rv: 5' – GTT GCT CTC CGG GTT TTT AC – 3'
- ApoM
Fw: 5' – CAT CCT CCC GAA AAG TGT GT – 3'
Rv: 5' – CCA ACA ACT CAG CTC CCA TT – 3'
- Cyr61
Fw: 5' – TCA ACG AGG ACT GCA GCA AA – 3'
Rv: 5' – TGG GGA GAG ATA GTT CTT GG – 3'
- ELOVL2
Fw: 5' – ACT CCT ACT ATG GAC TTT CTG T – 3'
Rv: 5' – ATG ACT GGA AGA TGA GAC AAC – 3'
- GDF15
Fw: 5' – CAA GAA CTC AGG ACG GTG AA – 3'
Rv: 5' – AGG TCG GTG TTC GAA TCT TC – 3'

- GSTA1
Fw: 5' – AGC CCA AGC TCC ACT ACT T – 3'
Rv: 5' – AGT TGA GAA TGG TCT GGT C – 3'
- HMGCS2
Fw: 5' – GCTTCTCCCCGTGAATCATA – 3'
Rv: 5' – ACCATAAGCCCAGGACAGT – 3'
- LEAP2
Fw: 5' – TGT CAA GAT GTG GCA CCT CA – 3'
Rv: 5' – CAC ACT TAA GGA ACA GCG TC – 3'
- MTTP
Fw: 5' – AGG TCA CAC AAC TGG TCT CT – 3'
Rv: 5' – AGA TGC TCT TCT CTC CTC TC – 3'
- UGT2A3
Fw: 5' – TCC ATA TGC CAC AGG ACA GA – 3'
Rv: 5' – GTC TCC ACA GGG AAT CAC A – 3'

Per ogni reazione è stato effettuato un ciclo di preincubazione a 95 °C per 10 minuti, seguito da 40 cicli di denaturazione a 95 °C per 10 secondi, appaiamento a 58 °C per 30 secondi ed estensione a 72 °C per 15 secondi. È stata valutata la specificità della reazione analizzando la curva di melting ottenuta per ogni amplificato. È stato usato il metodo della curva standard, confrontando i valori ottenuti nei campioni derivati da cellule trattate rispetto ai campioni delle cellule di controllo. Il test è stato condotto su almeno 3 replicati tecnici e 3 replicati biologici. La significatività statistica è stata calcolata mediante t_student test.

7.10 Isolamento della frazione mitocondriale e quantizzazione delle proteine

Dopo i trattamenti, le cellule sono state raccolte dalla piastra e lavate una volta con PBS freddo. Le cellule sono state poi risospese in 100 µl di digitonina 0,05% in un tampone di lisi (saccarosio 250 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml, e leupeptina 10 µg/ml). Dopo 3 minuti di incubazione in ghiaccio, le cellule sono state centrifugate (2 min, 13.000 rpm, 4° C) e il supernatante è stato rimosso (frazione citosolica). Il pellet residuo è stato risospeso in 50 µl di tampone di lisi Triton (PBS, 1% Triton X-100, PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml, e leupeptina 10 µg/ml). La reazione di lisi è stata lasciata procedere per 30 min, e i detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione. Il surnatante comprendente la frazione di membrana mitocondriale è stato recuperato. La concentrazione proteica è stata determinata mediante test Bio-Rad, usando come standard BSA 1mg/ml.

7.11 Western Blotting

I. Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato

Le analisi di Western Blotting sono state effettuate caricando ottanta microgrammi di proteine mitocondriali da ciascun estratto.

I campioni proteici sono stati bolliti per 5 minuti in un tampone (sample-buffer) contenente SDS (Sigma), β-mercaptoetanol (Sigma) ed il colorante blu di bromofenolo (Biorad).

La separazione elettroforetica avviene a 100 V a voltaggio costante su gel al 15% di SDS-poliacrilammide.

II. Elettroblotting

Dopo la corsa elettroforetica le proteine devono essere trasferite dal gel al filtro di nitrocellulosa. Questo trasferimento avviene applicando una corrente di 100 V per 1 ora.

Dopo il trasferimento, per verificare la presenza delle proteine sulla membrana (GE Healthcare) si immerge quest'ultima in una soluzione di Rosso Ponceau (Sigma) e si lava con acqua.

III. Rilevazione delle proteine

La membrana è stata incubata prima per 1h in una soluzione al 5% di latte in polvere senza grassi (MILK Non-fat Dry, BIO-RAD) in PBS-TWEEN 0,1% a temperatura ambiente (blocking) e poi con anticorpi contro HMGCS2 umana (ab 137.043) diluito 1: 1000, che viene lasciato agire over-night a 4 ° C.

Dopo sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS-TWEEN 0,1% v/v da dieci minuti ciascuno ed il filtro è stato incubato con un anticorpo secondario (anti-rabbit diluito 1:10000) legato ad un enzima, la perossidasi di rafano. L'anticorpo contro il citocromo c è stato utilizzato come controllo per la normalizzazione.

Sono stati ripetuti i 3 lavaggi con PBS-TWEEN 0,1% da dieci minuti ciascuno ed è stato applicato ECL (Enhanced ChemiLuminescence, metodo della chemiluminescenza intensificata, GE Healthcare).

La luce emessa, infine, è stata rilevata esponendo la membrana ad una lastra fotografica. Le immagini digitali sono state ottenute mediante utilizzo dello strumento ImageDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Ogni trattamento è stato eseguito almeno in triplicato biologico.

7.12 Studio *in vivo*

7.12.1 Animali

Sono stati utilizzati ratti Fisher maschi F-344 (Charles River, Milano) di 5 settimane di età ed un range di peso di 100/140 grammi circa. Prima di iniziare le procedure sperimentali, i ratti sono stati sottoposti ad una settimana di acclimatazione in condizioni di stabulazione standard conformi alle norme vigenti: temperatura costante a 21 ± 2 °C, umidità 45 %, illuminazione giornaliera regolata in cicli di 12 ore di luce e 12 ore di buio, acqua e cibo *ad libitum*.

Tutte le sperimentazioni sono state eseguite nel *Laboratorio di Sperimentazione Preclinica* dell'Università degli Studi di Salerno dopo approvazione dei comitati etici e in ottemperanza alle direttive CEE recepite nel D.L. 116/92, e secondo le norme internazionali di "Good Laboratory Practice".

I ratti sono stati pesati periodicamente per tutta la durata della procedura sperimentale e soppressi tramite eutanasia per overdose di anestetico (Direttiva Europea 2010/63/UE). Dopo il sacrificio, il fegato è stato rimosso, congelato in azoto liquido e conservato -80°C per l'analisi molecolare. I prelievi di sangue per la determinazione dei livelli sierici di trigliceridi e colesterolo sono stati ottenuti dalla coda immediatamente prima del sacrificio.

7.12.2 Protocollo sperimentale

Tre gruppi sperimentali di cinque ratti ciascuno sono stati alimentati rispettivamente con tre differenti diete, per due settimane. Le tre diete avevano identica composizione dei maggiori principi alimentari, differenziandosi soltanto nella qualità dei lipidi. È stata utilizzata una dieta standard in polvere privata della quota lipidica (Charles River, Milano) (Tab. 3) alla quale sono stati aggiunti due differenti oli d'oliva (Salella e Cilentana 4; Tab.

4) per le due diete sperimentali e burro, precedentemente sciolto a bagnomaria, per la dieta di controllo.

Durante la sperimentazione i ratti sono stati alimentati con acqua e cibo (diete sperimentali) *ad libitum*.

Crude Nutrients	[%]
Dry matter	95.20
Crude protein (N x 6.25)	20.80
Crude fat	0.20
Crude fibre	5.00
Crude ash	5.60
N free extracts	63.60
Starch	45.00
Sugar	16.80

Tabella 3. Composizione dieta sperimentale. Sono presenti solo tracce di acidi grassi grezzi (< 0,5%).

ACIDI GRASSI	SALELLA CILENTANA 4	
	[%]	[%]
C14:0 miristico	0.00	0.00
C16:0 palmitico	15.38	13.22
C16:1 palmitoleico	1.31	0.76
C17:0 eptadecanoico	0.02	0.14
C17:1 eptadecenoico	0.03	0.15
C18:0 stearico	1.62	3.78
C18:1 t Iso-trans-oleico	0.00	0.00
C18:1 oleico	63.27	75.40
C18:2 tc+ct Iso-trans-linoleici	0.00	0.00
C18:2 linoleico	17.13	5.23
C18:3 linolenico	0.59	0.40
C18:3 cct+ttc linolenico	0.00	0.00
C20:0 arachico	0.27	0.47
C20:1 eicosenoico	0.24	0.22
C22:0 behenico	0.09	0.18
C24:0 lignocerico	0.05	0.05

Tabella 4. Composizione, espressa in percentuale, di acidi grassi nell'olio d'oliva Salella e Cilentana 4.

7.12.3 Estrazione dell'RNA totale da tessuto

I campioni di tessuto epatico sono stati omogeneizzati in 1 ml di TRIzol per ogni 30/40 mg di tessuto. L'estrazione dell'RNA totale è stata poi effettuata seguendo la procedura vista nel paragrafo 5.6.

Si è proceduto, quindi, con la fase di retrotrascrizione (paragrafo 5.8) e Real Time-PCR, per la quale sono state utilizzate le coppie di primers per HMGCS2 e 18S (paragrafo 5.9)

7.13 Analisi statistiche

I risultati ottenuti e discussi nel capitolo successivo rappresentano la media di duplicati biologici (somministrazioni *in vitro*) e triplicati tecnici (dosaggio RNA messaggero).

La significatività statistica è stata calcolata mediante test *t* di Student. I valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Bibliografia

Akihisa T., Kojima N., Katoh N., Ichimura Y., Suzuji H., Fukatsu M., Maranz S., Masters E.T. **2010**. Triterpene alcohol and fatty acid composition of shea nuts from seven African countries. *J Oleo Sci*; **59**: 351-60.

Astrup A., Dyerberg J., Elwood P., Hermansen K., Hu F.B., Jakobsen M.U., Kok F.J., Krauss R.M., Lecerf J.M., Legrand P., Nestel P., Riserus U., Sanders T., Sinclair A., Tender S., Tholstrup T., Willett W. **2011**. The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *Am J Clin Nutr*; **93(4)**: 684-8.

Bang H.O., Dyerberg J., Sinclair H.M. **1980**. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr*, **33**, 2657-2661.

Benjamin S., Flotho S., Borchers T., Spener F. **2013**. Conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids regulate peroxisome proliferator-activated receptor subtypes and major peroxisome proliferator responsive element-bearing target genes in HepG2 cell model. *Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, **14(2)**; 115-123.

Beare-Rogers J.L., Nera E.A. **1972**. Cardiac fatty acids and histopathology of rats, pigs, monkeys and gerbils fed rapeseed oil. *Comp Biochem Physiol B*; 41: **793-800**.

Beare-Rogers J.L., Gordon E. **1976**. Myocardial lipids and nucleotides of rats fed olive oil or rapeseed oil. *Lipids*; **11**: 287-90.

Bethune C., Seierstad S.L., Seljeflot I., Johansen O., Arnesen H., Meltzer H.M., Rosenlund G., Frøyland L., Lundebye A.K. **2006**. Dietary intake of differently fed salmon: a preliminary study on contaminants. *Eur J Clin Invest* **36**: 193-201.

Boelen P., Van Dijk R., Damsté J.S.S., Rijpstra W.I.C., Buma A.G.J. **2013**. On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production. *AMB Express*; 3, **26**.

Booker C.S., Mann J.I. **2008**. Trans fatty acids and cardiovascular health: translation of the evidence base. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*; 18: **448-56**.

Boukaftane Y., Mitchell G.A. **1997**. Cloning and characterization of the human mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase gene. *Gene*, **195(2)**; 121-6.

Breslow J.L. **2006**. n-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* **83**: 1477S-1482S.

Burdge G., **2004**, Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7, **137-44**.

Burr M.L., Fehily A.M., Gilbert J.F., Rogers S., Holliday R.M. **1989**. Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*.; **2(8666)**: 757-61.

Bysted A., Holmer G., Lund P., Sandstrom B., Tholstrup T. **2005**. Effect of dietary fatty acids on the postprandial fatty acid composition of triacylglycerol-rich lipoproteins in healthy male subjects. *Eur J Clin Nutr*; 59: **24-34**.

Caggiula A.W., Mustak V.A. **1997**. Effects of dietary fat and fatty acids on coronary artery disease risk and total and lipoprotein cholesterol concentrations: epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **65**, 1590-1597.

Camarero N., Mascaró C., Mayordomo C., Vilardell F., Haro D., Marrero P.F. **2006**. Ketogenic HMGCS Is ac-Myc target gene expressed in differentiated cells of human colonic epithelium and down-regulated in colon. *Mol Cancer Res*, **4(9)**, 645-53.

Caputo M., Zirpoli H., Torino G., Tecce M.F. **2011**. Selective regulation of UGT1A1 and SREBP-1c mRNA expression by docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids. *J Cell Physiol*; 226(1): **187-93**.

Carpentier Y.A., Portois L., Malaisse W.J. **2006**. n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* **83**: 1499S–1504S.

Caruso D., Risè P., Galella G., Ragazzoni C., Toia A., Galli C. **1994**. Formation of 22 and 24 carbon 6-desaturated arachidonic acid is activated in THP-1 cells at high substrate concentrations. *FEBS Letters*. **343**; 195-199.

Casals N., Roca N., Guerrero M., Gil-Gómez G., Ayté J., Ciudad C.J., Hegardt F.G. **1992**. Regulation of the expression of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coa synthase gene. Its role in the control of ketogenesis, *Biochem J*, **283 (1)**: 261-4.

Chawla A., Repa J.J., Evans R.M., Mangelsdorf D.J. **2001**. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. **294(5548)**: 1866-1870.

Clarke S.D., Turini M., Jump D.B. **1997**. Polyunsaturated fatty acids regulate lipogenic and peroxisomal gene expression by independent mechanisms. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 57, **65–69**.

Clinkenbeard K.D., Reed W.D., Mooney R.A., Lane M.D. **1975**. Intracellular localization of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver. Separate cytoplasmic and mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A generating systems for cholesterologenesis and ketogenesis. *J Biol Chem*. **250(8)**: 3108-16.

Compher C., Setto R.W., Lew J.I., Rombeau J.L. **1997**. Dietary fibre and its Clinical Applications to Enteral Nutrition. In: Rombeau JL, Rolandelli RH, editors. *Clinical Nutrition: Enteral and Tube Feeding*. Philadelphia: WB Saunders; p. **81-95**.

Costa I., Moral R., Solanas M., Andreu F.J., Ruiz de Villa M.C., Escrich E. **2011**. High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression study. *Virchows Arch*; **458**: 141-51.

Cotter D.G., Schugar R.C., Crawford P.A. **2013**. Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **304(8)**: H1060-76.

Crowe F.L., Skeaff C.M., Green T.J., Gray A.R. **2006**. Serum fatty acids as biomarkers of fat intake predict serum cholesterol concentrations in a population-based survey of New Zealand adolescents and adults. *Am J Clin Nutr.* **83(4)**, 887-94.

Dahlbäck B., Nielsen L.B. **2006**. Apolipoprotein M a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* **17(3)**: 291-295.

Di Vincenzo D., Maranz S., Serraiocco A., Vito R., Wiesman Z., Bianchi G. **2005**. Regional variation in shea butter lipid and triterpene composition in four African countries. *J Agric Food Chem*; **53**: 7473-9.

Dyerberg J., Eskesen D.C., Andersen P.W., Astrup A., Buemann B., Christensen J.H., Clausen P., Rasmussen B.F., Schmidt E.B., Tholstrup T., Toft E., Toubro S., Tender S. **2004**. Effects of trans- and n-3 unsaturated fatty acids on cardiovascular risk markers in healthy males. An 8 weeks dietary intervention study. *Eur J Clin Nutr*; **58**: 1062-70.

Eletto D., Leone A., Bifulco M., Tecce M.F. **2005**. Effect of unsaturated fat intake from Mediterranean diet on rat liver mRNA expression profile: selective modulation of genes involved in lipid metabolism. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*; **15(1)**: 13-23.

Erkkilä A., de Mello V.D., Risérus U., Laaksonen D.E. **2008**. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Prog Lipid Res* **47**: 172–187.

Evans J.L. **2011**. Cardiovascular health benefits of the Mediterranean diet targeting oxidized LDL. *Agro Food Industry Hi-Tech* **22**; 40-42.

Ferrucci L., Cherubini A., Bandinelli S., Bartali B., Corsi A., Lauretani F., Martin A., Andres-Lacueva C., Senin U., Guralnik J.M. **2006**. Relationship of Plasma Polyunsaturated Fatty Acids to Circulating Inflammatory Markers, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; **91**; 439–446.

Fruchart J.C. **2013**. Selective peroxisome proliferator-activated receptors modulators (SPPARMs): The next generation of peroxisome proliferator-activated receptor α -agonists. *Cardiovascular Diabetology*, **12**, 82.

Gani O.A., et al. **2008**. Molecular recognition of Docosahexaenoic acid by peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid-X receptor alpha. *J Mol Graph Model*; **27**: 217–24.

Gil G., Goldstein J.L., Slaughter C.A., **1986 a**. Brown M.S. Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from the hamster. I. Isolation and sequencing of a full-length cDNA. *J Biol Chem.* **261(8)**: 3710-6.

Gil G., Goldstein J.L., Brown M.S. **1986 b**. Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from the hamster. II. Isolation of the gene and characterization of the 5' flanking region. *J. Biol. Chem.* **261**; 3717–3724.

Gil-Gomez G., Ayté J., Hegardt F.G. **1993**. The rat mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A-synthase gene contains elements that mediate its multihormonal regulation and tissue specificity. *Eur. J. Biochem.* **213**; 773–779.

Gottlicher M., Widmark E., Li Q., et al. **1992**. Fatty acids activate a chimera of the clofibril acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*; **89**: 4653–4657.

Gotto A.M. **2004**. Contemporary diagnosis and management of lipid disorders. *Newtown, PA: Handbooks in Health Care Company*.

Hahn P., Toller M. **1987**. Ketone formation in the intestinal mucosa of infant rats. *Life Sci*. **41**; 1525–1528.

Hainer V., Kunesova M., Stich V., Zak A., Parizkova J. **1994**. The role of oils containing triacylglycerols and medium-chain fatty acids in the dietary treatment of obesity. The effect on resting energy expenditure and serum lipids. *Cas Lek Cesk*; **133**: 373-5.

Hedgardt M.G., **1999**. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J*, **338** (3); 569-82.

Heggtveit H.A., Nera E.A., Beare-Rogers J.L. **1973**. Cardiotoxic effects of rapeseed oil: histological and biochemical studies. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*; **2**: 449-54.

Hertz R., Magenheim J., Berman I., et al. **1998**. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature*; **392**: 512–516.

Hsu M., Savas U., Griffin K.J., Johnson E.F. **2001**. Identification of Peroxisome Proliferator-responsive Human Genes by Elevated Expression of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor α in HepG2 Cells. *The Journal Of Biological Chemistry*, **27**: 27950–27958.

Hua X., Yokoyama C., Wu J., Briggs M.R., Brown M.S., Goldstein J.L., Wang X. **1993**. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 11603–11607.

Hwang D.H. **2000**. Fatty acids and immune responses, a new perspective in search for clues to mechanism. *Annu Rev Nutr*; **20**: 431–456.

Ido-Kitamura Y., Sasaki T., Kobayashi M., Kim H.J., Lee Y.S., Kikuchi O., Yokota-Hashimoto H., Iizuka K., Accili D., Kitamura T. **2012**. Hepatic FoxO1 integrates glucose utilization and lipid synthesis through regulation of Chrebp O-glycosylation. *PLoS One*. **7**(10): e47231.

Jonker J.W., Stedman C.A., Liddle C., Downes M. **2009**. Hepatobiliary ABC transporters: physiology, regulation and implications for disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*; **14**: 4904-20.

Jump D.B., Clarke S.D., Thelen A., Liimatta M. **1994**. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res*; **35**: 1076-1084.

Jump D.B. **2002**. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription, *Curr Opin Lipidol*; **13**: 155-64.

Jump D.B. **2002**. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*; **277**: 8755–8758.

Jump D.B. **2004**. Fatty acid regulation of gene transcription. *Cric. Rev. Clin. Lab Sci.* **41**: 41–78.

Jump D.B. **2008**. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol*; **19**: 242–247.

Kalish B.T., Fallon E.M., Puder M. **2012**. A Tutorial on Fatty Acid Biology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* **36**: **380-388**.

Knoch B., Barnett M.P., Cooney J., McNabb W.C., Barraclough D., Laing W., Roy N.C. **2010**. Dietary oleic acid as a control fatty acid for polyunsaturated fatty acid intervention studies: a transcriptomics and proteomics investigation using interleukin-10 gene-deficient mice. *Biotechnol J.* **5(11)**, 1226-40.

Kostiuk M.A., Keller B.O., Berthiaume L.G. **2010**. Palmitoylation of ketogenic enzyme HMGCS2 enhances its interaction with PPARalpha and transcription at the Hmgcs2 PPPE. *FASEB J.* **24(6)**: 1914-1924.

Krause A., Sillard R., Kleemeier B., Klüver E., Maronde E., Conejo-García J.R., Forssmann W.G., Schulz-Knappe P., Nehls M.C., Wattler F., Wattler S., Adermann K. **2003**. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. *Protein Sci.* **12(1)**: 143-152.

Kremmyda L.S., Tvrzicka E., Stankova B., Zak A. **2011**. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **155(3)**: 195-218.

Larsson K., Quinn P.J. **1994**. Occurrence and Characteristics of Oils and Fats. In: *The Lipid Handbook*. London: Chapman and Hall; p. 47-223.

Lenihan-Geels G., Bishop K.S., Ferguson L.R. **2013**. Alternative Sources of Omega-3 Fats: Can We Find a Sustainable Substitute for Fish?, *Nutrients*, **5**; 1301-1315.

Li J.J., Huang C.J., Xie D. **2008**. Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Mol Nutr Food Res* **52**: 631–645.

Lichtenstein A.H., Appel L.J., Brands M., Carnethon M., Daniels S., Franch H.A., Franklin B., Kris-Etherton P., Harris W.S., Howard B., Karanja N., Lefevre M., Rudel L., Sacks F., Van Horn L., Winston M., Wylie-Rosett J. **2006**. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* **114**: 82–96.

Lingwood D., Simons K. **2010**. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*; **327**, 46-50.

Liu M.H., Li J., Shen P., Husna B., Tai E.S., Yong E.L. **2008**. A natural polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha hinge region attenuates transcription

due to defective release of nuclear receptor corepressor from chromatin. *Mol Endocrinol.* **22(5)**: 1078-1092.

Marchioli R., Marfisi R.M., Borrelli G., Chieffo C., Franzosi M.G., Levantesi G., Maggioni A.P., Nicolosi G.L., Scarano M., Sillelta M.G., Schweiger C., Tavazzi L., Tognoni G. **2007**. Efficacy of n-3 polyunsaturated fatty acids according to clinical characteristics of patients with recent myocardial infarction: insights from the GISSI-Prevenzione trial. *J of Cardiovascular Medicine*, **8**: S34-S37.

Marszalek J.R., Lodish H.F. **2005**. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **21**, 633-57.

Martinez-Gonzalez M.A., Bes-Rastrollo M. **2014**. Dietary patterns, Mediterranean diet, and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* **25(1)** :20-6.

Martinez-Outschoorn U.E., Lin Z., Whitaker-Menezes D., Howell A., Sotgia F., Lisanti M.P. **2012**. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis, *Cell Cycle*, **11**; 3964–3971.

Mascaró C., Buesa C., Ortiz J.A., Haro D., Hegardt F.G. **1995**. Molecular cloning and tissue expression of human mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, *Arch Biochem Biophys.* **317(2)**: 385-90.

Mensink R.P., Zock P.L., Kester A.D., Katan M.B. **2003**. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* **77**: 1146–1155.

Meertens L.M., Miyata K.S., Cechetto J.D., Rachubinski R.A., Capone J.P. **1998**. A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPARalpha, *Embo J*, **17(23)**; 6972-8

Midzak A., Akula N., Lecanu L., Papadopoulos V. **2011**. Novel androstetriol interacts with the mitochondrial translocator protein and controls steroidogenesis. *J Biol Chem.* **286(11)**:9875-9887.

Miyazaki M., Dobrzyn A., Sampath H., Lee S.H., Man W.C., Chu K., Peters J.M., Gonzalez F.J., Ntambi J.M. **2004**. Reduced Adiposity and Liver Steatosis by Stearoyl-CoA Desaturase Deficiency Are Independent of Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *J Biol Chem*, **279(33)**; 35017-24.

Morel F., Schulz W.A., Sies H. **1994**. Gene structure and regulation of expression of human glutathione S-transferases alpha. *Biol Chem Hoppe Seyler.* **375(10)**: 641-649.

Mosalou I., Zannis V.I., Kardassis D. **2010**. Regulation of human apolipoprotein m gene expression by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. *J Biol Chem.* **285(40)**: 30719-30730.

Mutarelli M., Cicatiello L., Ferraro L., Grober O.M., Ravo M., Facchiano A.M., Angelini C., Weisz A. **2008**. Time-course analysis of genome-wide gene expression data from hormone-responsive human breast cancer cells. *BMC Bioinformatics.* **2**: S12.

Nadal A., Marrero P.F., Haro D. **2002**. Down-regulation of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by insulin: the role of the forkhead transcription factor FKHL1. *Biochem J.* **366(Pt 1)**: 289-297.

Nakamura M.T., Cheon Y., Li Y., Nara T.Y. **2004**. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids.* **39(11)**: 1077-1083.

Nakamura K., Moore R., Negishi M., Sueyoshi T. **2007**. Nuclear pregnane X receptor cross-talk with FoxA2 to mediate drug-induced regulation of lipid metabolism in fasting mouse liver. *J Biol Chem.* **282(13)**: 9768-9776.

Nassa G., Tarallo R., Giurato G., De Filippo M.R., Ravo M., Rizzo F., Stellato C., Ambrosino C., Baumann M., Lietzè N., Nyman T.A., Weisz A. **2014**. Post-transcriptional regulation of human breast cancer cell proteome by unliganded estrogen receptor β via microRNAs. *Mol Cell Proteomics.* **13(4)**: 1076-1090.

Nelson D.L., Cox M.M. **2006**. I principi di biochimica di Lehninger, IV edizione, traduzione di Capini P., Regola E., revisione di Melloni E., Salamino F., Zanichelli editore S.p.A., Bologna (IT)

Osso F.S., Moreira A.S., Teixeira M.T., Pereira R.O., Tavares do Carmo M.G., Moura A.S. **2008**. Trans fatty acids in maternal milk lead to cardiac insulin resistance in adult offspring. *Nutrition*; **24**: 727-32.

Ou J., Tu H., Shan B., et al. **2001**. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci USA*; **98**: 6027–6032.

Pawles E.K.J. **2010**. The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Medical Principles and Practice* **20**; 103-111.

Pawar A., Xu J., Jerks E., et al. **2002**. Fatty acid regulation of liver X receptors (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in HEK293 cells. *J Biol Chem*; **277**: 39243–39250.

Pereira S.L., Huang Y., Bobik E.G., Kinney A.J., Stecca K.L., Packer J.C.L. Mukerj P. **2004**. A Novel Ω 3-Fatty Acid Desaturase Involved In The Biosynthesis Of Eicosapentaenoic Acid. *Biochem. J.* **378**; 665–671.

Petrescu A.D., Hertz R., Bar-Tana J., et al. **2002**. Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4alpha (HNF- 4alpha). *J Biol Chem*; **277**: 23988–23999.

Rakhshandehroo M., Hooiveld G., Müller M., Kersten S. **2009**. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human. *PLoS One.* **4(8)**: e6796.

Raff M., Tholstrup T., Sejrnsen K., Straarup E.M., Wiinberg N. **2006**. Diets rich in conjugated linoleic acid and vaccenic acid have no effect on blood pressure and isobaric arterial elasticity in healthy young men. *J Nutr*; **136**: 992-7.

Ratnayake W.M., Galli C. **2009**. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann Nutr Metab.* **55(1-3)**: 8-43.

Reed W.D., Clinkenbeard D., Lane M.D. **1975**. Molecular and catalytic properties of mitochondrial (ketogenic) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase of liver. *J Biol Chem.* **250(8)**: 3117-23.

Riccardi G., Giacco R., Rivellese A.A. **2004**. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*, **23**: 447-56.

Richardson A.J., Puri B.K. **2002**. A randomized double-blind, placebo-controlled study of the effects of supplementation with highly unsaturated fatty acids on ADHD-related symptoms in children with specific learning difficulties, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; **26**, 233-9.

Rissanen T., Voutilainen S., Nyyssönen K., Lakka T.A., Salonen J.T. **2000**. Fish Oil Derived Fatty Acids, Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid, and the Risk of Acute Coronary Events: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study, *Circulation.* **102**, 2677-2679.

Roche H.M., Gibney M.J. **2000**. Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism, *Am J Clin Nutr*, **71**, 232S-7S.

Rodríguez J.C., Gil-Gómez G., Hegardt F.G., Haro D. **1994**. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem.*, **269(29)**: 18767-72.

Rodrigues H.G., Vinolo M.A., Magdalon J., Fujiwara H., Cavalcanti D.M., Farsky S.H., Calder P.C., Hatanaka E., Curi R. **2010**. Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. *Lipids*; **45**: 809-19.

Royo T., Ayté J., Albericio F., Giralt E., Haro D., Hegardt F.G. **1991**. Diurnal rhythm of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Biochem. J.* **280**; 61-64.

Salinas A.E., Wong M.G. **1999**. Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem.* **6(4)**: 279-309.

Salisbury A.C., Chan P.S., Gosch K.L., Buchanan D.M., Spertus J.A. **2011**. Patterns and predictors of fast food consumption after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*; **107(8)**: 1105-10.

Sanders T.A., Oakley F.R., Cooper J.A., Miller G.J. **2001**. Influence of a stearic acid-rich structured triacylglycerol on postprandial lipemia, factor VII concentrations, and fibrinolytic activity in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*; **73**: 715-21.

Schmitz G., Ecker J. **2008**. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research.* **47**, 147-155.

Shaikh S.R. **2012**. Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts. *Journal of Nutritional Biochemistry*; **23**, 101-105.

Shaikh S. R., Jolly C.A., Chapkin R.S. **2012**. n-3 Polyunsaturated fatty acids exert immunomodulatory effects on lymphocytes by targeting plasma membrane molecular organization. *Mol Aspects Med*; **33**, 46–54.

Simopoulos A.P., Leaf A., Salem N.J. **1999**. Essentiality of and recommended dietary intakes from omega-6 and omega-3 fatty acids. *Annals of nutrition & metabolism* **43**; 127-130.

Simopoulos A.P. **2002**. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Journal of the American College of Nutrition*; **6**: 495–505.

Simopoulos A.P. **2006**. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases, *Biomed Pharmacother*, **60**, 502-7.

Stockler S., Opper C., Greinacher A., Hunneman D.H., Korejme G.C., Unkrig C.J., Hanefeld F. **1997**. Decreased platelet membrane anisotropy in patients with adrenoleukodystrophy treated with erucic acid (22:1)-rich triglycerides. *J Inherit Metab Dis*; **20**: 54-8.

Stryer L., Tymoczko J.L., Berg J.M. *Biochimica*. Zanichelli, **1996**.

Tholstrup T., Samman S. **2004**. Postprandial lipoprotein(a) is affected differently by specific individual dietary fatty acids in healthy young men. *J Nutr*; **134**: 2550-5.

Tholstrup T., Marckmann P., Jespersen J., Vessby B., Jart A., Sandstrom B. **1994**. Effect on blood lipids, coagulation, and fibrinolysis of a fat high in myristic acid and a fat high in palmitic acid. *Am J Clin Nutr*; **60**: 919-25.

Tholstrup T., Vessby B., Sandstrom B. **2003**. Difference in effect of myristic and stearic acid on plasma HDL cholesterol within 24 h in young men. *Eur J Clin Nutr*; **57**: 735-42.

Tholstrup T., Marckmann P., Jespersen J., Sandstrom B. **1994**. Fat high in stearic acid favorably affects blood lipids and factor VII coagulant activity in comparison with fats high in palmitic acid or high in myristic and lauric acids. *Am J Clin Nutr*; **59**: 371-7.

Tholstrup T. **2005**. Influence of stearic acid on hemostatic risk factors in humans. *Lipids*; **40**: 1229-35.

van Wijk D.F., Stroes E.S., Kastelein J.J. **2009**. Lipid measures and cardiovascular disease prediction. *Dis Markers* **26**: 209–216.

Velkov T. **2013**. Interactions between Human Liver Fatty Acid Binding Protein and Peroxisome Proliferator Activated Receptor Selective Drugs. *PPAR Res*. 938401.

Vilà-Brau A., De Sousa-Coelho A.L., Mayordomo C., Haro D., Marrero P.F. **2011**. Human HMGCS2 regulates mitochondrial fatty acid oxidation and FGF21 expression in HepG2 cell line. *J Biol Chem*, **286**(23); 20423-30.

Warensjö E., Sundström M.J., Vessby B., Cederholm T., Rise ´rus U. **2008**. Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: A population-based prospective study. *Am J Clin Nutr* **88**: 203–209.

Weber P., Raederstorff D. **2000**. Triglyceride-lowering effect of omega-3 LC polyunsaturated fatty acids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*; **10(1)**, 28-37.

Wolfrum C., Howell J.J., Ndungo E., Stoffel M. **2008**. Foxa2 activity increases plasma high density lipoprotein levels by regulating apolipoprotein M. *J Biol Chem*. **283(24)**: 16940-16949.

Worgall T.S., Johnson R.A., Seo T., et al. **2002**. Unsaturated fatty acid-mediated decreases in sterol regulatory element-mediated gene transcription are linked to cellular sphingolipid metabolism. *J Biol Chem*; **277**: 3878– 3885.

Yokoyama C., Wang X., Briggs M.R., Admon A., Wu J., Hua X., Goldstein J.L., Brown M.S. **1993**. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*; **75**:187–197.

Yoshikawa T., Shimano H., Yahagi N., Ide T., Amemiya-Kudo M., Matsuzaka T., Nakakuki M., Tomita S., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Takahashi A., Sone H., Osuga Ji J., Gotoda T., Ishibashi S., Yamada N. **2002**. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem*. **277(3)**: 1705-11.

Zhang D., Yang H., Kong X., Wang K., Mao X., Yan X., Wang Y., Liu S., Zhang X., Li J., Chen L., Wu J., Wei M., Yang J., Guan Y. **2011**. Proteomics analysis reveals diabetic kidney as a ketogenic organ in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **300(2)**, E287-95.

Zhang L.S., Wang S.Q., Xu W.R., Wang R.L., Wang J.F. **2012**. Scaffold-Based Pan-Agonist Design for the PPAR α , PPAR β and PPAR γ Receptors, *PLoS One*, **7(10)**: e48453.

Zirpoli H., Caputo M., Carraturo A., Torino G., Fazio A., Attya M., Rastrelli L., Tecce M.F. **2012**. Selective action of human sera differing in fatty acids and cholesterol content on in vitro gene expression. *J. Cell. Biochem*. **113(3)**: 815-823.



COLUMBIA UNIVERSITY
MEDICAL CENTER

**Meccanismi molecolari degli effetti mediati da Ildr2 sul
metabolismo lipidico epatico – regolazione dell'attività di
AAC e HMG-CoA reduttasi tramite 14-3-3**

Progetto in corso presso i laboratori della Columbia University di New York, sotto la supervisione del Prof. RL Leibel, nell'ambito del programma di dottorato, che consente esperienze presso laboratori stranieri.

Capitolo I. Immunoglobulin-Like Domain Containing Receptor 2	
1.1 Caratterizzazione.....	65
1.2 Isoforme.....	66
1.3 Metabolismo lipidico e stress del RE.....	66
Capitolo II. Obiettivi del progetto	
2.1 Obiettivi del progetto.....	70
Capitolo III. Risultati e discussione	
3.1 Espressione di Ildr2 dopo infezione con Adenovirus in epatociti primari isolati da topi Ildr2 ^{fl/fl}	72
3.2 Espressione di Ildr2 dopo il knockdown con siRNA.....	73
3.3 Effetto dell'attivazione di AMPK sui livelli di fosforilazione e di proteina totale di ACC in epatociti primari di controllo o overesprimenti Ildr2.....	73
Capitolo IV. Conclusioni	
Conclusioni.....	75
Capitolo V. Materiali e Metodi	
5.1 Perfusione epatica e isolamento di epatociti primari.....	76
5.2 Coltura di epatociti primari.....	76
5.3 Trasfezione con siRNA.....	77
5.4 Trasfezione con plasmide.....	77
5.5 Infezione con Adenovirus.....	77
5.6 Estrazione RNA totale.....	77
5.7 Retrotrascrizione.....	78
5.8 Real Time-PCR (Polymerase Chain Reaction): analisi dei geni target.....	78
5.9 Preparazione delle proteine totali.....	79
5.10 Quantizzazione delle proteine.....	79
5.11 Western Blotting.....	79
5.12 Analisi statistiche.....	80
Bibliografia	
Bibliografia.....	81

1.1 Caratterizzazione

Immunoglobulin-like domain containing receptor 2 è un gene modificato nel diabete in topi obesi. Il diabete di tipo 2 (T2D), caratterizzato da iperglicemia, insulino-resistenza, e relativa deficienza di insulina, rappresenta oltre il 90% dei casi di diabete ed è una delle principali cause di morbilità e mortalità medica. L'obesità è la principale causa del T2D in persone geneticamente predisposte alla malattia.

In uno studio del 2008, sono stati incrociati topi obesi ($Lep^{ob/ob}$), diabete-resistenti C57BL/6J (B6) e diabete-sensibili DBA/2J (DBA), per identificare il gene codificante un intervallo, sul cromosoma 1 di topo, associato ad una riduzione del numero di cellule β e elevato glucosio nel sangue (Dokmanovic-Chouinard *et al.*, 2008). Questo gene, inizialmente designato "Lisch-like", è stato rinominato "immunoglobulin-like domain containing receptor 2" (*Ildr2*) per riflettere le similarità di struttura del dominio conservato con gli altri due membri di questa famiglia genica: *Ildr1* e *Ildr3* (Fig. 1) (Watanabe *et al.*, 2013).

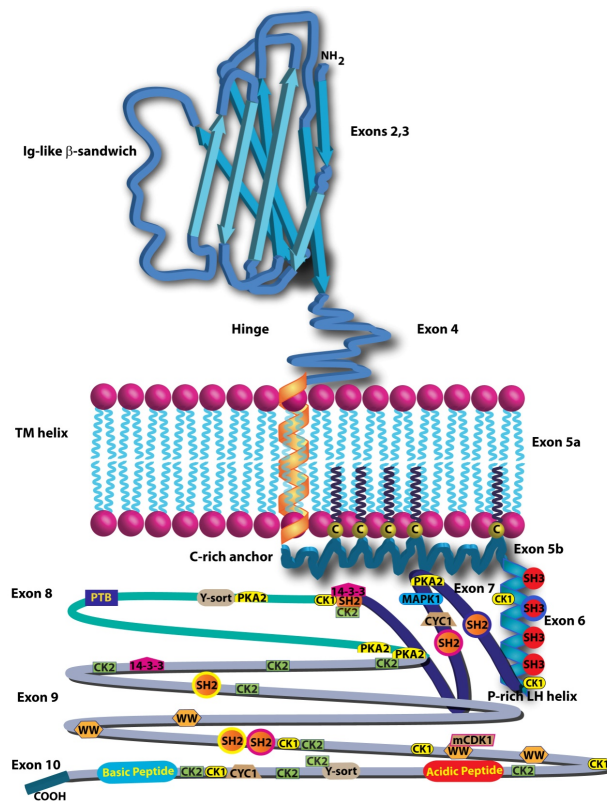


Figura 1. Struttura famiglia Ildr.

Nonostante le loro somiglianze strutturali, i tre geni mostrano ampie divergenze nei profili di espressione tessuto-specifici e nelle loro funzioni. Le principali isoforme di ILDR1 e ILDR3 sono localizzate nella membrana plasmatica o citosol (Hauge *et al.*, 2004; Mesli *et al.*, 2004). Mentre, ILDR2 è localizzato esclusivamente nel reticolo endoplasmatico (RE) (Watanabe *et al.*, 2013).

ILDR1 è legato al deficit uditivo autosomico recessivo (Borck *et al.*, 2011).

ILDR2 è implicato nello sviluppo e sopravvivenza delle cellule β , sembra partecipare nella fisiologia delle lipoproteine e nella risposta allo stress del RE, con conseguenze sull'omeostasi lipidica epatica (Watanabe *et al.*, 2013).

ILDR3, anche chiamato LSR (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor), è stato caratterizzato come un recettore per la tossina del Clostridium (Papatheodorou *et al.*, 2012), come recettore epatico up-regolato dalla leptina (Stenger *et al.*, 2010) e come componente di giunzioni cellulari in cellule epiteliali (Masuda *et al.*, 2011).

1.2 Isoforme

Il gene *Ildr2* è ampiamente espresso, con quattro principali isoforme che sono differenzialmente espresse nei tessuti rilevanti con il fenotipo diabetico (ipotalamo, fegato e cellule β). In particolare, le isoforme 1 e 4 sono principalmente espresse a livello epatico; l'isoforma 2 è maggiormente espressa a livello ipotalamico (Watanabe *et al.*, 2013).

Le quattro maggiori isoforme di ILDR2 (Fig. 2) contengono un dominio amino-terminale immunoglobulina-simile e una lunga coda carbossi-terminale. Le isoforme 1, 2 e 4 contengono anche un singolo dominio trans-membrana (TM). L'isoforma 1 rappresenta la lunghezza completa; l'isoforma 2 è priva dell'esone 6 (carbassi del dominio TM); l'isoforma 4 è priva dell'esone 4 (amino del dominio TM); l'isoforma 3 è priva del dominio TM e di entrambi gli esoni che lo fiancheggiano (Watanabe *et al.*, 2013).

Esistono, inoltre, tre minori isoforme. L'isoforma 5 manca degli esoni 5 e 6; l'isoforma 6 è priva dell'esone 9; l'isoforma 7 è priva degli esoni che vanno da 5 a 9.

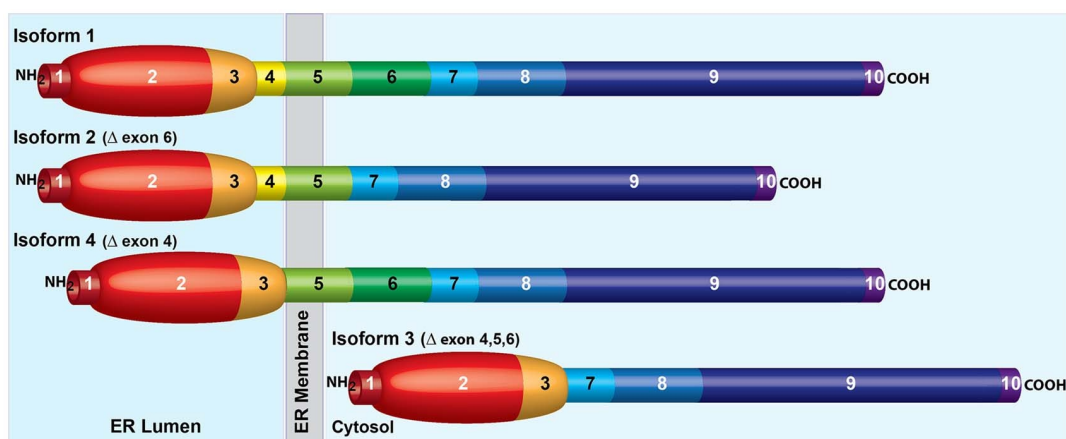


Figura 2. Struttura delle principali isoforme di ILDR2. L'isoforma 1 è a lunghezza intera. Sono stati predetti dieci esoni. L'esone 1 è un peptide segnale amino-terminale; gli esoni 2 e 3 codificano per un dominio immunoglobulinico IgV-simile; l'esone 4 è amino prossimale al dominio trans-membrana dell'esone 5; gli esoni da 6 a 10 formano la coda carbossi-terminale. Gli esoni da 1 a 4 sono lumenali e gli esoni da 6 a 10 sono citosolici. L'isoforma 2 è priva del citosolico esone 6. L'isoforma 4 manca del lumenale esone 4. L'isoforma 3, essendo priva degli esoni 4, 5 e 6, non ha il dominio trans-membrana, ed è raffigurata tutta come citosolica (Watanabe *et al.*, 2013).

1.3 Metabolismo lipidico e stress del RE

L'alterata espressione di *Ildr2* *in vivo* ha effetti sia nel metabolismo lipidico epatico che nella risposta allo stress del RE.

Watanabe *et al.*, hanno condotto uno studio nel 2013 nel quale topi maschi C57BL/6J (wild-tipe; WT) o B6.Cg-Lep^{ob}/J (obesi; OB) sono stati trasdotti con vettori di espressione codificanti shRNA per ottenere il knockdown di *Ildr2* (ADKD), utilizzando LacZ

come controllo; o con costrutti adenovirali contenenti il promotore del citomegalovirus, CMV, per l'overespressione di Ildr2 (ADOX), utilizzando GFP come controllo (Watanabe *et al.*, 2013).

Il fenotipo saliente nei topi ADKD è accumulo di trigliceridi, accompagnato da un aumento del colesterolo epatico e plasmatico, con conseguente aumento di steatosi epatica. L'overespressione di Ildr2 in topi ob/ob riduce sostanzialmente la steatosi epatica, così come si osserva riduzione di trigliceridi e colesterolo totale a livello epatico in topi overesprimenti Ildr2 (Watanabe *et al.*, 2013).

Nonostante l'eccesso di lipidi epatici, a dieci giorni post-trasduzione (p.t.) i livelli dei trascritti dei principali geni lipogenici e coinvolti nella β -ossidazione degli acidi grassi risultano ridotti nei topi AKDK (Fig. 3B) e up-regolati nei topi ADOX (Fig. 3E). A tre giorni p.t., invece, molti di questi geni sono espressi in direzione opposta (Fig. 3A, 3D) (Watanabe *et al.*, 2013), suggerendo che la down-regolazione osservata a dieci giorni p.t. in topi ADKD potrebbe essere una risposta ad un eccessivo accumulo di lipidi (Watanabe *et al.*, 2013).

Tutti insieme, questi risultati implicano fortemente Ildr2 nella patogenesi del diabete di tipo 2 e nel metabolismo lipidico epatico.

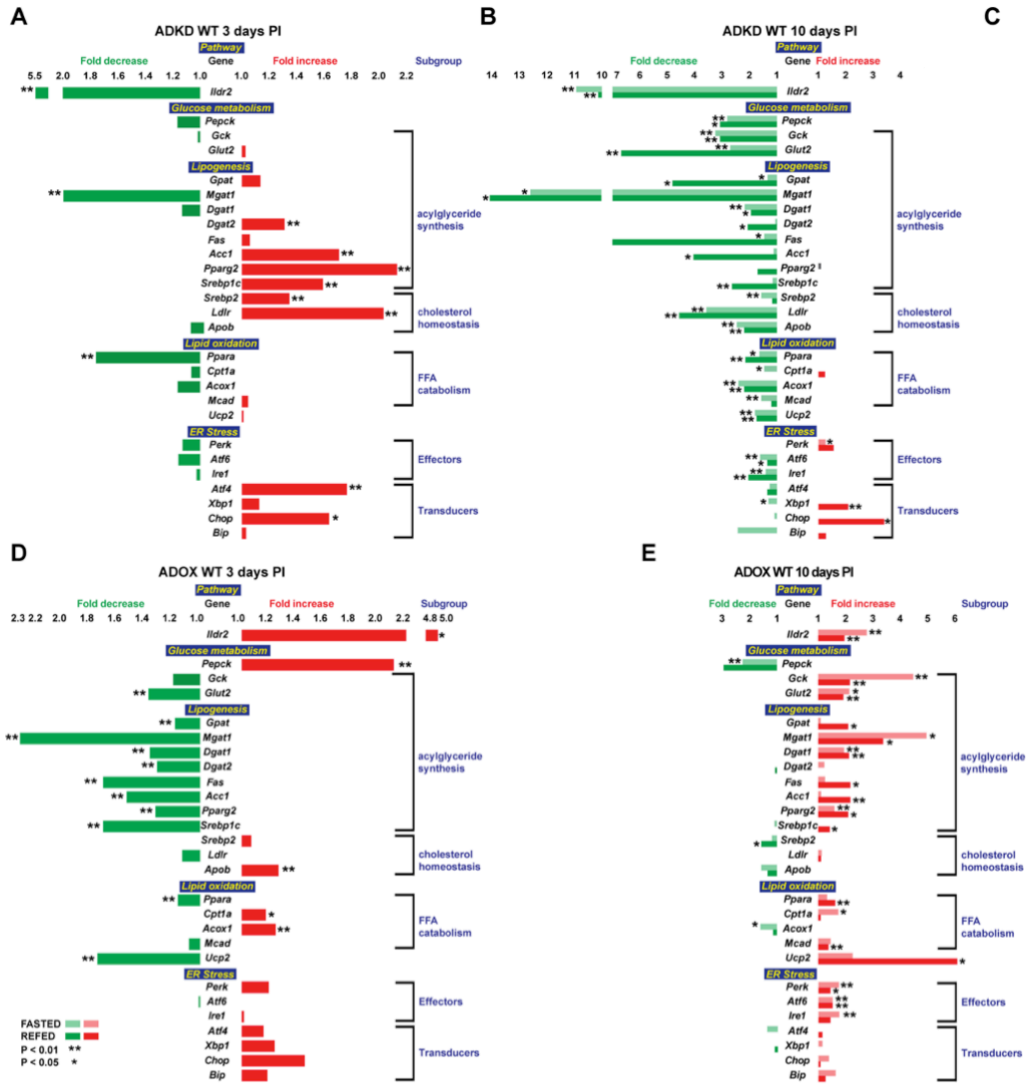


Figura 3. Espressione genica associata al metabolismo lipidico in topi ADKD e ADOX a tre e dieci giorni p.t. (Watanabe *et al.*, 2013).

Inoltre, nei topi ADKD vi è riduzione della clearance epatica delle lipoproteine VLDL/IDL/LDL e aumento del colesterolo IDL/LDL circolante (Watanabe *et al.*, 2013), suggerendo una riduzione della clearance epatica di queste lipoproteine mediata dal recettore per le LDL, consistente con riduzione dell'espressione epatica di tale recettore (Biddinger *et al.*, 2008; Ishibashi *et al.*, 1993).

In questo studio è stata anche osservata up-regolazione dei principali markers di stress del RE nel fegato di topi ADOX (Fig. 4B), e down-regolazione in quello di topi ADKD (Fig. 4A) (Watanabe *et al.*, 2013).

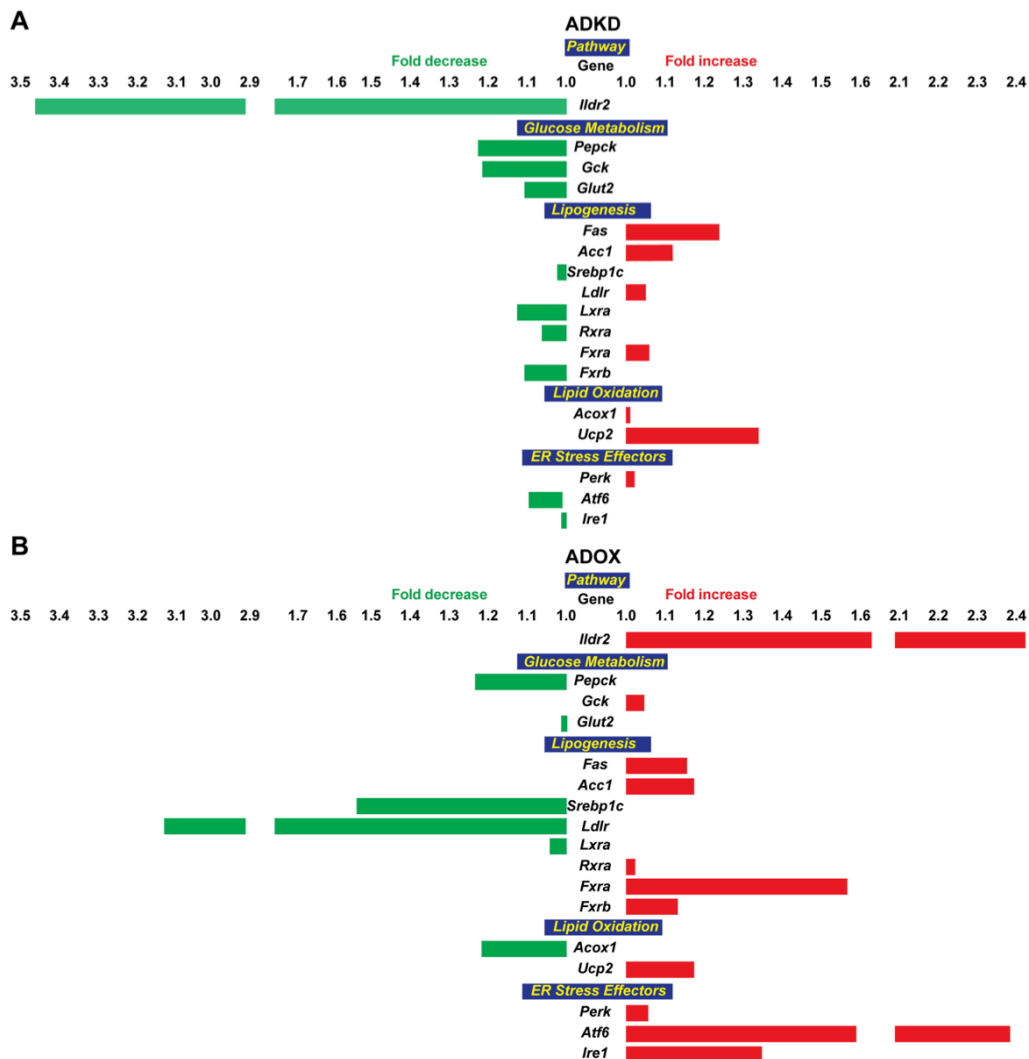


Figura 4. Espressione genica associata a stress del reticolo endoplasmatico in epatociti primari di topi ADKD e ADOX (Watanabe *et al.*, 2013).

Obiettivi del progetto

Questo progetto, in corso di svolgimento, è focalizzato sul delineare i meccanismi molecolari d'azione di Ildr2 utilizzando il metabolismo lipidico epatico come paradigma sperimentale.

Come descritto nel capitolo 1, Ildr2 è una proteina transmembrana del reticolo endoplasmatico. Il dominio citoplasmatico intracellulare di Ildr2 è ricco di residui Serina/Treonina e contiene diversi potenziali siti di legame per le proteine 14-3-3. Questa famiglia di proteine interagisce con proteine che presentano residui di fosfo-Serina/Treonina (Muslin *et al.*, 1996; Yaffe *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2006). Una volta legati, le molecole 14-3-3 regolano i loro ligandi direttamente, modulando la loro attività catalitica, stabilità proteica, localizzazione cellulare, o indirettamente, interessando l'interazione del ligando con altre proteine. Le proteine 14-3-3 sono associate alla regolazione di molte funzioni cellulari, tra cui metabolismo, proliferazione e trafficking cellulare (Kjarland *et al.*, 2006; Meek *et al.*, 2004; Pozuelo Rubio *et al.*, 2004). Acetil-CoA carbossilasi (ACC) e HMG-CoA reduttasi (HMGCR), enzimi chiave nella sintesi *de novo* degli acidi grassi e del colesterolo, rispettivamente, sono entrambi regolati da fosforilazione di residui Ser/Tre, che ne inibisce l'attività enzimatica.

L'ipotesi generale del progetto è che Ildr2 regoli la sintesi epatica di acidi grassi e del colesterolo modulando la fosforilazione e/o i livelli di proteina di ACC e HMGCR attraverso loro interazione con le molecole 14-3-3. Le due possibili modalità di interazione e le conseguenze sull'attività di ACC sono mostrati in figura 5. Gli effetti su questi pathways possono influire sulla funzione cellulare nel fegato, cellule beta e ipotalamo.

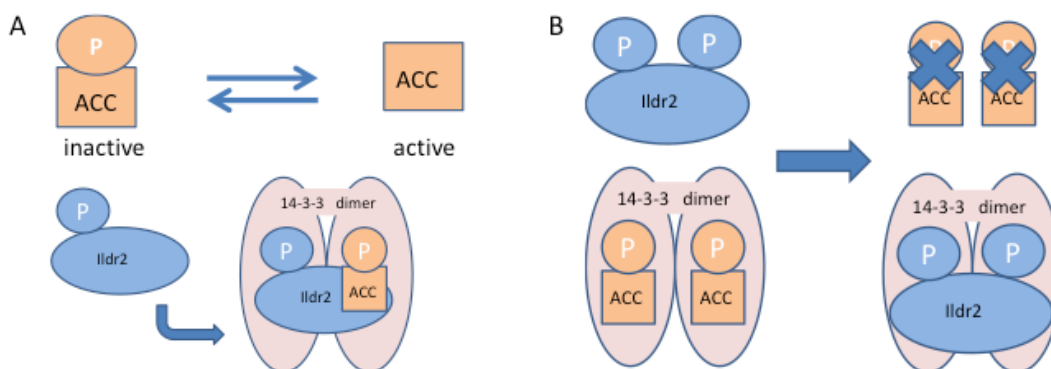


Figura 5. Possibili modalità con cui ILDR2 riduce l'attività di ACC mediante interazione con le molecole 14-3-3, riducendo di conseguenza la sintesi degli acidi grassi. **A)** Modalità 1: ILDR2 promuove il legame di fosfo-ACC a 14-3-3, che attenua la defosforilazione di ACC e lo stabilizza in uno stato inattivo; **B)** Modalità 2: ILDR2 compete per il legame di fosfo-ACC a 14-3-3, che promuove la degradazione del non legato fosfo-ACC.

Quindi, ipotizzando che Ildr2 sopprime la biosintesi epatica di trigliceridi e colesterolo modulando i livelli proteici e/o la fosforilazione di ACC e HMGCR, il primo obiettivo sarà quello di determinare, in epatociti primari isolati da topo, gli effetti dell'alterata espressione di Ildr2 sulle proprietà biochimiche degli enzimi lipogenici chiave, ACC e HMGCR, e il relativo impatto sui livelli di acidi grassi e la sintesi del colesterolo. A tal fine, saranno misurati i livelli della sintesi lipidica (incorporazione di ^{14}C -acetato in trigliceridi e colesterolo), con particolare interesse in condizioni di silenziamento del gene. Saranno determinati gli effetti del knockdown o dell'overespressione di Ildr2 sui livelli di proteina e stato di fosforilazione di ACC e HMGCR, con o senza attivazione di AMP-activated protein

kinase (AMPK) e proteina chinasi A (PKA), che inibiscono l'attività di ACC e HMGCR fosforilando residui di Serina di questi enzimi.

Successivamente, ipotizzando che Ildr2 subisce fosforilazioni Ser/Tre in uno o più potenziali siti di legame per le proteine 14-3-3, e che fosfo-Ildr2 interagisce direttamente con 14-3-3, (Fig. 5), il secondo obiettivo sarà quello di studiare il ruolo della fosforilazione di Ildr2 e la sua interazione con le molecole 14-3-3 nella regolazione della sintesi lipidica epatica. Saranno usati metodi *in silico* e saggi di mutagenesi sito-diretta per l'identificazione di potenziali siti di fosforilazione, su Ildr2, da parte di note protein chinasi Serina/Treonina, ad esempio AMPK e PKA. Mediante saggi di co-immunoprecipitazione saranno determinate possibili interazioni tra Ildr2 e 14-3-3.

Sono stati, innanzitutto, condotti esperimenti preliminari per settare le condizioni ottimali al fine di alterare l'espressione di *Ildr2* in sistemi cellulari *in vitro*.

3.1 Espressione di *Ildr2* dopo infezione con Adenovirus in epatociti primari isolati da topi *Ildr2^{fl/fl}*

Gli epatociti primari isolati dal fegato di topi *Ildr2 floxed (fl/fl)* sono stati trattati con il vettore virale Adenovirus-Cre-GFP (Ad-Cre-GFP) e Adenovirus-GFP (Ad-GFP) come controllo, per 24 h, testando tre differenti MOI, 1, 5, 10. Alla fine dei trattamenti sono stati valutati mediante Real Time-PCR i livelli di espressione dell'mRNA di *Ildr2* isoforma 1 (Fig. 6A) e isoforma 4 (Fig. 6B), e della ricombinate Cre (Fig. 6C). Sono stati analizzati i livelli di espressione di queste due isoforme poiché sono quelle maggiormente presenti a livello epatico. I risultati hanno mostrato, per entrambe le isoforme, una riduzione proporzionale all'incremento di MOI in seguito all'aggiunta di Ad-Cre-GFP, tendente allo zero alla più alta MOI. Per contro, è stato riscontrato un aumento proporzionale all'incremento di MOI in seguito al trattamento con Ad-GFP. Come controllo della corretta esecuzione dell'esperimento, è stato osservato un forte incremento dell'espressione di Cre, in seguito al trattamento con Ad-Cre-GFP, proporzionale all'incremento di MOI.

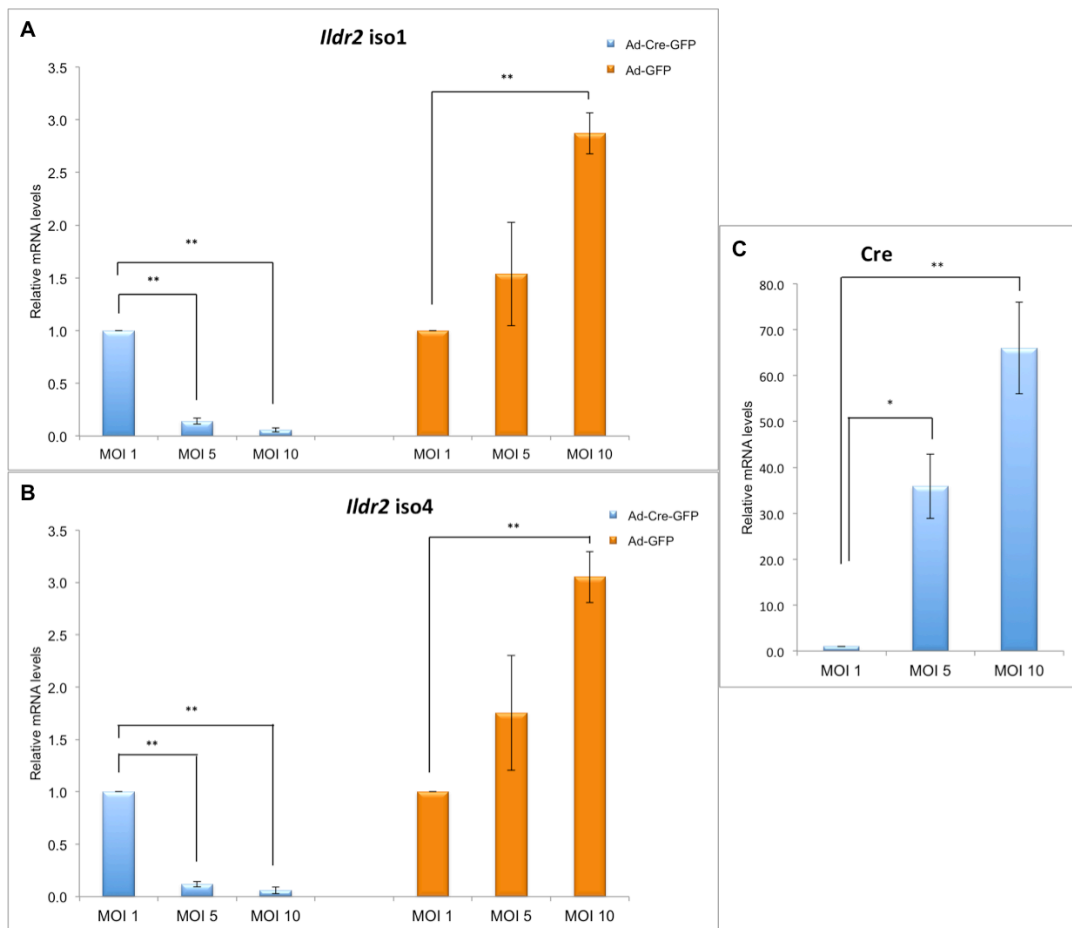


Figura 6. Effetto del trattamento con Adenovirus-Cre-GFP e Adenovirus-GFP sui livelli di espressione del messaggero di Ildr2 isoforma 1 (A) e isoforma 4 (B), e effetto di Adenovirus-Cre-GFP sui livelli di espressione del messaggero di Cre (C). I dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.2 Espressione di Ildr2 dopo il knockdown con siRNA

Gli epatociti primari isolati da topi C57BL/6J, wild tipe, sono stati trattati con il siRNA per Ildr2 e il controllo per tre tempi, 12h, 16h, 24h. Alla fine dei trattamenti sono stati valutati mediante Real Time-PCR i livelli di espressione dell'mRNA di Ildr2 isoforma 1 e isoforma 4. I risultati hanno mostrato che il trattamento con il siRNA per Ildr2 riduce significativamente l'espressione di Ildr2 isoforma 1 (Fig. 7A) e isoforma 4 (Fig. 7B) rispetto al controllo, per i tre tempi. Interessante è anche la significativa differenza che si osserva nel trattamento con Ildr2 siRNA tra 12 h e 16 h, e tra 12 h e 24 h, per l'isoforma 1.

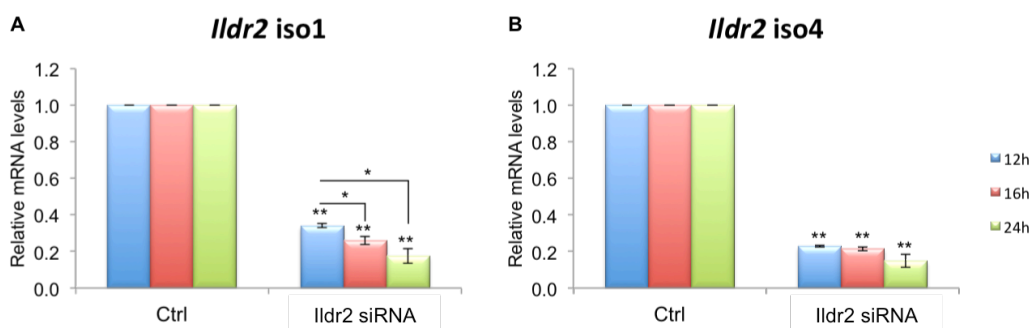


Figura 7. Effetto del trattamento con siRNA per Ildr2 sui livelli di espressione del messaggero di Ildr2 isoforma 1 (A) e isoforma 2 (B). I dati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.3 Effetto dell'attivazione di AMPK sui livelli di fosforilazione e di proteina totale di ACC in epatociti primari di controllo e overesprimenti Ildr2.

Gli epatociti primari isolati da topi C57BL/6J, wild tipe, sono stati trasfettati con il plasmide overesprimente Ildr2 o LacZ come controllo per 40h, poi trattate con AICAR 1mM per 0,5 ore. Alla fine dei trattamenti sono state isolate le proteine totali e i livelli di espressione della proteina ACC e dello stato di fosforilazione della stessa sono stati valutati mediante analisi Western Blot, utilizzando α -tubulina come controllo per la normalizzazione (i risultati sono stati riportati in isogramma). AICAR è un attivatore di AMPK, che a sua volta fosforila ACC, inattivandola. I risultati hanno mostrato che l'overespressione di Ildr2 ha effetti sia sul livello della proteina totale (Fig. 8B) che sullo stato di fosforilazione di ACC (Fig. 8A). Una relazione inversa tra il livello proteico di ACC e lo stato di fosforilazione è stato osservato in entrambe le condizioni, cellule overesprimenti Ildr2 e dopo l'attivazione di AMPK con l'attivatore AICAR.

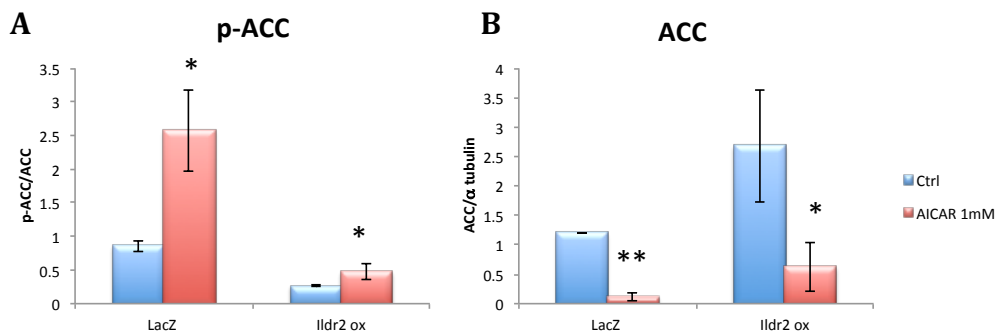


Figura 8. Effetto dell'attivatore di AMPK (AICAR) sui livelli di fosforilazione (A) e di proteina totale (B) di ACC in epatociti primari di controllo e overesprimenti Ildr2. L'immagine è rappresentativa di tre replicati biologici.

Conclusioni

Il diabete è una delle principali cause di morbilità e mortalità medica. Ildr2 sembra svolgere un ruolo importante nella sopravvivenza delle cellule beta e nella steatosi epatica. Lo studio proposto dovrebbe fornire una conoscenza potenziale dei meccanismi cellulari che conferiscono questi fenotipi. La manipolazione di Ildr2, i pathways e le molecole target di Ildr2, potrebbero fornire nuove strategie per la gestione delle condizioni associate alla sindrome metabolica.

Nei dati preliminari mostrati, è stato osservato il coinvolgimento di Ildr2 nell'attivazione di ACC, enzima chiave nella sintesi *de novo* degli acidi grassi, confermando, quindi, il coinvolgimento di Ildr2 in questo sistema, a sostegno dell'idea che Ildr2 potrebbe regolare la biosintesi epatica di trigliceridi modulando i livelli proteici e/o la fosforilazione di ACC.

5.1 Perfusion e epatica e isolamento di epatociti primari

Gli epatociti sono stati isolati da topi maschi C57BL/6J, wild tipe, di 8-10 settimane di età. Gli animali sono stati anestetizzati con una somministrazione combinata per via intraperitoneale di xilazina e ketamina diluita 1:5 in PBS, somministrando 10 μ l per grammo di peso corporeo per ciascun topo. Dopo l'anestesia è stata effettuata un'incisione della parete addominale. Il fegato è stato perfuso attraverso la vena porta con 40 ml di EGTA-buffer a 37 °C. L'EGTA-buffer consiste di 248 mL di soluzione di glucosio (9 g/L D-glucose), 40 mL KH-buffer (60 g/L NaCl, 1.75 g/L KCl, e 1.6 g/L KH₂PO₄; portato a pH 7.4), 40 mL HEPES-buffer (60 g/L HEPES; portato a pH 8.5), 60 mL soluzione di aminoacidi (0.27 g/L L-alanina, 0.14 g/L L-acido aspartico, 0.4 g/L L- asparagina, 0.27 g/L L-citrullina, 0.14 g/L L-cisteina, 1 g/L L-istidina, 1 g/L L-acido glutammico, 1 g/L L-glicina, 0.4 g/L L-isoleucina, 0.8 g/L L- leucina, 1.3 g/L L-lisina, 0.55 g/L L-metionina, 0.65 g/L L-ornitina, 0.55 g/L L-fenilalanina, 0.55 g/L L-prolina, 0.65 g/L L-serina, 1.35 g/L L- treonina, 0.65 g/L L-triptofano, 0.55 g/L L-tirosina, 0.8 g/L L-valina; gli aminoacidi che non venivano dissolti a pH neutro, sono stati solubilizzati aggiungendo NaOH 10 N a pH 11.0 e aggiustando a pH 7.6), 2 mL soluzione di glutamina (7 g/L L-glutamina) e 0.8 mL di soluzione EGTA (47.5 g/L EGTA, sciolta con NaOH, e portata a pH 7.6). All'inizio di questa prima fase di perfusione viene effettuata un'incisione sulla vena cava addominale per consentire il deflusso del sangue e della soluzione fino a quando il fegato risulta uniformemente sbiancato.

Dopo questa prima fase la perfusione è stata continuata con 100 ml di una soluzione di collagenasi a 37 °C, composta da: 155 mL di una soluzione di glucosio, 25 mL KH-buffer, 25 mL HEPES-buffer, 38 mL soluzione di aminoacidi, 10 mL di soluzione di CaCl₂ (19 g/L CaCl₂ x 2 H₂O), 2.5 mL di soluzione di glutamina, e 90 mg di collagenasi tipo IV (Gibco, Grand Island, NY, USA).

Dopo la perfusione il fegato è stato rimosso e dissociato in una soluzione di sospensione (124 mL di soluzione di glucosio, 20 mL KH buffer, 20 mL HEPES buffer (pH 7.6), 30 mL soluzione di aminoacidi, 2 mL soluzione di glutamina, 1.6 mL soluzione di CaCl₂, 0.8 mL di soluzione MgSO₄ (24.6 g/L MgSO₄ x7 H₂O) e 0.4 g di albumina sierica bovina.

La sospensione di epatociti così ottenuta è stata filtrata attraverso un filtro con pori di diametro di 100 μ m e centrifugata per 1 min a 50 x g. Il pellet cellulare è stato poi lavato due volte con soluzione di sospensione, ricentrifugato, e risospeso in 30 mL di soluzione di sospensione.

La vitalità cellulare è stata valutata attraverso un saggio di colorazione con trypan blue, un colorante in grado di attraversare la membrana delle cellule morte, colorandole di blu. Solo le sospensioni di epatociti ottenute con una vitalità maggiore dell'80% sono state considerate per gli esperimenti successivi.

5.2 Coltura di epatociti primari

Gli epatociti così ottenuti sono stati seminati in piastre da 12 pozzetti rivestite con collagene ad una densità di 5×10^5 cellule/pozzetto, in 2 ml di terreno di coltura William's E Medium (WME) addizionato con 10 % siero fetale bovino, 100 unità/mL penicillina, 0.1 mg/mL streptomina, 10 μ g/mL gentamicina, e 100 nM dexametasone, e incubate per 3-6 ore a 37 °C e 5 % CO₂. Dopo tale periodo le cellule sono state lavate con WME a 37 °C per irrimuovere le cellule morte.

5.3 Trasfezione con siRNA

È stata effettuata la trasfezione con lipofectamina (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

Le cellule, epatociti primari isolati da topi C57BL/6J, wild tipe, sono state piastrate il giorno prima della trasfezione.

Per ogni campione sono state diluite 40 pmol di siRNA (Ildr2 siRNA e siRNA di controllo) in 100 μ l di Opti-MEM® I Reduced Serum Medium.

Successivamente, sono stati diluiti 3 μ l di Lipofectamine® 2000 in 100 μ l di Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, che sono stati incubati per 5 minuti a temperatura ambiente.

Dopo l'incubazione di 5 minuti, l'oligomero diluito e la Lipofectamine® 2000 diluita sono stati uniti, e sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente.

I complessi oligomero-Lipofectamine® 2000 sono stati aggiunti ad ogni pozzetto contenenti cellule e mezzo. Le cellule sono state incubate a 37 ° C in un incubatore a CO₂ per 12 h, 16 h e 24 h.

5.4 Trasfezione con plasmide

È stata effettuata la trasfezione con lipofectamina (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

Le cellule, epatociti primari isolati da topi C57BL/6J, wild tipe, sono state piastrate il giorno prima della trasfezione.

Per ogni campione è stato diluito 1 μ g di DNA in 100 μ l di Opti-MEM® I Reduced Serum Medium. Sono stati utilizzati i seguenti vettori: pcDNA_DEST40_Ildr2-iso1 e pcDNA_GW40_lacZ come controllo.

Successivamente, sono stati diluiti 3 μ l di Lipofectamine® 2000 in 100 μ l di Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, che sono stati incubati per 5 minuti a temperatura ambiente.

Dopo l'incubazione di 5 minuti, il DNA diluito e la Lipofectamine® 2000 diluita sono stati uniti, e sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente.

I complessi DNA-Lipofectamine® 2000 sono stati aggiunti ad ogni pozzetto contenenti cellule e mezzo. Le cellule sono state incubate a 37 ° C in un incubatore a CO₂. Dopo 16 h il mezzo è stato sostituito con terreno di coltura fresco, e le cellule sono state incubate per ulteriori 24 h. Al termine delle 24 h, ad ogni pozzetto è stato aggiunto l'attivatore di AMPK, AICAR (St. Louis, MO, USA) 1mM per 0,5 ore, o il veicolo (H₂O) in cui è disciolta la sostanza, come controllo.

5.5 Infezione con Adenovirus

Le cellule, epatociti primari isolati da topi Ildr2 *floxed* (Ildr2^{*fl/fl*}), sono state infettate, il giorno dopo la semina, con Adenovirus-Cre-GFP (Ad-Cre-GFP, PFU 2.5x10¹⁰/ml) e Adenovirus-GFP (Ad-GFP, PFU 2.5x10¹⁰/ml) come controllo, per 24, considerando tre differenti MOI (molteplicità di infezione): 1, 5, 10.

5.6 Estrazione RNA totale

Dopo i tempi specifici di trattamento, è stato allontanato il mezzo di coltura e sono stati effettuati due lavaggi con PBS 1X. In ogni piastra è stato aggiunto un opportuno volume di TriZOL (Invitrogen Co.); dopo aver omogenato, si è proceduto alla purificazione dell'RNA mediante cloroformio. Successivamente si è realizzata la precipitazione dell'RNA con alcool isopropilico. Il pellet di RNA totale è stato lavato con etanolo al 75% e lasciato

asciugare. Infine, il pellet è stato solubilizzato in H₂O DEPC (acqua trattata con dietil-pirocarbonato (Sigma) per inibire l'azione dell'RNasi).

Terminata l'estrazione, è stata controllata l'integrità dell'RNA su gel all'1,2% di agarosio (Sigma). Nel gel è stato aggiunto Etidio Bromuro (0.5 µg/µL) (Sigma) che ha permesso la visualizzazione dell' RNA, quando esposto ad una lampada UV.

L'RNA è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm.

5.7 Retrotrascrizione

Le reazioni di trascrizione inversa sono state eseguite a partire da 3 µg di RNA totale.

È stata preparata una miscela di reazione iniziale avente: 3 µg di RNA, 1 µL di 0.5 µg/µL Random primer e 1 µL di 10 mM (ciascuno) dNTP mix in un volume totale di 13 µL.

La mix è stata incubata per 5 minuti a 65 °C, posta in ghiaccio, sono stati aggiunti ad essa 4 µL di 5× RT buffer e 2 µL di 0.1 M ditiotreitolo (Invitrogen Co.). Successivamente la miscela è stata incubata per 2 minuti a 25°C ed è stato aggiunto 1 µL di enzima Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase. Sono seguite una fase di 10 minuti a 25°C, una fase di 50 minuti a 42°C e uno stadio di disattivazione dell'attività dell'enzima di 15 minuti a 70 °C. Infine, sono stati aggiunti 2 µL RNase H (Invitrogen Co.) che insieme alla successiva incubazione a 37°C per 20 minuti, hanno avuto come scopo quello di eliminare gli ibridi di RNA/cDNA.

5.8 Real Time-PCR (Polymerase Chain Reaction): analisi dei geni target

Gli esperimenti di Real-Time PCR sono stati condotti utilizzando la mix di reazione LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Applied Science, Germany) contenente l'agente intercalante SYBR Green. Il segnale di fluorescenza, dovuto al SYBR Green, è stato monitorato per quantizzare i prodotti di amplificazione specifici in ogni ciclo di PCR mediante LyghtCycler con software 3.5.3 (Roche Applied Science, Germany).

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate con una miscela contenente il cDNA ottenuto, 8 µL della mix di reazione avente SYBR Green, 1 µL di ogni specifica coppia di primer (PRIMM, Milan, Italy), ed acqua PCR grade (Roche) per un volume finale di 16 µL.

Sono state utilizzate le seguenti coppie di primers:

- GAPDH
Fw: 5' – CTG GAG AAA CCT GCC AAG TAT GAT G – 3'
Rv: 5' – GAG ACA ACC TGG TCC TCA GTG TAG C – 3'
- Ildr2 iso1
Fw: 5' – GAT TAT GCC AGA GTG GGT GTT TGT C – 3'
Rv: 5' – CCC TGC TTC ATA CAA GGC CTG AG – 3'
- Ildr2 iso4
Fw: 5' – AAC AGG GCT CGA CGG TTAC – 3'
Rv: 5' – AAC ACC CAC TCC AAC ACC AG – 3'
- Cre
Fw: 5' – GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC – 3'
Rv: 5' – GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT – 3'

Per ogni reazione è stato effettuato un ciclo di preincubazione a 95 °C per 10 minuti, seguito da 40 cicli di denaturazione a 95 °C per 10 secondi, appaiamento a 58 °C per 30 secondi ed estensione a 72 °C per 15 secondi. È stata valutata la specificità della reazione analizzando la curva di melting ottenuta per ogni amplificato. È stato usato il metodo della curva standard, confrontando i valori ottenuti nei campioni derivati da cellule trattate

rispetto ai campioni delle cellule di controllo. Il test è stato condotto su almeno 3 replicati tecnici e 3 replicati biologici. La significatività statistica è stata calcolata mediante t_{student} test.

5.9 Preparazione delle proteine totali

- Procedura di estrazione

Dopo aver allontanato il mezzo dalla piastra sono stati effettuati due lavaggi con PBS 1X.

In ogni piastra è stato poi aggiunto un opportuno volume di tampone di lisi cellulare RIPA Buffer e successivamente la piastra è stata incubata sul ghiaccio per 15 minuti.

Di seguito, con lo *scraper* le cellule sono state staccate dal fondo della piastra, raccolte in tubi da microfuge (eppendorf) e centrifugate a 12000 rpm per 15 minuti a 4°C.

Il soprannatante è allontanato e conservato a -80°C.

- Composizione RIPA buffer

Tris/HCl 50 mM (Sigma); NaCl 150 mM; inibitori di proteasi (Aprotinina 10 µg/ml, PMSF 1 mM, Leupeptina 10 µg/ml, Na₃VO₄ 2 mM, EDTA 1 mM (Sigma), NaF 1 mM); Na Pirofosfato 10 mM; NP-40 (IGEPAL) 1%; Na deossicolato 0,25%.

5.10 Quantizzazione proteine

Dopo la lisi le proteine totali sono state quantizzate mediante *Biorad Protein Assay* usando come standard BSA 1mg/ml.

5.11 Western Blotting

I. Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato

Le analisi di Western Blotting sono state effettuate caricando trenta microgrammi di proteine totali da ciascun estratto.

I campioni proteici sono stati bolliti per 5 minuti in un tampone (sample-buffer) contenente SDS (Sigma), β-mercaptoetanol (Sigma) ed il colorante blu di bromofenolo (Biorad).

La separazione elettroforetica avviene a 100 V a voltaggio costante su gel al 15% di SDS-poliacrilammide.

II. Elettroblotting

Dopo la corsa elettroforetica le proteine devono essere trasferite dal gel al filtro di nitrocellulosa. Questo trasferimento avviene applicando una corrente di 100 V per 1 ora.

Dopo il trasferimento, per verificare la presenza delle proteine sulla membrana (GE Healthcare) si immerge quest'ultima in una soluzione di Rosso Ponceau (Sigma) e si lava con acqua.

III. Rilevazione delle proteine

La membrana è stata incubata prima per 1h in una soluzione al 5% di latte in polvere senza grassi (MILK Non-fat Dry, BIO-RAD) in PBS-TWEEN 0,1% a temperatura ambiente (blocking) e poi con anticorpi contro ILDR2 di topo diluito 1: 700, contro ACC (Cell Signaling, # 3676), contro fosfo-ACC (Cell Signaling, # 11818) che viene lasciato agire over-night a 4 ° C.

Dopo sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS-TWEEN 0,1% v/v da dieci minuti ciascuno ed il filtro è stato incubato con un anticorpo secondario (anti-rabbit diluito 1:10000) legato ad un enzima, la perossidasi di rafano. L'anticorpo contro la β-actina è stato utilizzato come controllo per la normalizzazione.

Sono stati ripetuti i 3 lavaggi con PBS-TWEEN 0,1% da dieci minuti ciascuno ed è stato applicato ECL (Enhanced ChemiLuminescence, metodo della chemiluminescenza intensificata, GE Healthcare).

La luce emessa, infine, è stata rilevata esponendo la membrana ad una lastra fotografica. Le immagini digitali sono state ottenute mediante utilizzo dello strumento ImageDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Ogni trattamento è stato eseguito almeno in triplicato biologico.

5.12 Analisi statistiche

I risultati ottenuti e discussi nel capitolo successivo rappresentano la media di duplicati biologici (somministrazioni *in vitro*) e triplicati tecnici (dosaggio RNA messaggero).

La significatività statistica è stata calcolata mediante test *t* di Student. I valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Bibliografia

Biddinger S.B., Hernandez-Ono A., Rask-Madsen C., Haas J.T., Aleman J.O., et al. **2008**. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab* **7**: 125–134.

Borck G., Ur Rehman A., Lee K., Pogoda H.M., Kakar N., et al. **2011**. Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. *Am J Hum Genet* **88**: 127–137.

Dokmanovic-Chouinard M., Chung W.K., Chevre J.C., Watson E., Yonan J., et al. **2008**. Positional cloning of “Lisch-Like”, a candidate modifier of susceptibility to type 2 diabetes in mice. *PLoS Genet* **4**: e1000137.

Hauge H., Patzke S., Delabie J., Aasheim H.C. **2004**. Characterization of a novel immunoglobulin-like domain containing receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **323**: 970–978.

Ishibashi S., Brown M.S., Goldstein J.L., Gerard R.D., Hammer R.E., et al. **1993**. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* **92**: 883–893.

Kjarland E., Keen T.J., Kleppe R. **2006**. Does isoform diversity explain functional differences in the 14-3-3 protein family? *Curr. Pharm. Biotechnol.* **7**, 217-223.

Meek S.E., Lane W.S., Piwnica-Worms H. **2004**. Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 32046-32054.

Mesli S., Javorschi S., Berard A.M., Landry M., Priddle H., et al. **2004**. Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR2/2 embryos at 12.5 to 14.5 days of gestation. *Eur J Biochem* **271**: 3103–3114.

Masuda S., Oda Y., Sasaki H., Ikenouchi J., Higashi T., et al. **2011**. LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci* **124**: 548–555.

Muslin A.J., Tanner J.W, Allen P.M., Shaw A.S. **1996**. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell.* **84(6)**: 889-97.

Papatheodorou P., Wilczek C., Nolke T., Guttenberg G., Hornuss D., et al. **2012**. Identification of the cellular receptor of Clostridium spiroforme toxin. *Infect Immun* **80**: 1418–1423.

Pozuelo Rubio M., Geraghty K.M., Wong B.H., Wood N.T., Campbell D.G., Morrice N., Mackintosh C. **2004**. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem. J.* **379**, 395-408.

Stenger C., Hanse M., Pratte D., Mbala M.L., Akbar S., et al. **2010**. Up-regulation of hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor by leptin: a potential lever for controlling lipid clearance during the postprandial phase. *FASEB J* **24**: 4218– 4228.

Watanabe K., Watson E., Cremona M.L., Millings E.J., Lefkowitz J.H., Fischer S.G., LeDuc C.A., Leibel R.L. **2013**. ILDR2: an endoplasmic reticulum resident molecule mediating hepatic lipid homeostasis. *Plos One* **8(6)**: e67234.

Yaffe M.B., Rittinger K., Volinia S., Caron P.R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S.J., Smerdon S.J., Cantley L.C. **1997**. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*. **91(7)**: 961-71.

Yang X., Lee W.H., Sobott F., Papagrigoriou E., Robinson C.V., Grossmann J.G., Sundström M., Doyle D.A., Elkins J.M. **2006**. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103(46)**: 17237-42.

Ringraziamenti

Al termine di questi tre anni di dottorato desidero ringraziare tutte le persone che a vario titolo mi hanno accompagnato in questo percorso e che hanno reso possibile la realizzazione di questo lavoro di tesi.

Innanzitutto ringrazio il mio tutor, il prof. Mario Felice Tecce, per aver riposto fiducia in me e nelle mie capacità dandomi la possibilità di svolgere il mio progetto di ricerca, e per avermi costantemente seguita durante questi anni.

Ringrazio il collegio docenti e la coordinatrice di dottorato, la prof.ssa Antonietta Leone, che hanno seguito in modo attento l'organizzazione delle attività del programma di studio.

Ringrazio la dott.ssa Mariella Caputo per avermi trasmesso l'amore per la ricerca e per essersi sempre mostrata disponibile ad offrirmi il proprio preziosissimo contributo teorico e metodologico, ma anche per avermi sempre supportata oltre il rapporto lavorativo, permettendo l'istaurarsi di un'amicizia.

Ringrazio la dott.ssa Hylde Zirpoli per avermi appoggiata soprattutto nel mio periodo statunitense, durante il quale mi ha sempre consigliato e si è sempre mostrata come punto di riferimento, facendomi sentire un po' a casa.

Ringrazio il gruppo delle uscite del martedì/mercoledì e non solo: Vittoria Iorio, Margot De Marco, Raffaella D'Auria, Anna Gorrasi, Donatella Fiore, Luana Guerriero, Dario Gallotta, Roberta Cotugno, Alessandra Rosati, Roberta Esposito, per tutti i piacevoli momenti che abbiamo condiviso e per aver reso familiare l'ambiente in cui ho lavorato in questi anni.

Ringrazio le mie coinquiline di questi anni ed i miei amici più cari sui quali ho sempre potuto fare affidamento.

Ringrazio il prof. R. L. Leibel della Columbia University di New York che mi ha permesso di lavorare nel proprio gruppo di ricerca. Questo periodo ha rappresentato una importante fase formativa.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori e a mio fratello per aver sempre creduto nelle mie capacità e sostenuto le mie scelte, per non avermi mai fatto mancare il proprio sostegno morale e amore, senza il quale nulla sarebbe stato possibile.

Maria Caterina