



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA SPERIMENTALE

XXI CICLO

Ruolo protettivo di Timp-3 nei confronti della steatosi epatica
indotta da obesità

Alessia Vivanti

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof. Massimo Federici

Coordinatore: Prof. Renato Lauro

“מים רבים לא יוכלו לכבות את האהבה
ונהרות לא ישטפוה”

*“Le grandi acque non possono spegnere l'amore né
i fiumi travolgerlo”.*

(Cantico dei Cantici Cap. 8 verso 7)

A coloro che amano con sincerità e si appassionano.

INDICE

LISTA PAROLE CHIAVE	5
SOMMARIO	6
ABSTRACT	7
INTRODUZIONE	8
1. IL METABOLISMO ED IL SISTEMA IMMUNE	8
1.1. L'INSULINA E LA TRASDUZIONE DEL SUO SEGNALE	10
1.2. FUNZIONI DELL'INSULINA	13
1.2.1. Funzioni PI3K-indipendenti	13
a) Ruolo mitogenico	13
b) Ruolo nella regolazione dell'assorbimento del glucosio	13
1.2.2. Funzioni PI3K-dipendenti	14
a) AS160 e l'assorbimento del glucosio	14
b) GSK3 e la glicogeno sintesi	16
c) FOXO1, la gluconeogenesi, la glicolisi e l'omeostasi lipidica	16
d) mTOR e la sintesi proteica	18
1.3. SPEGNIMENTO DEL SEGNALE INSULINICO	19
1.4. OBESITA', INFIAMMAZIONE E INSULINO-RESISTENZA	21
1.4.1. L'insulino resistenza	21
1.4.2. Meccanismi infiammatori d'induzione dell'insulino-resistenza	22
a) Citochine infiammatorie e lipidi	22
b) Stress del Reticolo Endoplasmatico (ER)	25
c) Stress ossidativo	26
d) Disfunzioni mitocondriali	26
e) Altri mediatori di infiammazione: SOCS ed iNOS	27
1.5. STEATOSI EPATICA E NAFLD	28
1.5.1. Metabolismo della metionina e disfunzioni epatiche	31
1.6. METALLOPROTEASI	35
1.6.1. <i>Shedding</i>	35
1.6.2. <i>A Disintegrin And Metalloprotease-17 (ADAM-17)</i>	39
1.6.3. Metalloproteasi di matrice (MMP)	41
1.6.4. Inibitori tissutali di metalloproteasi (TIMP)	43
2. PROTEOMICA SHOTGUN	46
2.1. CROMATOGRAFIA	47
2.2. SPETTROMETRIA DI MASSA	49
2.2.1. Spettrometro di massa	50
a) Sorgente ESI	51
b) Analizzatori a raggio	53
- Analizzatori a quadruplo (Q)	53
- Analizzatori a tempo di volo (TOF)	54
2.2.2. Spettrometria di massa tandem	56
MATERIALI E METODI	59
1. MODELLO ANIMALE	59
2. ANALISI METABOLICHE IN VIVO	60

2.1. Misurazione del peso e della glicemia.....	60
2.1. Determinazione dei livelli insulinici	60
2.2. Curve glicemiche	61
3. ANALISI ISTOLOGICA	61
4. ANALISI PROTEOMICA	62
4.1. Preparazione del campione.....	62
4.2. LC-ESI-MS/MS.....	63
5. ANALISI BIOINFORMATICA.....	65
6. ANALISI BIOCHIMICHE	66
6.1. Western blot	66
6.1.1. Anticorpi.....	68
6.2. Oxyblot.....	68
6.4. Coomassie	69
SCOPO DELLA TESI	70
RISULTATI	71
La deficienza di Timp-3 potenzia l'insulino-resistenza e la steatosi epatica indotta da HFD	71
Analisi proteomica: proteine differenzialmente espresse nel fegato di topi Timp-3 ^{-/-} ad HFD	74
Analisi bioinformatica: associazioni funzionali tra le proteine identificate	76
La deficienza di Timp-3 altera il metabolismo della metionina.....	80
L'assenza di Timp-3 potenzia lo stress ossidativo indotto dall'obesità	83
DISCUSSIONE	87
CONCLUSIONI.....	94
BIBLIOGRAFIA.....	95
RINGRAZIAMENTI.....	111

LISTA PAROLE CHIAVE

Metabolismo

Obesità

Infiammazione

Stress ossidativo

Disfunzioni mitocondriali

Insulino-resistenza

NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*)

ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*)

TACE (*Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme*)

Timp-3 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3)

SOMMARIO

Timp-3, in quanto inibitore fisiologico di metalloproteasi di matrice (MMP) e di TACE (TNF-alpha Converting Enzyme), ha un importante ruolo nella regolazione dell'attività immunitaria e conseguentemente nell'omeostasi metabolica. Nell'ambito del nostro laboratorio è stato recentemente scoperto che la diminuzione di tale proteina, in concomitanza con l'aploinsufficienza del recettore insulinico, potenzia l'insulino-resistenza, l'infiammazione e le disfunzioni epatiche (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) indotte da obesità.

In questo progetto di ricerca sono stati condotti studi metabolici al fine di valutare il ruolo della deficienza di Timp-3 nella regolazione della sensibilità insulinica in modelli animali nutriti con una dieta ricca di grassi (HFD). Allo scopo di individuare i potenziali meccanismi molecolari coinvolti nell'attività di Timp-3, il proteoma epatico di topi WT e TIMP-3^{-/-} ad HFD è stato analizzato tramite nLC-ESI-MS^E e i dati ottenuti sono stati interpretati mediante un programma di bioinformatica (IPA).

Tra i risultati ottenuti i dati più significativi riguardano l'incremento di stress ossidativo e la forte alterazione del metabolismo della metionina, i quali potrebbero avere un ruolo predominante nel potenziamento d'insulino-resistenza e NAFLD riscontrata nei topi *knockout*.

ABSTRACT

Timp-3, as physiological inhibitor of matrix metalloproteinases (MMP) and of TACE (TNF-alpha Converting Enzyme), has an important role in the regulation of immunity and metabolic homeostasis. In our laboratory it was recently discovered that the decrease of this protein, together with the haploinsufficiency of *Insr*, enhance insulin resistance, inflammation and hepatic dysfunction (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) induced by obesity.

In this research project we performed metabolic analyses to evaluate the role of Timp-3 in regulation of insulin sensitivity in obese animal models. Moreover, to discover the molecular mechanisms involved in the effects of Timp-3, we investigated the hepatic proteome of WT and *TIMP-3*^{-/-} mice on high fat diet (HFD) by using nLC-ESI-MS^E and we performed a functional analysis with a bioinformatics tool (IPA).

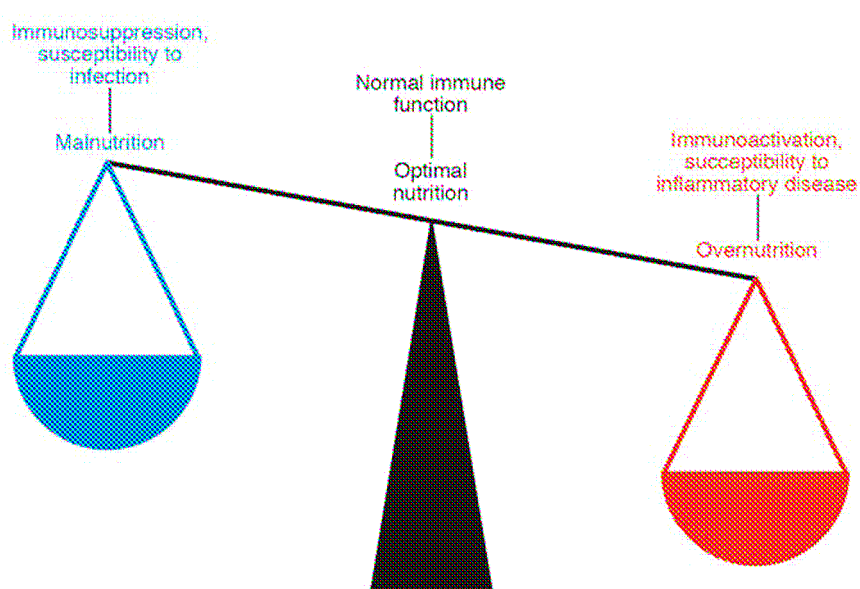
Among the results obtained of particular interest is the oxidative stress increment and the strong alteration of methionine metabolism, which could have a prominent role in enhancing insulin resistance and NAFLD in knockout mice.

INTRODUZIONE

1. IL METABOLISMO ED IL SISTEMA IMMUNE

La sopravvivenza degli organismi multicellulari dipende dall'abilità di combattere le infezioni e di conservare l'energia metabolica, necessaria nei periodi di scarsa disponibilità di nutrienti o di elevato fabbisogno energetico. Il sistema immune e quello metabolico sono quindi basilari in tutto il regno animale e pertanto le molecole coinvolte in tali processi sono state altamente conservate, da organismi quali *Caenorabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* fino ai mammiferi. Inoltre questi due apparati hanno una origine evolutiva comune e sono tuttora interdipendenti strutturalmente e funzionalmente. Infatti le cellule metaboliche (adipociti o epatociti) sono in stretta vicinanza con le cellule immunitarie (macrofagi o cellule di Kupffer) ed entrambe hanno un accesso immediato ad una vasta rete di vasi sanguigni, la quale permette un'interazione dinamica e continua tra la risposta immune e quella metabolica. Inoltre molti ormoni, citochine, proteine segnale e fattori di trascrizione possono agire sia nell'ambito della risposta immune che nel metabolismo. Tale stretta integrazione fa sì che i nutrienti possano indurre infiammazione e agenti patogeni possano regolare i processi metabolici; permettendo quindi ai due sistemi di regolarsi a vicenda. Questa intima associazione è vantaggiosa in determinate condizioni; permette ad esempio all'organismo di riorganizzare e ridistribuire le risorse energetiche durante una risposta infiammatoria, bloccando i principali processi anabolici, quali quelli avviati dall'insulina. Purtroppo però questo sistema non si è evoluto ed adattato per avere un effetto benefico in condizione di

continuo *surplus* energetico, sempre più frequente nelle moderne società occidentali. L'obesità infatti può indurre uno stato di infiammazione cronica di basso grado responsabile dell'insorgenza di diverse patologie quali insulino-resistenza, diabete, steatosi epatica ed aterosclerosi (fig. 1) (Hotamisligil, 2006; Wellen & Hotamisligil, 2005).



Figure/ 1 Il metabolismo ed il sistema immune. Il sistema metabolico e quello immune sono strettamente associati. Sbilanciamenti nell'alimentazione possono avere implicazioni nelle funzioni immunitarie. La malnutrizione sopprime tali attività, comportando una maggiore suscettibilità alle infezioni. Viceversa l'obesità è associata con un'infiammazione cronica di basso grado e con l'aumentato rischio di malattie infiammatorie, quali aterosclerosi, diabete e steatosi epatica. (Tratta da Wellen & Hotamisligil, 2005).

1.1. L'INSULINA E LA TRASDUZIONE DEL SUO SEGNALE

L'insulina è il principale ormone anabolizzante, secreto dalle cellule β -pancreatiche in risposta ad elevati livelli di nutrienti; la sua azione è essenziale per la crescita, lo sviluppo, l'omeostasi glucidica, lipidica e proteica e per il corretto funzionamento delle cellule β -pancreatiche. Tale proteina agisce attraverso l'interazione con il suo recettore, presente nei principali tessuti responsivi: muscolo, tessuto adiposo e fegato; stimolando l'attivazione di una via di trasduzione del segnale la cui funzione è l'induzione del trasporto dei nutrienti (glucosio, amminoacidi e acidi grassi) dal circolo sanguigno ai tessuti target. Inoltre l'insulina promuove la conversione di tali nutrienti in macromolecole necessarie per la conservazione dell'energia metabolica in *surplus* (rispettivamente glicogeno, proteine e lipidi), inibendone inoltre la loro degradazione (Lizcano & Alessi, 2002; Saltiel & Pessin, 2002; Zick, 2004).

Il recettore dell'insulina (IR) è una glicoproteina eterotetramerica che appartiene ad una famiglia di recettori tirosin-chinasici, la quale include il recettore di IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) e IRR (*insulin receptor-related receptor*). Tali proteine sono composte da due subunità α extracellulari e due subunità β transmembrana, unite da ponti disolfuro, che funzionano come enzimi allosterici: la subunità α inibisce l'attività chinastica della subunità β . Il legame dell'insulina alla porzione extracellulare del recettore dereprime l'attività tirosin-chinasica del dominio intracellulare, comportandone l'autofosforilazione e il conseguente legame a diverse proteine target, le quali vengono a loro volta fosforilate (fig. 2).

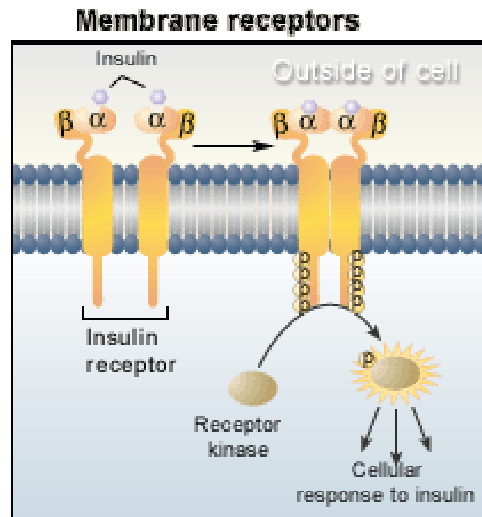


Fig. 2/ Struttura e regolazione del recettore dell'insulina. (Tratta da http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/problemsets/signaling/01t.html)

Le principali molecole coinvolte in tale processo sono le proteine substrato di IR (IRS 1-6); in particolare IRS-1 e -2 sono quelle espresse più diffusamente e maggiormente coinvolte nel metabolismo glucidico. Sono inoltre stati identificati altri *target*, quali Cbl, APS, Gab-1, le proteine Shc, p60^{dok} e SIRPS. I residui tirosinici fosforilati di tali substrati sono coinvolti nel reclutamento sulla membrana plasmatica di proteine contenenti domini SH2 (*Src-homology-2*), tra cui la subunità regolatoria p85 di PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) e Grb-2 (*growth factor receptor-bound protein 2*).

Il segnale insulinico si propaga principalmente attraverso tre vie di trasduzione, mediate da MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), Cbl/CAP (Cbl-associated protein) o PI3K (fig. 3) (Saltiel & Kahn, 2001; Saltiel & Pessin, 2002; Schinner *et al.*, 2005; Sesti *et al.*, 2001; Zick, 2004).

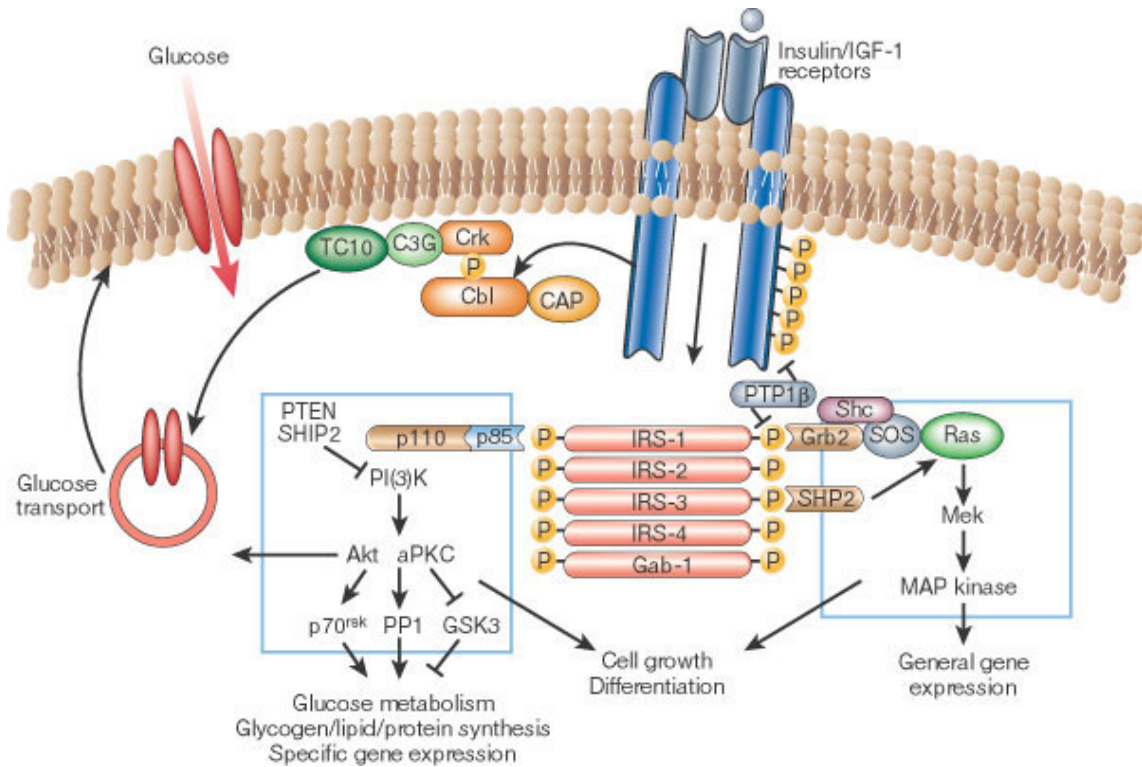


Fig. 3/ Trasduzione del segnale insulinico. Il recettore insulinico è una tirosin-chinasi che in seguito ad autofosforilazione, catalizza la fosforilazione di diverse proteine cellulari, come le proteine IRS, Shc e Cbl. In seguito a tale modificazione, queste proteine interagiscono mediante i loro domini SH2 con diverse proteine segnale, le quali sono coinvolte in diversi *pathway*. Le tre principali vie di trasduzione del segnale insulinico sono mediate da Ras/MAPK, Cbl/CAP e PI3K. (Tratta da Saltiel & Kahn, 2001).

La via Ras-MAPK dipendente induce la proliferazione cellulare e il differenziamento. L'attivazione di Cbl/CAP regola il trasporto del glucosio, il quale è indipendentemente attivato anche da PI3K. Tale chinasi inoltre stimola la sintesi di glicogeno, proteine e lipidi ed inibisce la gluconeogenesi epatica. Gli effetti PI3K-dipendenti sono conseguiti tramite l'attivazione della serin/treonin-chinasi Akt/PKB (protein-kinase B) (Bevan, 2001; Saltiel & Kahn, 2001; Schinner *et al.*, 2005; Taniguchi *et al.*, 2006; Zick, 2004).

1.2. FUNZIONI DELL'INSULINA

1.2.1. Funzioni PI3K-indipendenti

a) Ruolo mitogenico

La fosforilazione su residui tirosinici da parte di IR delle proteine IRS e/o di Shc permette la loro interazione con la proteina adattatrice Grb-2, la quale recluta sulla membrana plasmatica SOS (*Son-of-sevenless*) (fig. 3). Tali processi, in associazione con l'interazione della tirosin-fosfatasi SHP2 con Gab-1 o IRS1/2, inducono l'attivazione di Ras e di conseguenza la stimolazione a catena di diverse serin-chinasi: Raf, MEK ed ERK/MAPK. Quest'ultima una volta attivata trasloca nel nucleo e fosforila diversi fattori di trascrizione, inducendo così la proliferazione cellulare o il differenziamento (Saltiel & Kahn, 2001).

b) Ruolo nella regolazione dell'assorbimento del glucosio

L'insulina stimola un accumulo del trasportatore di glucosio GLUT-4 sulla membrana plasmatica, inducendo un aumentato assorbimento di tale nutriente nel tessuto adiposo e nel muscolo. A livello molecolare tale azione può essere conseguita parallelamente tramite la via PI3K-dipendente e per mezzo della trasduzione del segnale mediata da Cbl/CAP. Riguardo quest'ultima, in seguito alla fosforilazione da parte di IR, Cbl si complessa con CAP e trasloca sulla membrana plasmatica, ove interagisce con altre proteine (CrkII e C3G), inducendo l'attivazione di TC10 (fig. 3). Tale molecola è coinvolta nel reclutamento del trasportatore di glucosio GLUT-4 sulla membrana plasmatica (Eyster *et al.*, 2006; Saltiel & Kahn, 2001; Schinner *et al.*, 2005; Taniguchi *et al.*, 2006).

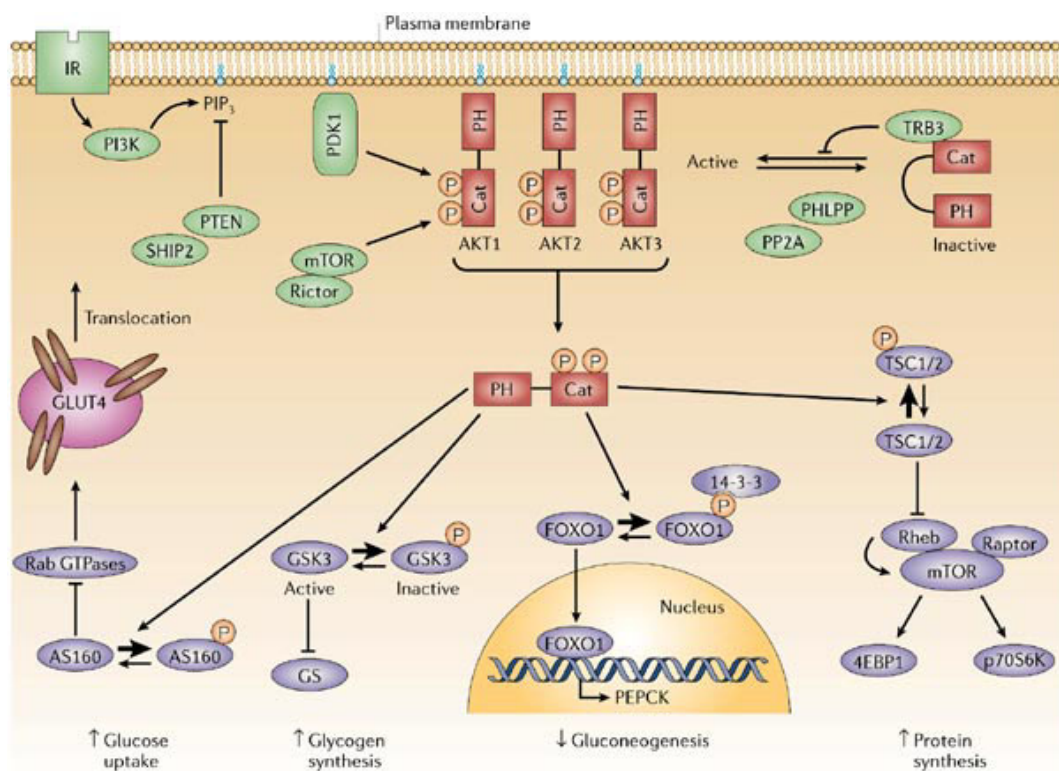
1.2.2. Funzioni PI3K-dipendenti

La subunità regolatoria p85 di PI3K reprime l'attività della subunità catalitica p110. L'interazione di p85 con i residui fosfo-tirosinici delle proteine IRS comporta l'attivazione di p110 e la conseguente conversione del fosfolipide di membrana fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato (PIP₂) in fosfatidil inositolo-3,4,5-trifosfato (PIP₃). PIP₃ è in grado di legare proteine contenenti un dominio PH (*pleckstrin homology*), come Akt, provocandone la traslocazione sulla membrana plasmatica e l'attivazione (Saltiel & Kahn, 2001; Schinner *et al.*, 2005; Taniguchi *et al.*, 2006). PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) è una proteina costitutivamente attiva che viene reclutata sulla membrana plasmatica in maniera PI3K-dipendente. Tale molecola è in grado di fosforilare Akt-1 in Tyr-308, stimolandone l'attività. Inoltre PI3K attiva anche mTOR (*mammalian target of rapamycin*), responsabile della fosforilazione di Akt-1 in Ser-473. Quindi PI3K induce l'attivazione di Akt tramite rilocalizzazione subcellulare e modificazioni post-traduzionali, in seguito alle quali Akt si distacca nuovamente dalla membrana plasmatica e fosforila diversi *target*, sia citoplasmatici che nucleari, coinvolti in vari processi metabolici (fig. 4) (Bhaskar & Hay, 2007; Burgering & Kops, 2002; Lizcano & Alessi, 2002; Saltiel & Kahn, 2001; Taniguchi *et al.*, 2006).

a) AS160 e l'assorbimento del glucosio

PI3K può regolare l'assorbimento del glucosio anche tramite l'attivazione della serin/treonin-chinasi PKB/Akt. Questa proteina è in grado di fosforilare e quindi inibire AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*). Tale evento comporta l'attivazione di proteine Rab, le

quali sono coinvolte nella riorganizzazione del citoscheletro, necessaria per la traslocazione di GLUT-4 (fig. 4).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Fig. 4/ Via di trasduzione del segnale insulinico PI3K-dipendente. I regolatori a monte di AKT sono rappresentati in verde. PTEN, SHIP2, PHLPP e TRB3 sono regolatori negativi. PI3K è invece un modulatore positivo che produce PIP₃ in risposta all'insulina. PIP₃ recluta sulla membrana plasmatica PDK1 e AKT, dove quest'ultima viene fosforilata da PDK1 ed mTOR. I substrati a valle di AKT sono rappresentati in viola. (Tratta da Taniguchi *et al.*, 2006).

Lo stesso effetto è ottenuto anche tramite l'attivazione PI3K-dipendente delle isoforme atipiche della protein-chinasi C (aPKC), PKC-λ e PKC-ζ. (Tali proteine sono chiamate atipiche perché non responsive ai secondi messaggeri Calcio e Diacilglicerolo). PKC-λ è la principale aPKC presente nel tessuto adiposo e nel muscolo murino; mentre PKC-ζ è predominante nel ratto, nella scimmia e nell'uomo (Taniguchi *et al.*, 2006).

b) GSK3 e la glicogeno sintesi

La maggior parte del glucosio assorbito dal circolo sanguigno in seguito alla stimolazione insulinica è conservato sotto forma di glicogeno nel muscolo scheletrico. GSK3 (*Glycogen synthase kinase-3*) è un enzima critico nella regolazione della sintesi del glicogeno. In condizioni basali tale proteina è costitutivamente attiva e fosforila la glicogeno sintasi (GS), inibendola. In seguito ad uno stimolo insulinico Akt fosforila GSK3, la inattiva e quindi, dereprimendo GS, stimola la sintesi del glicogeno (fig. 4). Inoltre l'insulina attiva la GS attraverso l'inibizione di un'altra chinasi, PKA, e mediante l'attivazione della proteina fosfatasi-1 (PP1). GSK3 fosforila anche altri substrati ed è coinvolta in molti altri processi oltre alla regolazione della sintesi del glicogeno; ad esempio tale chinasi regola la sintesi proteica tramite la fosforilazione di eIF2B (Frame & Cohen, 2001; Lizcano & Alessi, 2002; Saltiel & Kahn, 2001; Schinner *et al.*, 2005).

c) FOXO1, la gluconeogenesi, la glicolisi e l'omeostasi lipidica

L'insulina, tramite Akt, regola l'espressione di diversi enzimi gluconeogenici e lipogenici mediante il controllo dell'attività della classe di fattori di trascrizione FOX (*forkhead*). La famiglia FOX comprende più di 100 membri ed alcuni di questi sono cruciali per l'azione insulinica. Tra questi di particolare rilievo è FoxO1, l'isoforma di FoxO più abbondante in diversi tessuti responsivi all'insulina, quali il fegato, il tessuto adiposo e le cellule β -pancreatiche. FoxO1 in seguito alla fosforilazione in Ser-256 Akt-dipendente, interagisce con le proteine 14-3-3, venendo così sequestrato nel citoplasma, ubiquitinato e degradato. Inoltre tale modificazione post-traduzionale ne provoca il distacco dal suo coattivatore PGC-1 α (*PPAR- γ coactivator 1 α*). Questi eventi

impediscono l'attivazione dei geni bersaglio di FoxO1, tra cui la glucosio-6-fosfatasi (*G6Pase*) e la fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK); enzimi la cui modulazione comporta l'inibizione della gluconeogenesi (fig. 4) (Nakae *et al.*, 2003; Postic & Girard, 2008; Puigserver *et al.*, 2003; Taniguchi *et al.*, 2006). Inoltre l'insulina comporta il distacco di FoxO1 dal fattore di trascrizione HNF4, il quale di conseguenza viene attivato trascrizionalmente, provocando l'induzione della glucochinasi. Questo processo rappresenta un meccanismo importante alla base della stimolazione della glicolisi indotta dall'insulina (Schinner *et al.*, 2005). Akt fosforila (in Ser-570) anche PGC-1 α , inibendola (fig. 5); tale evento, oltre a fornire un livello secondario di controllo della sintesi di glucosio, comporta anche la regolazione di geni coinvolti nella sintesi degli acidi biliari e nell'ossidazione degli acidi grassi (Li *et al.*, 2007).

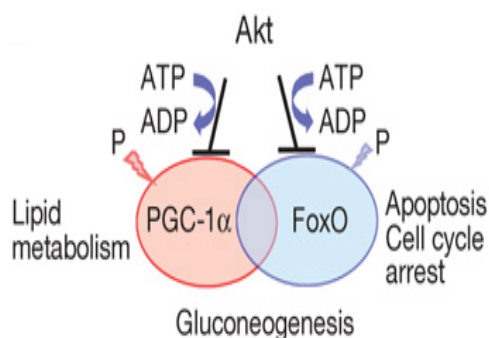


Fig. 5/ Regolazione AKT-dipendente di PGC1- α . L'inibizione di PGC1- α e di FoxO1 agisce sinergicamente nella soppressione degli enzimi gluconeogenetici, PEPCK e *G6Pase*; inoltre la fosforilazione di PGC1- α comporta anche l'inibizione di un'intero *set* di geni correlati al metabolismo lipidico. (Tratta da Li *et al.*, 2007).

Riassumendo FoxO1 regola l'omeostasi glucidica stimolando l'idrolisi del glucosio e impedendone l'ulteriore formazione. Inoltre tale proteina ha un ruolo anche nella modulazione del metabolismo lipidico. Una significativa frazione del glucosio assorbito

dall'intestino è immediatamente reclutata dagli epatociti e convertita in glicogeno; quando però il fegato è saturo di tale macromolecola l'ulteriore glucosio captato in tale organo viene utilizzato per la sintesi di acidi grassi (lipogenesi). L'abilità dell'insulina di attivare tale processo metabolico è mediata, tramite FoxO1, dal fattore di trascrizione SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding protein-1c*), il quale induce tutti geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi (*free fatty acids*, FFA), quali ACC (*Acetyl-CoA carboxylase*) e FAS (*Fatty acid synthase*). SREBP-1c è inoltre coinvolto nell'inibizione della lipolisi e nell'esterificazione di FFA in trigliceridi (TG). Ulteriormente SREBP-1c influisce sull'omeostasi lipidica tramite l'inibizione della secrezione di VLDL (*very low density lipoprotein*), responsabili dell'esocitosi dei TG dal fegato e del loro trasporto nel circolo sanguigno (Browning & Horton, 2004; Gibbons *et al.*, 2004; Jump *et al.*, 2005; Kahn & Flier, 2000; Kamagate *et al.*, 2008; Postic & Girard, 2008).

d) mTOR e la sintesi proteica

L'insulina stimola la sintesi delle proteine e ne inibisce la degradazione tramite l'attivazione di mTOR. Infatti Akt fosforila ed inibisce TSC2 (*tuberous sclerosis complex-2*), il quale insieme a TSC1 forma un complesso in grado di reprimere l'attività di mTOR (fig. 4). Akt può inibire TSC2 anche indirettamente, tramite l'inibizione di GSK3; infatti la fosforilazione da parte di tale chinasi è necessaria per attivare TSC2. Infine l'insulina inibisce mTOR anche tramite la via Ras-MAPK-dipendente. Infatti sia ERK che una chinasi attivata da MAPK, RSK1, sono in grado di fosforilare mTOR. Tale chinasi attiva varie proteine *target*, regolando diversi eventi, quali la trascrizione, la traduzione, la biosintesi ribosomale, l'autofagia, la polarizzazione dell'actina durante il

ciclo cellulare e molti processi metabolici (Saltiel & Kahn, 2001; Taniguchi *et al.*, 2006; Wullschleger *et al.*, 2006).

1.3. SPEGNIMENTO DEL SEGNALE INSULINICO

Il complesso che si forma tra l'insulina e il suo recettore, inizialmente presente sulla membrana plasmatica, è successivamente internalizzato in endosomi in maniera dipendente dall'autofosforilazione di IR. L'endocitosi del recettore attivato ha l'effetto di concentrare i recettori negli endosomi e permettere alle tirosin-chinasi di IR di fosforilare residui spazialmente distinti rispetto a quelli normalmente accessibili sulla membrana plasmatica. L'acidificazione del lume endosomale comporta la dissociazione dell'insulina dal suo recettore (Bevan, 2001); in seguito alla quale, sia il recettore che i suoi substrati subiscono una rapida defosforilazione, tramite l'azione di tirosin-fosfatasi, quali PTP1B. L'azione insulinica è controllata anche tramite la defosforilazione di PIP₃ da parte di fosfatasi fosfolipidiche, quali PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) e SHIP2 (*SH2-containing inositol 5'-phosphatase-2*). Anche l'attività di Akt è regolata da diverse molecole inibitrici tra cui proteine che la defosforilano e inattivano, come PP2A (*protein phosphatase-2A*) e PHLPP (*PH-domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) o anche proteine che ne impediscono la fosforilazione come TRB-3 (*Tribbles-3*) (fig. 4). Il recettore insulinico e alcuni dei suoi substrati sono soggetti anche a fosforilazioni in residui di serina e treonina in risposta all'insulina e ad altri stimoli, quali citochine ed FFA. In generale tali modificazioni post-traduzionali regolano negativamente la trasduzione del segnale insulinico.

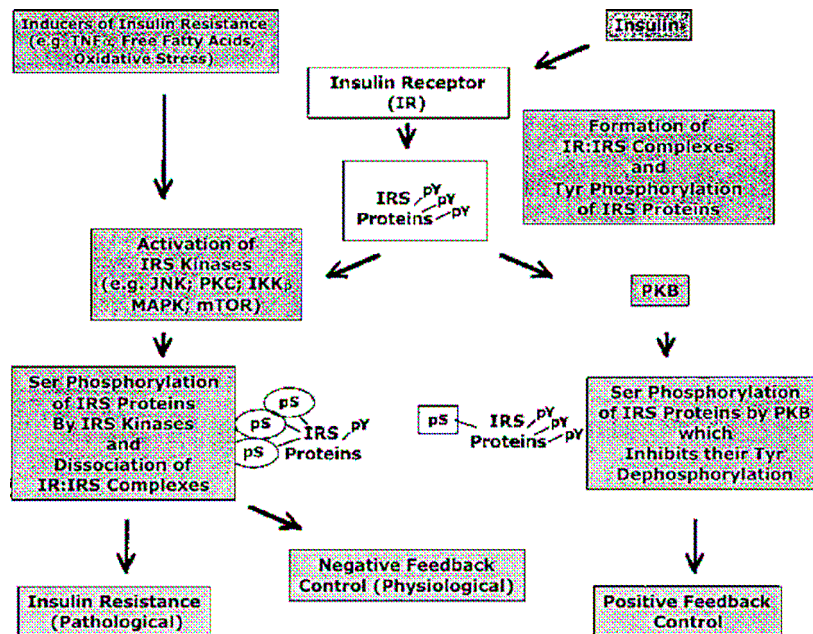


Fig. 6/ Ruolo della fosforilazione di IRS in serina/treonina nell'azione insulinica. La fosforilazione di IRS in residui di serina/treonina può sia potenziare che inibire il *signalling* insulinico. La fosforilazione in Ser mediata da PKB/Akt ha probabilmente un ruolo positivo, proteggendo le IRS dall'azione di fosfatasi. Invece altre chinasi quali JNK, IKK- β e PKC inibiscono il segnale insulinico, inducendo l'insulino-resistenza. pY, fosfo-tirosina; pS, fosfo-treonina. (Tratta da Zick, 2004).

I sopra menzionati meccanismi, attuano in tempi molto precoci, venendo attivati immediatamente dopo la stimolazione. La durata e l'intensità dell'azione dell'insulina è regolata però anche attraverso un controllo tardivo che consta di una regolazione del contenuto cellulare di IR, dei suoi substrati e di altre molecole segnale. La regolazione temporale dell'azione di tale ormone fa sì che in condizioni fisiologiche il segnale permanga attivo solo quanto basta per svolgere il suo ruolo positivo, evitando che la sua azione persistente induca effetti deleteri (es. la carcinogenesi) (Boura-Halfon & Zick, 2008; Saltiel & Kahn, 2001; Saltiel & Pessin, 2002; Taniguchi *et al.*, 2006; Zick, 2004).

1.4. OBESITA', INFIAMMAZIONE E INSULINO-RESISTENZA

1.4.1. L'insulino resistenza

Le fosforilazioni in serina/treonina delle proteine IRS oltre a costituire un meccanismo fisiologico di spegnimento del segnale insulinico, sono anche coinvolte in diversi processi patologici, i quali inducono una stato d'insulino-resistenza ovvero una condizione in cui le cellule bersaglio non sono più in grado di rispondere ai livelli ordinari d'insulina in circolo (fig. 6) (Zick, 2004).

Negli stadi precoci d'insulino-resistenza viene mantenuta una normale glicemia, grazie a dei processi adattativi che avvengono nelle cellule β -pancreatiche, le quali divengono iperplastiche e iperattive. L'abbondante secrezione d'insulina risultante permette una parziale compensazione dell'insulino-resistenza. Infatti gli stadi iniziali di tale patologia sono caratterizzati da una condizione di iperinsulinemia e normoglicemia. Alla lunga però nelle cellule β -pancreatiche insorgono delle disfunzioni che riducono la secrezione d'insulina, la quale seppur ancora piuttosto elevata non è più in grado di compensare l'insulino-resistenza. La conseguente iperglicemia, in concomitanza con l'accumulo di FFA nelle cellule β -pancreatiche (dovuto alla mancata azione insulinica), ne comporta infine l'apoptosi. La conseguente scarsità delle cellule β -pancreatiche compromette ulteriormente la secrezione insulinica, inducendo un ulteriore aumento delle concentrazioni glicemiche in circolo. La riduzione delle sensibilità insulinica e della funzionalità delle β -cellule sono eventi precoci nell'insorgenza del diabete di tipo 2 (T2D). L'insulino-resistenza, oltre a costituire un aspetto fondamentale dell'etiologia del T2D, è anche correlata ad una vasta gamma di *sequelae* fisiopatologiche quali ad esempio l'ipertensione, l'iperlipidemia e l'aterosclerosi (Kahn, 2003; Kahn & Flier, 2000; Pessayre, 2007; Shulman, 2000).

Sebbene diversi fattori, quali ad esempio l'inattività fisica e la suscettibilità genetica possano influire nella patogenesi dell'insulino-resistenza, è ormai appurato che l'induzione d'inflammation ha un ruolo centrale in tale processo (Wassink *et al.*, 2007).

1.4.2. Meccanismi infiammatori d'induzione dell'insulino-resistenza

Esistono diversi attivatori di inflammation i quali agiscono in maniera interdipendente, influenzando nell'insorgenza dell'insulino-resistenza.

a) Citochine infiammatorie e lipidi

Il tessuto adiposo ha un ruolo importante nel controllo dell'omeostasi del glucosio. Tale organo è infatti in grado di conservare l'energia metabolica sotto forma di trigliceridi (TG) durante lo stato di nutrizione e di rilasciarla sotto forma di FFA nello stato di digiuno. Gli FFA rilasciati in circolo vengono infatti trasportati nei tessuti *target*, ossidati nei mitocondri e utilizzati come fonte energetica (Guilherme *et al.*, 2008).

L'alto livello di coordinazione tra il sistema infiammatorio e quello metabolico è particolarmente evidente in condizioni di obesità. Durante tale stato gli adipociti diventano ipertrofici (si allargano) a causa dell'aumentato accumulo di TG. In tale condizione gli adipociti possono secernere MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), una molecola che stimola l'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo (fig. 7). Sia gli adipociti che i macrofagi producono ulteriormente MCP-1 e altre chemochine, inoltre secernono il TNF- α (*Tumor necrosis factor- α*) e diverse citochine, come l'interleuchina 1 β (IL-1 β); avviando e potenziando una risposta infiammatoria. (Guilherme *et al.*, 2008; Tilg & Moschen, 2006).

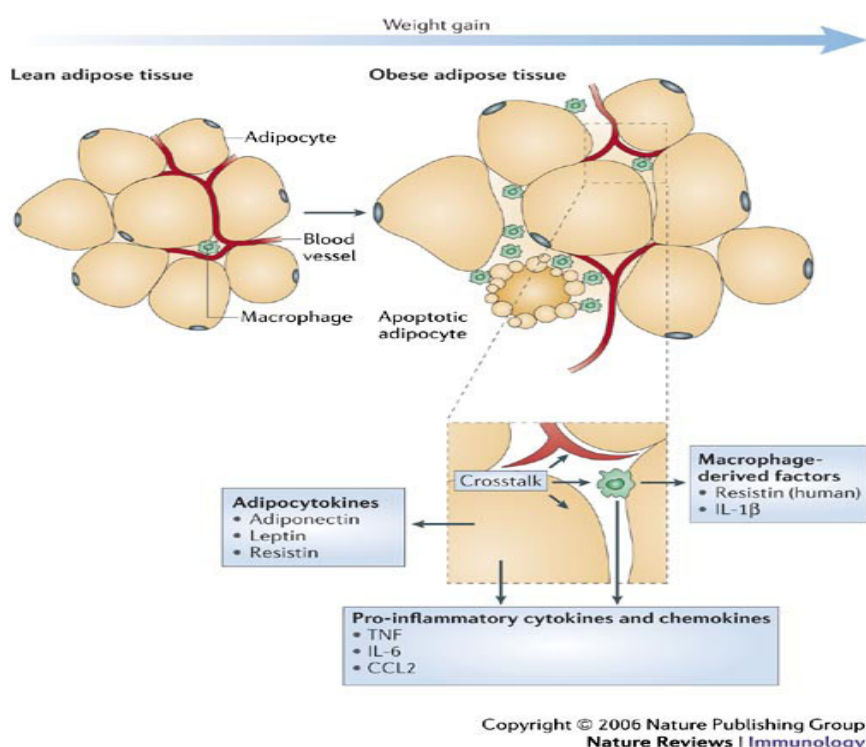


Fig. 7/ Il tessuto adiposo e l'infiammazione. In condizioni normali gli adipociti conservano efficientemente l'energia sotto forma di TG. Un eccessivo apporto calorico induce un sovraccarico metabolico, con conseguente accumulo di TG negli adipociti, i quali si ingrandiscono. In determinate condizioni, tali cellule possono inoltre secernere MCP-1, provocando il reclutamento dei macrofagi nel tessuto adiposo e la secrezione di TNF- α ed altre chemochine infiammatorie. (Tratta da Tilg & Moschen, 2006).

Sia il TNF- α e le altre citochine infiammatorie, che gli FFA e i suoi metaboliti, quali diacilglicerolo (DAG) e ceramidi, attivano una cascata di chinasi, come PKC (*protein kinase C*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e IKK- β (*I kappa B kinase- β*), le quali fosforilano la proteina IRS-1 in residui di serina o treonina, impedendone la fosforilazione in tirosina e quindi ostacolando il *signalling* insulinico (fig. 6). Gli acidi grassi potrebbero contribuire all'insulino-resistenza anche attraverso l'attivazione dei recettori TLR (*Toll-like receptors*), i quali sono stati ipotizzati essere coinvolti nell'induzione di infiammazione in adipociti e macrofagi. Il difetto nella risposta all'insulina comporta un ulteriore accumulo di FFA, creando così un circolo vizioso. Inoltre l'attivazione di IKK- β causa anche l'ulteriore induzione di molecole

infiammatorie, quali il TNF- α , creando anche in questo contesto un circuito a *feedback* positivo (fig. 8) (Guilherme *et al.*, 2008; Qatanani & Lazar, 2007; Ruan & Lodish, 2003; Shoelson *et al.*, 2006; Wassink *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2002).

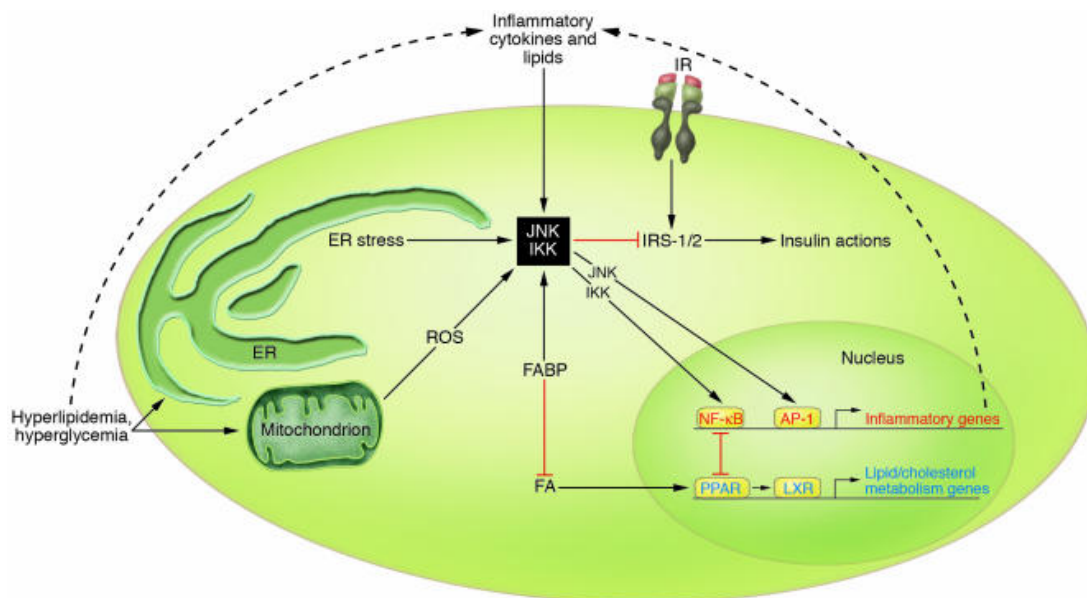


Fig. 8/ Modello di sovrapposizione del *signalling* metabolico e di quello infiammatorio. I processi infiammatori possono essere avviati da mediatori extracellulari, quali citochine e lipidi, o da stress endogeni, come stress dell'ER ed eccessiva produzione di ROS dai mitocondri. Tali segnali attivano diverse chinasi tra cui JNK e IKK, le quali inibiscono il segnale insulinico e producono ulteriori attivatori d'infiammazione. Le proteine FABP, sequestrando i ligandi di PPAR e LXR, potenziano l'infiammazione. (Tratta da Wellen & Hotamisligil, 2005).

Va comunque ricordato che i lipidi intracellulari possono anche avere un ruolo anti-infiammatorio. I ligandi del recettore LXR (*liver X receptor*) e dei recettori PPAR sono rispettivamente gli oxisteroli e gli acidi grassi. L'attivazione di questi fattori di trascrizione inibisce l'espressione dei geni infiammatori nei macrofagi e negli adipociti. Le proteine citosoliche FABP (*fatty acids binding protein*), sequestrando i ligandi di questi fattori di trascrizione, promuovono l'infiammazione (fig. 8). La collocazione nel corpo, la composizione dell'ambiente circostante ed altri fattori sono determinanti nello

stabilire se i lipidi promuovano o sopprimano l'infiammazione e quindi l'insulino-resistenza (Wellen & Hotamisligil, 2005).

b) Stress del Reticolo Endoplasmatico (ER)

Negli organismi eucariotici tutte le proteine secretorie passano nel reticolo endoplasmatico (ER), dove vengono ripiegate assumendo la loro struttura tridimensionale, in un processo detto *foldig*, ed assemblate in complessi, prima di essere trasportate nel Golgi.

Il reticolo endoplasmatico può essere considerato un sito d'integrazione tra la risposta immune e quella metabolica, tale struttura è infatti molto sensibile al glucosio, ai lipidi ed ai patogeni. Può essere ipotizzato che l'ER sia responsabile della percezione dello stress metabolico e della conseguente induzione di una risposta infiammatoria. L'aumento di adiposità nei soggetti obesi sovraccarica infatti la capacità funzionale del reticolo endoplasmatico e ne limita l'espansione, creando una condizione di stress. Il conseguente accumulo di proteine non ripiegate comporta l'attivazione di un'adeguata risposta, denominata UPR (*unfolded protein response*), atta a ristabilire l'integrità funzionale di tale organello citoplasmatico. Se il difetto di *foldig* proteico non è risolto avviene un'attivazione cronica di UPR, la quale induce l'apoptosi. Inoltre lo stress dell'ER è coinvolto nell'induzione d'insulino-resistenza, tramite l'attivazione di JNK e IKK- β (fig. 8), l'induzione di TRB-3 e la produzione di ROS (specie di ossigeno reattive). A sua volta lo stress ossidativo può ulteriormente indurre l'UPR. (Hotamisligil, 2006; Malhotra & Kaufman, 2007; Wellen & Hotamisligil, 2005).

c) Stress ossidativo

In fase prediabetica l'incremento di FFA associato con l'obesità induce stress ossidativo a causa dell'aumentata attività mitocondriale (aumentato disaccoppiamento mitocondriale e beta ossidazione), la quale induce la produzione di ROS. Inoltre in seguito all'insorgenza del diabete, l'iperglicemia è di per sé un attivatore di stress ossidativo. Anche il TNF- α sembra avere un effetto nell'induzione dei ROS, che a loro volta stimolano la produzione di tale citochina. Le serin/treonin-chinasi JNK, p38MAPK e IKK- β sono degli induttori di insulino-resistenza, la cui attivazione è stata associata con lo stress ossidativo. La via specifica attivata può dipendere dall'intensità di tale stress, dal tipo di ROS, dal tipo di cellula e da altri fattori (Brownlee, 2001; Harrison *et al.*, 2002; Houstis *et al.*, 2006; Nishikawa & Araki, 2007; Qatanami & Lazar, 2007).

d) Disfunzioni mitocondriali

In soggetti obesi e/o affetti da T2D c'è una ridotta espressione di PGC-1 e NRF-1 nel muscolo scheletrico, alla quale è associata una diminuzione nell'ossidazione degli acidi grassi e nella biogenesi mitocondriale. Tale fenomeno può essere correlato ad una ridotta attività fisica, ad una dieta ricca di grassi, così come a mutazioni nel DNA mitocondriale (mtDNA) correlate all'invecchiamento o ancora ad un polimorfismo genetico di PGC-1. Il ridotto catabolismo degli FFA in associazione ad una eccessiva alimentazione, causa un accumulo di grassi all'interno dei miociti (Pessayre, 2007; Sparks *et al.*, 2005). Quindi anche una disfunzione dei mitocondri, tramite l'accumulo di FFA, può contribuire all'insulino-resistenza (Qatanami & Lazar, 2007).

e) Altri mediatori di infiammazione: SOCS ed iNOS

Oltre ai *pathway* dipendenti dalle serin/treonin chinasi, ci sono altri fattori che contribuiscono all'insulino-resistenza indotta da infiammazione. Per esempio almeno 3 membri della famiglia di SOCS (*soppressor of cytokine signalling*), SOCS-1, -3 e -6, sono coinvolti nell'inibizione della fosforilazione in tirosina di IRS-1 e -2 o nella loro degradazione proteasomale. Inoltre SOCS-1 e -3 possono essere correlate all'insorgenza d'insulino resistenza in quanto attivatori di SREBP-1c. Una vasta gamma di citochine, incluso il TNF- α e IL-1 β , induce l'espressione di una o più SOCS in maniera tessuto-specifica.

La stimolazione di citochine infiammatorie può anche causare l'induzione di iNOS e quindi la sovrapproduzione di ossido nitrico (NO), coinvolta nell'inibizione sia dell'azione insulinica nel muscolo che della funzionalità delle β -cellule nel pancreas. Inoltre la sovraespressione di iNOS nel fegato è stata correlata all'insorgenza di disfunzioni mitocondriali (Mantena *et al.*, 2008; Mooney *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2005; Sanal, 2008; Tilg & Hotamisligil, 2006; Wellen & Hotamisligil, 2005).

1.5. STEATOSI EPATICA E NAFLD

L'insulino-resistenza da sola o in associazione al diabete è una delle cause che può indurre la steatosi epatica, ovvero l'accumulo di TG negli epatociti (*fatty liver*). L'insulina inibisce la lipolisi nel tessuto adiposo attraverso la repressione di HSL (*hormone-sensitive lipase*), l'enzima che regola il rilascio di FFA da tale organo (Postic & Girard, 2008). In condizioni d'insulino resistenza, la soppressione dell'inibizione di HSL negli adipociti comporta un accumulo di FFA nel circolo sanguigno e di conseguenza un aumentato assorbimento da parte del fegato. Infatti il tasso di assorbimento epatico degli acidi grassi non è soggetto a modulazione ed è quindi direttamente proporzionale alla loro concentrazione plasmatica (fig. 9).

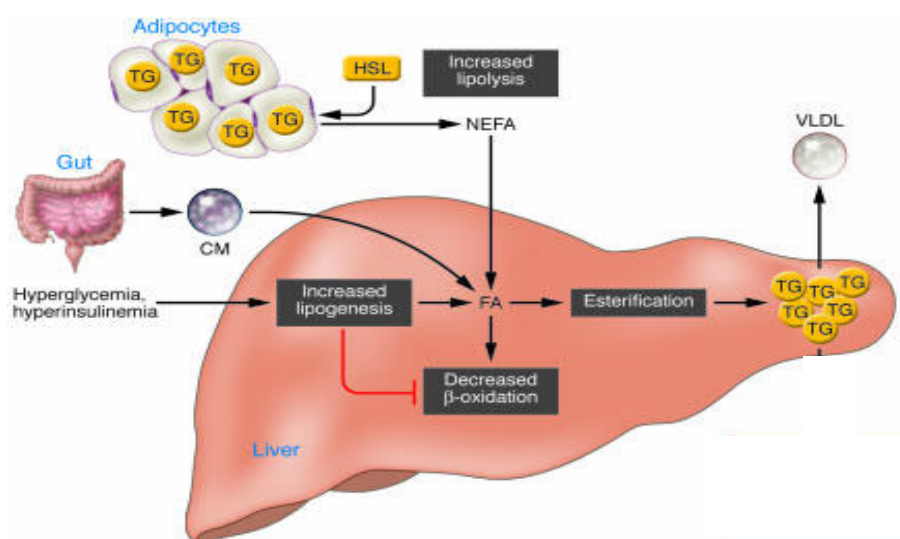


Fig. 9/ Meccanismi d'induzione di steatosi epatica. Differenti fonti di FFA contribuiscono all'induzione della steatosi epatica. L'insulino-resistenza causa la mancata inibizione di HSL da parte dell'insulina e quindi l'aumentato rilascio di FFA dal tessuto adiposo e un incrementato assorbimento epatico. Gli acidi grassi provenienti dalla dieta raggiungono il fegato sotto forma di chilomicroni (CM). Inoltre l'iperglicemia e l'iperinsulinemia promuovono la lipogenesi, riducono la β -ossidazione e la secrezione di VLDL. NEFA, *non-esterified fatty acid*. (Tratta da Postic & Girard, 2008).

Inoltre la condizione di iperinsulinemia e iperglicemia stimola la sintesi epatica di acidi grassi, rispettivamente tramite l'attivazione di SREBP-1c e ChREBP (*carbohydrate response element-binding protein*) (Pessayre, 2007). Va difatti menzionato che anche in presenza di insulino-resistenza, l'insulina è comunque in grado di attivare la trascrizione di SREBP-1c nel fegato (Browning & Horton, 2004), la quale, come precedentemente menzionato (par.1.2.2 c), induce, oltre alla sintesi di FFA, la riduzione della loro ossidazione, l'aumento della loro esterificazione a TG e una ridotta secrezione VLDL-dipendente di quest'ultimi.

Eventi secondari possono in alcuni casi far progredire la steatosi epatica in steatoepatite (NASH), fibrosi e cirrosi (fig. 10).

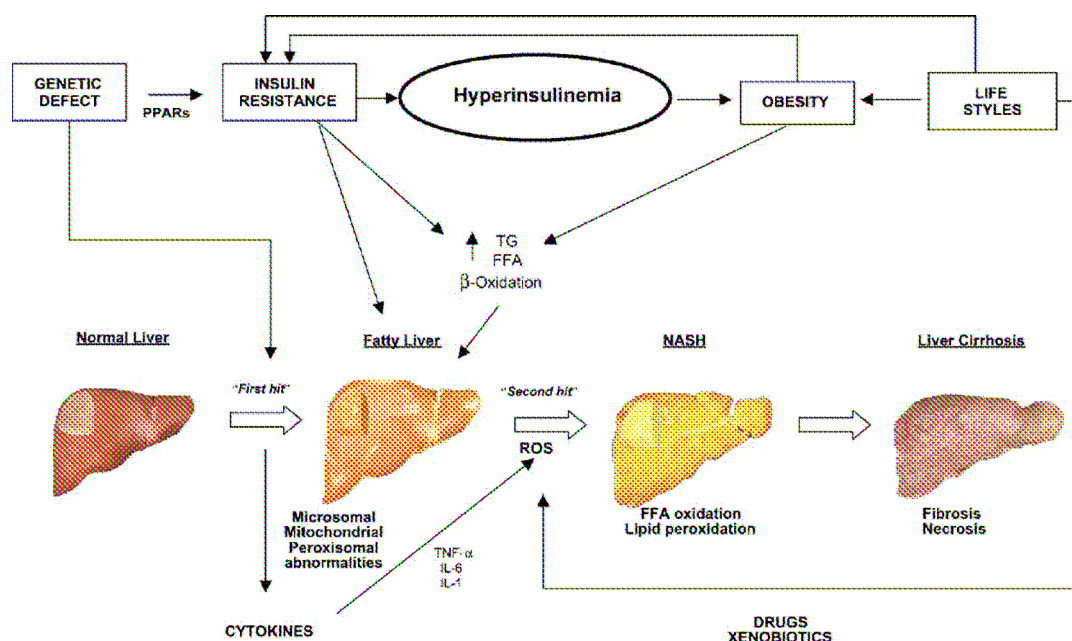


Fig. 10/ Patogenesi e progressione della steatosi epatica. Secondo la teoria denominata “two hits”, difetti genetici, obesità, stile di vita e insulino-resistenza sono tra i meccanismi primari (*first hit*) che possono influire nell'insorgenza della steatosi epatica. Mentre alterazioni nell'attività mitocondriale, stress ossidativo e infiammazione sono processi secondari (*second hit*), i quali potrebbero causare la progressione di tale patologia. (Tratta da Portincasa *et al.*, 2005).

Tali fenomeni costituiscono i vari gradi di progressione di una patologia comune denominata NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*), la quale a sua volta può condurre all'epatocarcinoma (HCC). Probabilmente i meccanismi responsabili sono multipli ed includono disfunzioni mitocondriali, stress ossidativo, perossidazione lipidica, infiammazione e alterazioni del metabolismo della metionina (Cave *et al.*, 2007; Tilg & Hotamisligil, 2006; Wortham *et al.*, 2008).

In particolare un'alterata attività dei mitocondri e la produzione di ROS possono avere un ruolo critico nello sviluppo e nella progressione della NAFLD. Infatti, come nel muscolo, anche nel fegato una ridotta funzione mitocondriale contribuisce all'accumulo ectopico di grassi, a causa della loro ridotta idrolisi. Inoltre in soggetti affetti da steatoepatite sono state riscontrate disfunzioni mitocondriali sia strutturali che funzionali, in parte associate allo stress ossidativo e all'infiammazione, le quali potrebbero causare un circolo vizioso nella produzione di ROS (fig. 11) (Browning & Horton, 2004; Mantena *et al.*, 2008; Pessayre, 2007; Portincasa *et al.*, 2004). Infine in seguito alla riduzione dell'ossidazione mitocondriale e all'accumulo di FFA, vengono attivate vie alternative di ossidazione nei perossisomi e nell'ER, le quali comportano ulteriore aumento di stress ossidativo e danneggiamento dei mitocondri. I ROS così prodotti hanno una breve emivita e quindi hanno un effetto solo locale; ma possono indurre la perossidazione lipidica. La conseguente generazione di prodotti aldeici di maggiore stabilità, quali HNE (*trans-4-hydroxy-2-nonenal*) e MDA (*malondialdehyde*), permette l'amplificazione degli effetti dello stress ossidativo. Tali prodotti citotossici possono infatti diffondere liberamente nello spazio extracellulare e agire in maniera paracrina. La perossidazione lipidica è coinvolta nella riduzione della secrezione di VLDL (la quale

contribuisce all'ulteriore accumulo epatico di TG) e nell'induzione di steatoepatite, fibrosi e necrosi. (Browning & Horton, 2004; Harrison *et al.*, 2002).

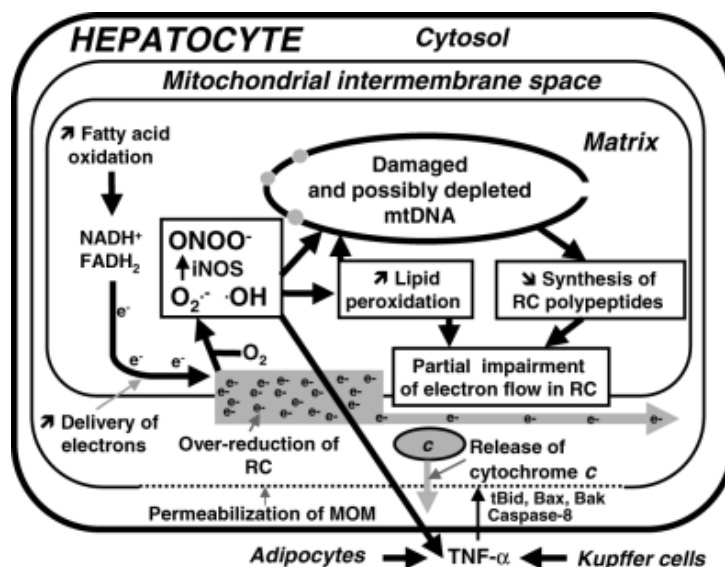


Fig. 11/ Disfunzioni mitocondriali nel fegato. Il TNF- α comporta la permeabilizzazione della membrana mitocondriale interna (MOM) e il parziale rilascio del citocromo c; ostacolando così il flusso di elettroni (e^-) nella catena respiratoria (RC). Tale fenomeno, in concomitanza con l'accumulo di FFA induce l'accumulo di e^- nell'RC. Conseguentemente le componenti dell'RC vengono ridotte e reagiscono con l' O_2 , producendo ROS e, in presenza di iNOS, la perossinitrite (ONOO $^-$). Tali prodotti possono produrre ulteriormente il TNF- α e danneggiare il DNA mitocondriale (mtDNA). Questo secondo evento potenzia ulteriormente la produzione di ROS. (Tratta da Pessayre *et al.*, 2007).

1.5.1. Metabolismo della metionina e disfunzioni epatiche

Il fegato ha un ruolo fondamentale nel metabolismo della metionina, infatti circa metà dell'apporto quotidiano di tale amminoacido è metabolizzato in questo organo. Primariamente la metionina viene convertita in una molecola ad alta energia, S-adenosilmetionina (SAM), in una reazione catalizzata dalla metionina adenosiltransferasi (MAT) (fig.12). Una piccola parte di SAM, non oltre il 5%, viene usata nella sintesi delle

poliammine. La maggior parte è invece utilizzata nelle reazioni di transmetilazione, in cui tale molecola dona gruppi metilici ad una vasta gamma di accettori (acidi nucleici, proteine, fosfolipidi, ecc.) e viene così convertito in S-adenosilomocisteina (SAH).

Le transmetilazioni sono regolate negativamente sia da un aumento di SAH che da una riduzione di SAM o del rapporto SAM/SAH. Pertanto la rimozione di SAH ha un ruolo essenziale, il quale è mediato da un enzima (SAH hydrolase, SAHH chiamato anche Adenosylhomocysteinase, AHCY) in grado di convertire tale molecola in omocisteina (Hcy) e adenosina (Ado). Sebbene dal punto di vista termodinamico venga favorita la sintesi di SAH; in vivo la reazione procede nella direzione dell'idrolisi se i prodotti, Hcy e Ado, sono rimossi rapidamente (Lieber & Packer, 2002; Lu, 2000; Lu *et al.*, 2002). ADK (Adenosine kinase) è il principale enzima responsabile della rimozione di Ado nel fegato (Boison *et al.*, 2002).

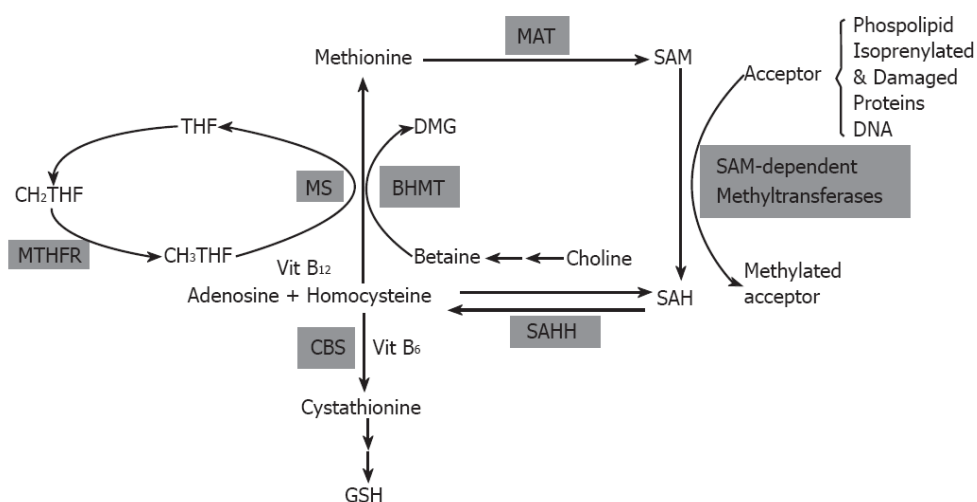


Fig. 12 / Pathway metabolico del metabolismo della metionina nel fegato. MS, *methionine synthase*; MTHFR, *5, 10 methylene tetrahydrofolate reductase*; BHMT, *betaine-homocysteine methyltransferase*; CBS, *cystathionine β-synthase*. (Tratta da Kharbanda, 2007).

Ci sono invece tre vie metaboliche responsabili dello smaltimento di Hcy in tale organo. La prima è la via di transulfurazione, in cui l'Hcy è convertita in cisteina, a sua volta precursore del glutathione (GSH, il principale anti-ossidante endogeno nei mammiferi). Le altre due vie utilizzano Hcy per risintetizzare la metionina, tramite l'acquisizione di un gruppo metilico dal N-5-metiltetraidrofolato (CH₃THF) o dalla betaina (metabolita della colina) (fig. 12) (Lieber & Packer, 2002; Lu, 2000; Lu *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda la regolazione di SAM, i suoi livelli intracellulari possono essere determinati, oltre che dalla disponibilità di metionina e dalla quantità di SAM utilizzato nella sintesi di poliammine e glutathione, anche dal livello di espressione di MAT (Lu, 2000). Inoltre esistono due importanti enzimi che, regolando il ciclo futile di SAM, ne garantiscono l'omeostasi. Tali proteine hanno lo scopo di evitare che un aumentato rapporto SAM/SAH induca delle reazioni di metilazione aberranti e quindi delle patologie, quali l'epatocarcinoma. Le proteine in questione sono GNMT (*glycine N-methyltransferase*), responsabile della metilazione SAM-dipendente della glicina, la quale viene convertita in sarcosina e SARDH, che riconverte la sarcosina in glicina (Martinez-Chantar *et al.*, 2008; Mato & Lu, 2007).

Considerando il ruolo critico delle metilazioni in vari processi cellulari, che variano dall'espressione genica (metilazione del DNA) alla fluidità di membrana (metilazione dei fosfolipidi) e valutando anche la richiesta di poliammine nella crescita cellulare, è comprensibile come la variazione nei livelli di SAM e SAH e quindi la modulazione delle transmetilazioni possa avere profondi effetti nella crescita cellulare, nel differenziamento e in varie funzioni cellulari epatiche; ad esempio può causare l'induzione di steatosi (fig. 13) (Lu, 2000). Infatti un ridotto rapporto SAM/SAH può diminuire l'attività di PEMT

(*phosphatylethanolamine methyltransferase*). Tale enzima è responsabile della conversione della fosfatidiletanolamina (PE) in fosfatidilcolina (PC), la quale è necessaria per la sintesi e la secrezione delle VLDL. Inoltre il rapporto PC/PE è un regolatore dell'integrità di membrana e la sua modulazione ha un importante ruolo nella progressione della steatosi in steatoepatite (Kharbanda, 2007; Li *et al.*, 2006; Noga *et al.*, 2002; Noga & Vance, 2003; Zhu *et al.*, 2003).

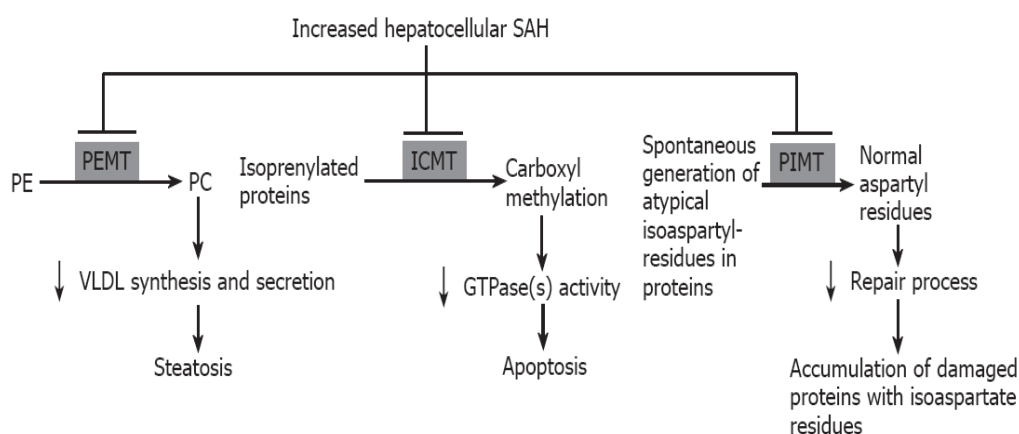


Fig. 13/ Effetti deleteri dell'inibizione di alcune reazioni di transmetilazione. L'inibizione di ICMT (*isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase*) ostacola l'attività delle GTPasi, le quali hanno un ruolo cruciale nel *signalling* di molti processi biologici, tra cui quelli coinvolti nella prevenzione dell'apoptosi. PIMT (*protein L-isoaspartate methyltransferase*) catalizza la riparazione di proteine danneggiate dalla presenza di gruppi aspartilici atipici. (Modificata da Kharbanda, 2007).

Attraverso l'utilizzo di vari modelli genetici e lo studio di pazienti affetti da disfunzioni epatiche, è stato dimostrato che diverse alterazioni nel metabolismo della metionina sono associate con lo sviluppo di varie forme di danno epatico, tra cui steatosi ed HCC (Avila *et al.*, 2002; Boison *et al.*, 2002; Calvisi *et al.*, 2007; Kharbanda, 2007; Lu, 2002; Lu *et al.*, 2002; Mato *et al.*, 2008; Mato & Lu, 2007; Santamaria *et al.*, 2003;).

1.6. METALLOPROTEASI

1.6.1. *Shedding*

Una piccola percentuale (2-4%) delle proteine di membrana possono essere tagliate proteoliticamente nella loro regione juxtamembrana attraverso un meccanismo denominato *shedding*, il quale comporta il rilascio della regione extracellulare (ectodominio). Tale processo è in grado di attivare, inibire o comunque modificare le proprietà funzionali dei substrati coinvolti. In primo luogo lo *shedding* può permettere a ligandi legati alla membrana di agire in maniera paracrina, anziché solo in maniera autocrina o juxtacrina. Inoltre anche alcuni recettori possono subire lo *shedding* ed essere di conseguenza attivati oppure inibiti. Infine il taglio dell'ectodominio di proteine recettore può far sì che i suoi ligandi vengano sequestrati e quindi inibiti (fig. 14) (Blobel, 2005).

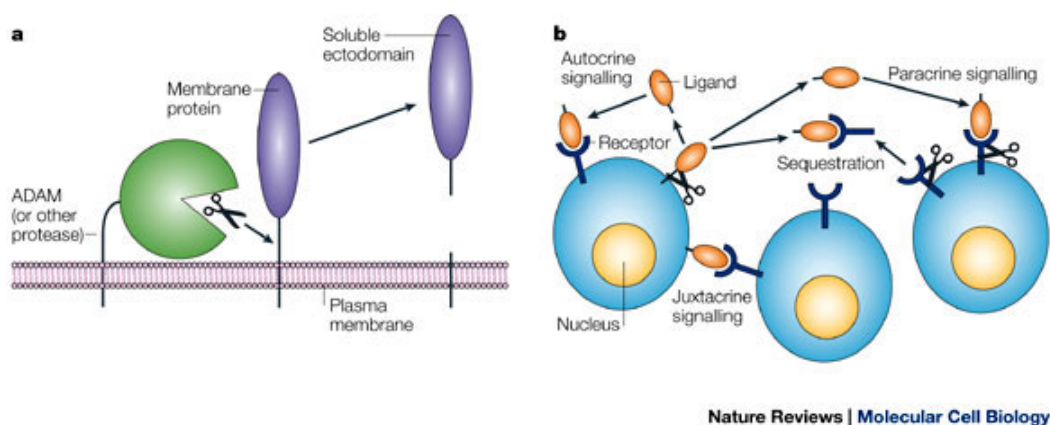


Fig. 14/ *Shedding* a) Rappresentazione schematica del rilascio dell'ectodominio di una proteina di membrana, mediato da una proteina ADAM o da un'altra proteasi. b) Possibile ruolo dello *shedding* nell'attività di ligandi e recettori di membrana. (Tratta da Blobel, 2005).

Recentemente è stato scoperto che in alcuni casi in seguito allo *shedding* il frammento citoplasmatico transmembrana può subire un ulteriore taglio proteolitico. Tramite tale processo denominato RIP (*regulated intramembrane proteolysis*) viene rilasciato un frammento citoplasmatico, il quale è trasportato nel nucleo, dove può regolare l'espressione genica.

Lo *shedding* è un processo regolato, infatti sebbene avvenga anche in cellule non stimolate (*shedding* basale), può essere attivato da diversi meccanismi indipendenti (fig. 15).

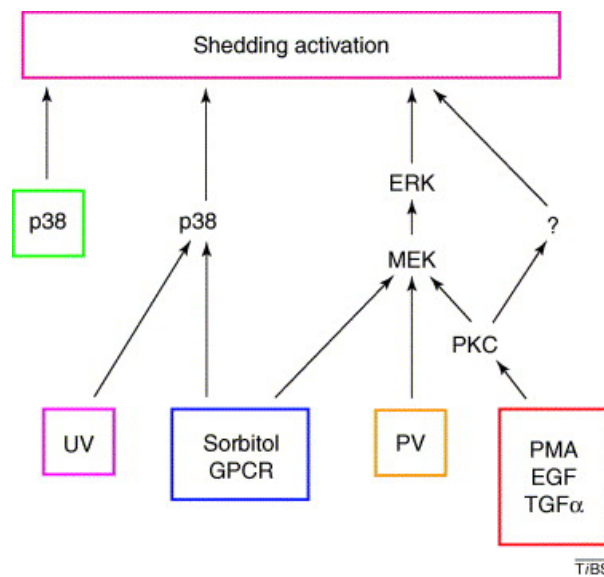


Fig. 15/ I pathway MAPK-dipendenti attivano lo *shedding*. La stimolazione associata al PMA può essere mediata da PKC anche indipendentemente da ERK, attraverso meccanismi non ancora identificati. PV, pervanadato; PMA, *phorbol myristate acetate*; EGF, *epidermal growth factor*; TGF α , *transforming growth factor α* ; PKC, *protein kinase C*; MEK, *MAPK/ERK kinase*; ERK, *extracellular signal-regulated kinase*. (Tratta da Huovila *et al.*, 2005).

Le proteine MAPK, p38 ed ERK, hanno un ruolo centrale nell'attivazione dello *shedding* mediato dalle proteine ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*). Radiazioni ultraviolette (UV), stress osmotico, GPCR (*G-protein-coupled receptors*), fattori di crescita (es. EGF e TGF- α) ed esteri del forbolo (es. PMA) causano l'induzione dello *shedding*; p38 sembra invece essere coinvolto nell'attivazione sia basale che indotta. (Arriba & Arroto, 2002).

Lo *shedding* regola una vasta gamma di substrati tra cui molecole d'adesione, numerosi fattori di crescita, citochine e recettori; svolgendo un ruolo nella modulazione di diversi processi cellulari, tra cui crescita, sviluppo (Kheradmand & Werb, 2002), attività immunitaria (Garton *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2008) ed adesione cellulare (Chang & Werb, 2001).

Alcune proteine della famiglia ADAM sembrano essere responsabili della maggior parte delle reazioni di *shedding* note (tab.1); anche altre proteasi sono però coinvolte, incluso alcuni membri della famiglia di metalloproteasi di matrice (*matrix metalloprotease*, MMP). Le proteine ADAM appartengono ad una vasta famiglia di glicoproteine transmembrana, sono evolutivamente conservate dai protozoi ai mammiferi e caratterizzate da specifici domini proteici. Finora sono state identificate circa 40 ADAM, meno della metà posseggono un sito catalitico attivo e solo alcune di queste sono state dimostrate essere effettivamente funzionali come proteasi, in particolare ADAM-17, ADAM-10 e ADAM-9.

Substrate	ADAMs ^c	Regulation
Cytokines		
CX3CL-1	10 ^C , 17 ^R	PMA
CXCL-16	10 ^{C,R}	IFN γ , TNF α
TNF α	17 ^R , 10, 9, 8	PMA, LPS, glutamate
TRANCE	19 ^C , 17	
Growth factors		
Amphiregulin	17 ^R , 15 ^R	PMA, carbachol, LPA, tobacco smoke, cannabinoids
Betacellulin	10 ^C	
EGF	10 ^C	
Epiregulin	(9, 12, 15) ^R , 17 ^R	PMA
HB-EGF	9 ^R , 10 ^R , 12 ^R , 17 ^R	TPA, PMA, GPCR agonists
Neuregulins	17, 19 ^{C,R}	PMA
TGF α	17 ^R , 15 ^R	PMA, FGF, PDGF, LPA
Receptors		
CD23	8, 15, 28	
CD30	17 ^R	PMA
CD40	17 ^C	
c-Kit	17 ^R	PMA
ErbB4	17 ^{C,R}	PMA, PV
GHR	17 ^R	PMA
IL-1 receptor-II	17 ^R , 8	PMA
IL-6 receptor	10 ^C , 17 ^R	PMA, MCD, IL-8, C5a, PAF, LTB4, FMLP
IL-15 receptor- α	17 ^{C,R}	PMA
M-CSFR	17 ^R	TPA, LPS
P75NTR	17 ^R	PMA, PV
TNF receptor-I	17 ^R , 8	PMA
TNF receptor-II	17 ^R , 9	PMA, TNF α
trkA (NGFR)	17 ^R	PMA, PV, UV, osmotic stress
Adhesion proteins		
CD44	10 ^R , 17 ^R	Ca ²⁺ , PMA
CHL1	8 ^C	
L1	10 ^R	PMA, MCD
L-selectin	17 ^R	PMA, DPA-NSAIDs
VCAM-1	17 ^R	PMA
Proteinases		
BACE1	10 ^R	PMA
Meprin- β	17 ^R	PMA
Oxytocinase	9, 12	
Other proteins		
APP	9, 10 ^{C,R} , 17 ^R	PMA
Collagen XVII	9, 10, 17	
Notch	10, 17	
Delta	10	
Jagged	17 ^R (or 10 ^R)	PMA
Ephrin-A2	10 ^R	
KL-1	8, 9, 17, 33 ^C	
Mucin-1	17 ^R	PMA
PrP	10 ^{C,R} , 17 ^R	TPA
Slit	10	

Tab.1 Substrati e regolazione delle proteine ADAM. La lettera C indica lo shedding costitutivo, R quello regolato. Abbreviazioni: APP, *amyloid precursor protein*; BACE, *β -site PP-cleaving enzyme*; CD, *cluster of differentiation*; CHL1, *close homologue of L1*; CXCL/CX3CL, *chemokine ligand*; DPA-NSAIDs, *diphenylamine-based non-steroid anti-inflammatory drugs*; FGF, *fibroblast growth factor*; GHR, *growth hormone receptor*; HB-EGF, *heparin-binding EGF-like growth factor*; IGN, *interferon*; LPA, *lysophosphatidic acid*; p75NTR, *p75 neurotensin receptor*; PAF, *platelet-activating factor*; PrP, *prion protein*; TPA, *tetradecanoylphorbol myristate acetate*; TRANCE, *TNF-related activation induced cytokine*, trkA, *neurotrophic tyrosine kinase type 1*; VCAM, *vascular cell-adhesion molecule*. Per le singole referenze bibliografiche vedere Huovila *et al.*, 2005; da cui è tratta la tabella.

1.6.2. *A Disintegrin And Metalloprotease-17 (ADAM-17)*

Adam-17 fu la prima proteina ADAM implicata nello *shedding*, identificata come responsabile del rilascio del TNF- α solubile (sTNF- α) e per questo denominata anche TACE (*Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme*). Il TNF- α infatti è sintetizzato come un precursore (proTNF- α) di 26 kDa ancorato alla membrana e solo successivamente processato nella forma matura solubile da 17 kDa. Il pro-TNF- α e il sTNF- α hanno effetti fisiologici distinti, mediati da due diversi recettori, rispettivamente TNFR2 (p75) e TNFR1 (p55). ADAM-17 è in grado di rilasciare l'ectodominio anche di queste due proteine, oltre che di un vasto numero di altri recettori e ligandi (tab. 1) (Mezyk *et al.*, 2003; Newton *et al.*, 2001; Serino *et al.*, 2007; Smookler *et al.*, 2006; Tellier *et al.*, 2006). Tale capacità aumenta la complessità della comprensione della regolazione TACE-dipendente dell'attività del TNF- α . Infatti se da un lato sTNF- α è in grado di agire in maniera paracrina, inducendo un'inflammatione sistemica; dall'altro il taglio proteolitico dei suoi recettori, potrebbe diminuire la loro disponibilità sulla superficie cellulare, limitando così la responsività a tale chemochina. Inoltre entrambe le forme solubili dei recettori sono in grado di legare sTNF- α , riducendo così i suoi effetti sistemici (Aderka, 1996).

Per quanto riguarda la regolazione di ADAM-17, essa agisce a diversi livelli. In primo luogo questa proteasi subisce una modulazione trascrizionale, ed esempio viene sovra-regolata in seguito ad una risposta infiammatoria; inoltre è espressa differenzialmente in diversi tessuti e nei vari stadi di sviluppo. Adam-17 inoltre subisce uno *splicing* alternativo, il quale genera due trascritti maturi, di cui il più corto codifica per una proteina priva della coda citoplasmatica. Tale regione è soggetta all'interazione con

diverse proteine (MAD2, Nelson *et al.*, 1999; PTHB1, Zheng *et al.*, 2002; SAP97, Peiretti *et al.*, 2003; FHL2, Canault *et al.*, 2006) e alla fosforilazione da parte di varie chinasi (es. ERK, Soond *et al.*, 2005; Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002); processi che sembrano regolare in diversa maniera tale proteasi. Inoltre TACE è attivata a livello post-traduzionale attraverso la rimozione del suo pro-dominio ad opera di proproteine convertasi.

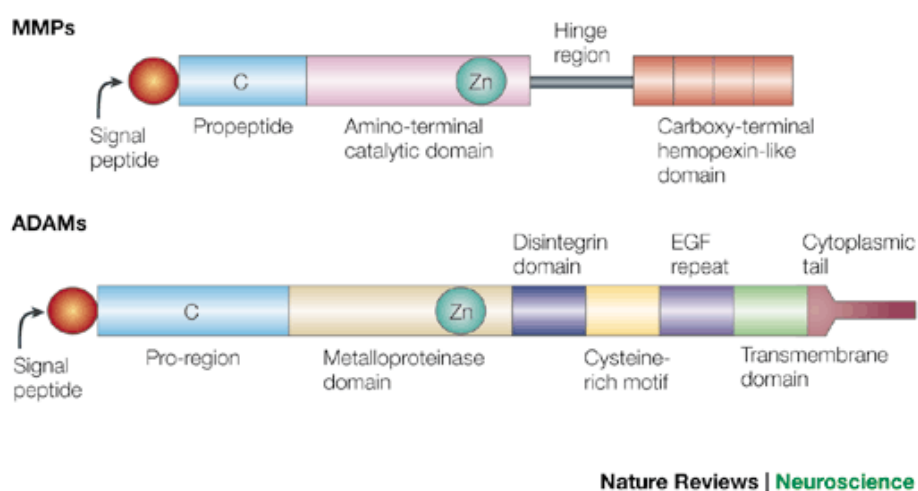


Fig .16/ Rappresentazione dei domini funzionali delle proteine MMP e ADAM. Alcune ADAM non posseggono un sito di legame allo zinco (Zn) attivo, mentre altre ADAM nella loro forma matura non mantengono il dominio metalloproteasico. Tali proteine sono quindi cataliticamente inattive. (Tratta da Yong *et al.*, 2001).

Anche la stabilità di tale proteina può essere modulata, infatti sebbene il PMA in tempi brevi ne stimoli l'attività (fig. 15), successivamente ne provoca l'internalizzazione e degradazione. Sembrerebbe che la produzione di ROS sia coinvolta nell'attivazione di *shedding* indotta da PMA e più in generale sia le specie di ossigeno reattive che l'ossido nitrico (oltre agli induttori menzionati nella fig. 15) sembrano avere un ruolo

nell'attivazione di TACE. Infine ADAM-17 è regolata dall'inibitore tissutale di metalloproteasi-3 (Timp-3) (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002; Doedens & Black, 2000; Huovila *et al.*, 2005; Mezyk *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2001).

Sebbene la maggior parte degli eventi di *shedding* avvenga sulla membrana cellulare, in alcuni casi tali processi sono svolti intracellularmente, probabilmente in maniera dipendente dal tipo di cellula e di substrato. Ad esempio è stato suggerito che la colocalizzazione di TACE e di alcuni suoi substrati nei *lipid raft* (microdomini di membrana ricchi in colesterolo) possa avere un ruolo regolatorio nello *shedding* di tali molecole (Huovila *et al.*, 2005; Tellier, *et al.*, 2006).

Oltre che nella regolazione della risposta immune, TACE ha un ruolo primario nello sviluppo, come dimostrato dalla mortalità perinatale di topi privi dell'attività di tale proteina. Inoltre l'attività di questa proteasi, in quanto attivatore d'inflammatione, si ripercuote anche sull'omeostasi metabolica. In primo luogo la funzionalità di TACE o di Timp-3 potrebbe essere alterata in soggetti affetti da malattie metaboliche e infiammatorie croniche, come suggerisce l'aumentato livello in circolo delle forme solubili dei substrati di ADAM-17. Inoltre è stato scoperto che l'aploinsufficienza di TACE conferisce una parziale protezione nei confronti dell'insulino-resistenza e dell'inflammatione indotta da una dieta ricca di grassi (*high fat diet*, HFD) (Serino *et al.*, 2007).

1.6.3. Metalloproteasi di matrice (MMP)

Le metalloproteasi di matrice appartengono, insieme alle proteine ADAM, alla stessa superfamiglia di metalloendopeptidasi Zinco-dipendenti, caratterizzata dalla struttura del loro dominio catalitico (fig. 16). Altro elemento in comune tra le due famiglie è inoltre la presenza del pro-dominio.

Le MMP sono secrete o ancorate alla membrana; pertanto i loro substrati sono proteine di membrana, proteine secrete o extracellulari. La loro attività catalitica è regolata a livello trascrizionale, attraverso compartimentazione, attivazione del pro-enzima da parte di proproteine convertasi o inattivazione dell'enzima mediata da inibitori fisiologici. Generalmente queste proteine non sono espresse nei tessuti sani (tranne che durante lo sviluppo embrionale), ma durante processi di riparo, rimodellamento e in condizioni patologiche, quali l'infiammazione. E' ormai noto infatti che le MMP oltre ad essere responsabili del catabolismo della ECM, hanno un ruolo attivo nella modulazione del sistema immune (fig. 17) (Parks *et al.*, 2004; Santos-Martinez *et al.*, 2007).

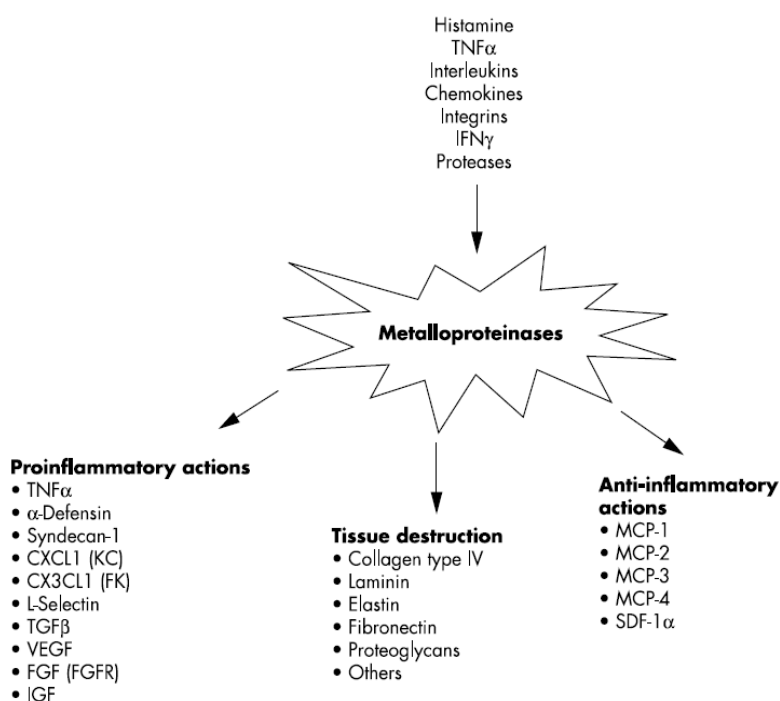


Fig. 17/ Attività delle metalloproteinasi. Le MMP possono svolgere la loro funzione tramite lo *shedding* di un vasto numero di substrati. Molecole pro-infiammatorie possono attivare le MMP, comportando la modulazione della risposta immune, oltre che il rimodellamento dell'ECM. (Tratta da Mohammed *et al.*, 2003).

Il duplice effetto delle MMP sia nell'attivazione che nell'inibizione di diverse proteine infiammatorie, sottolinea la necessità di una fine regolazione di queste proteasi, in grado

di assicurare con una giusta tempistica l'appropriato avvio e arresto delle reazioni d'inflammation (Mohammed *et al.*, 2003).

La mancata regolazione dell'attività delle MMP può indurre o potenziare la crescita e sopravvivenza tumorale, l'invasione, l'angiogenesi e la metastasi (Chang & Weber, 2001); può inoltre essere responsabile dell'insorgenza di altre patologie, quali ad esempio artrite, aterosclerosi e fibrosi (Visse & Nagase, 2003).

1.6.4. Inibitori tissutali di metalloproteasi (TIMP)

Finora sono state identificate quattro proteine TIMP (Timp-1,-2,-3 e -4), espresse in un vasto numero di tessuti e sistemi biologici, responsabili dell'inibizione delle MMP, come anche di alcune proteine ADAM. Queste proteine sono degli inibitori ad ampio spettro, in grado di modulare l'attività di molte metalloproteasi di matrice.

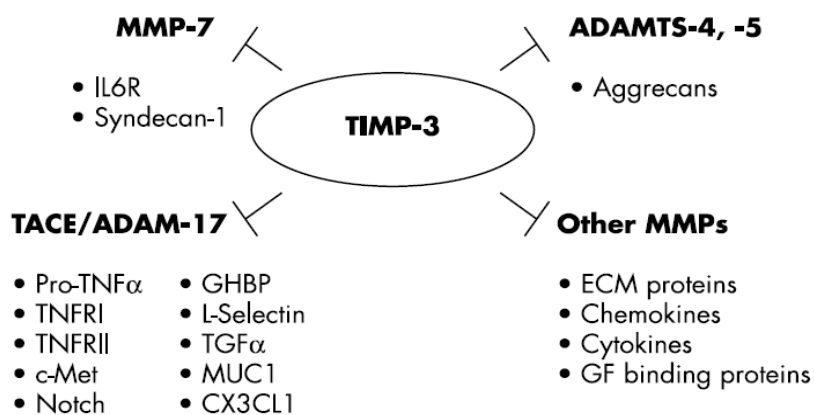


Fig. 18/ Substrati di Timp-3. Le ADAMTS, caratterizzate dalle presenza di domini di trombospondina, appartengono alla stessa superfamiglia delle ADAM e delle MMP. (Tratta da Mohammed *et al.*, 2003).

A differenza delle altre TIMP, le quali sono proteine solubili, Timp-3 è una proteina secreta e legata all'ECM; inoltre tale molecola è l'unico inibitore fisiologico di TACE (fig. 18) (Mohammed *et al.*, 2003).

Le TIMP hanno multiple attività biologiche, quali la regolazione dell'apoptosi e l'inibizione della migrazione cellulare e dell'angiogenesi. Timp-3 è attivato da molecole coinvolte nell'infiammazione, come il TGF- β e il PMA, e a sua volta, controllando lo *shedding* del TNF- α e di altre molecole infiammatorie, svolge un ruolo fondamentale come regolatore fisiologico dell'infiammazione (fig. 19) (Black, 2004; Qui *et al.*, 2003; Smookler *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2005). Nello specifico è stato dimostrato che la riduzione o la deficienza di TIMP-3 comporta un'aumentata attività di TACE e un incremento di TNF- α , associato con l'induzione d'infiammazione (Federici *et al.*, 2005; Mohammed *et al.*, 2004).

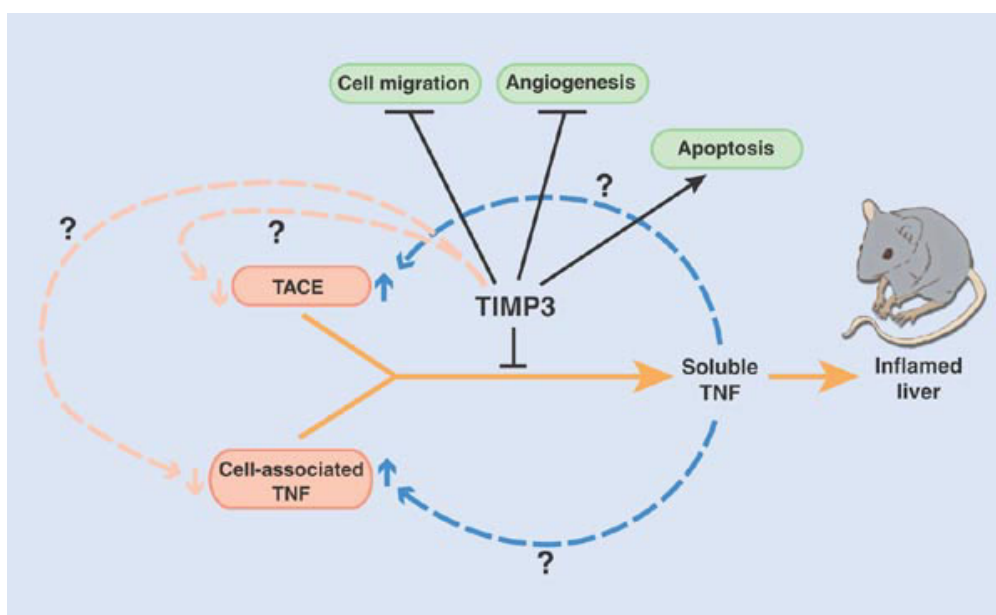


Fig. 19/ Timp-3 e l'infiammazione. La deficienza di Timp-3, oltre ad aumentare l'attività di TACE, comporta un incremento del TNF- α legato alla membrana. Ancora non è stato chiarito se tali effetti siano dovuti direttamente all'assenza di Timp-3 o se siano provocati indirettamente, dalla maggiore presenza del TNF- α solubile. (Tratta da Black, 2004).

Per quanto riguarda il ruolo di Timp-3 dal punto di vista più strettamente metabolico, è stata riscontrata una riduzione di Timp-3 nel tessuto adiposo di modelli murini di obesità (Chavey *et al.*, 2003). Inoltre è stata individuata una riduzione di Timp-3 nel muscolo scheletrico di topi $Insr^{+/-}$ diabetici rispetto a topi $Insr^{+/-}$ normoglicemici (Federici *et al.*, 2005). Partendo da questo presupposto è stato successivamente provato che in topi $Insr^{+/-}$ $TIMP-3^{-/-}$ ad HFD, la deficienza di Timp-3 potenzia gli effetti indotti dall'aploinsufficienza del recettore insulinico e dalla dieta, quali insulino-resistenza, infiammazione e NAFLD (Federici *et al.*, 2005; Menghini *et al.*, 2008).

2. PROTEOMICA *SHOTGUN*

Il termine proteoma fu introdotto nel 1995 da un gruppo australiano (Wasinger *et al.*, 1995) per definire l'insieme delle proteine espresse nella cellula. Il termine proteomica si riferisce quindi allo studio su larga scala delle proteine derivate da una data linea cellulare, tessuto oppure organismo (Anderson *et al.*, 1996). La proteomica può essere fatta risalire agli anni Settanta, quando i ricercatori iniziarono a costruire banche dati di proteine utilizzando la nuova tecnica appena messa a punto dell'elettroforesi bi-dimensionale su gel (O'Farrell, 1975). Risultava, però, molto difficile determinare l'identità delle proteine così separate, a causa della mancanza di metodi analitici sensibili e rapidi per la caratterizzazione delle proteine. Negli anni Novanta la spettrometria di massa delle macromolecole biologiche emerge e si impone come metodo analitico potente, in grado di rimuovere tutte le precedenti limitazioni nell'analisi delle proteine. Nasce così una nuova era grazie anche alla disponibilità, in banche dati di dominio pubblico, delle sequenze codificanti di DNA di vari organismi.

La proteomica *shotgun* è un metodo per identificare le proteine in una miscela complessa che usa la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (Hu *et al.*, 2007; Fournier *et al.*, 2007; Nesvizhskii, 2007). Nella proteomica tradizionale le proteine vengono separate tramite elettroforesi bi-dimensionale e successivamente digerite e analizzate individualmente. Mentre nella proteomica *shotgun* viene digerita l'intera miscela proteica e i peptidi ottenuti sono separati e identificati in contemporanea.

2.1. CROMATOGRAFIA

L'invenzione della cromatografia viene attribuita al biochimico russo Michail Cvet, quando all'inizio del XX secolo riuscì, con questa tecnica, a separare la clorofilla da un estratto vegetale. Il termine cromatografia (scrittura del colore, dal greco *chroma*, colore e *graphein* scrivere) richiama alla separazione di bande di diverso colore e viene ancora oggi utilizzata, anche se raramente la separazione si basa sulla differenza cromatica. La cromatografia, indica un insieme di tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti. Nata come tecnica separativa e sviluppatasi in seguito anche come tecnica analitica, si basa sul fatto che i vari componenti di una miscela tendono a ripartirsi in modo diverso tra due fasi, in funzione della loro affinità con ciascuna di esse. Una fase liquida o gassosa (la *fase mobile*) fluisce in continuo su una fase fissa (la *fase stazionaria*), che è generalmente un solido o un gel. Nella cromatografia su colonna il campione è trattenuto dalla fase stazionaria da interazioni chimiche o fisiche, durante l'attraversamento della colonna.

La fase mobile è costituita dal campione da separare/analizzare diluito in un solvente, il quale permette al campione di fluire lungo la colonna. Per aumentare l'efficienza di separazione spesso viene utilizzata un'eluizione in gradiente, variando la composizione della fase mobile nel corso dell'analisi. Comunemente i solventi utilizzati sono combinazioni miscibili di acqua e vari composti liquidi organici (i più comuni sono l'acido metilico e l'acetonitrile). Un acido organico volatile, come l'acido formico o l'acido trifluoroacetico, è spesso aggiunto alla fase mobile, nel caso in cui le frazioni eluite siano utilizzate in analisi di spettrometria di massa (Hamilton & Sewell, 1982).

Il tempo in cui uno specifico analita eluisce (esce dalla colonna) è chiamato tempo di ritenzione ed è considerato una caratteristica identificativa unica per un dato analita (Jonsson, 1987).

Nella cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) la fase mobile è un liquido e la forza che permette a tale fase di scorrere è data dalla pressione applicata da una pompa in testa alla colonna. L'uso della pressione, aumentando la velocità di scorrimento della fase mobile, riduce i fenomeni diffusivi, migliorando la risoluzione del cromatogramma.

Generalmente l'HPLC tradizionale è effettuata utilizzando una fase stazionaria adesa all'esterno di piccolissime particelle sferiche di silice. La riduzione nella dimensione di tali particelle ne aumenta la superficie e permette una migliore separazione. Sono però richieste pressioni di pompaggio di diverse centinaia di atmosfere (fino a 6000 psi), per raggiungere velocità di flusso sufficienti a permettere una buona separazione in colonne impaccate con particelle di diametro variabile dai 3 ai 10 μm (la pressione richiesta è infatti inversamente proporzionale al quadrato del diametro delle "biglie" di silice). L'HPLC è suddivisa in due sottoclassi in base alla polarità delle fasi. La tecnica in cui la fase stazionaria è più polare di quella mobile (es. toluene come fase mobile e silice come fase stazionaria) è denominata cromatografia liquida a fase normale (NPLC), mentre nella condizione opposta (es. miscela di acqua e acetonitrile come fase mobile e C18 come fase stazionaria) si parla di cromatografia liquida a fase inversa (RPLC). In quest'ultimo caso il tempo di ritenzione è maggiore per sostanze non polari, ovvero le sostanze polari eluiscono prima. La NPLC ha poche applicazioni, mentre la RPLC ha un vasto utilizzo.

Per la sua versatilità e ampia applicabilità l'HPLC è attualmente una delle tecniche di separazione più ampiamente usate a scopi qualitativi e quantitativi. I sistemi moderni di HPLC sono stati migliorati per poter lavorare ad altissime pressioni (fino a 15000 psi), permettendo l'utilizzo di particelle di silice con diametro minore di 2 μm . Tale sistema, denominato UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) permette di lavorare con quantità ridottissime di campione, aumenta la sensibilità, la risoluzione e la velocità di separazione (Swartz, 2005).

2.2. SPETTROMETRIA DI MASSA

LC/MS è la tecnica che combina la versatilità della cromatografia liquida con la sensibilità ed il potere identificativo della spettrometria di massa.

La spettrometria di massa trae le sue origini dalle esperienze di J.J. Thomson, (premio Nobel nel 1906) il quale mise in evidenza la formazione di elettroni e "radiazioni positive" in un tubo posto sotto vuoto, nel quale veniva applicata una differenza di potenziale elettrico. Tale fisico capì che questa nuova tecnica poteva essere utile per l'analisi di sostanze chimiche (Thomson, 1913). Nonostante questa lungimirante osservazione, l'applicazione primaria della spettrometria di massa rimase confinata nel campo della fisica per molti anni, perché questa tecnica richiede che l'analita sia in fase gassosa ed abbia una carica elettrica, mentre le biomolecole sono grandi, polari e termicamente labili, quindi difficilmente trasferibili nella fase gassosa e ionizzabili. Solo negli anni Ottanta e poi su larga scala negli anni Novanta la spettrometria di massa si è imposta come disciplina emergente e significativa nel campo delle scienze biologiche grazie allo sviluppo di due metodologie di ionizzazione, la ionizzazione a elettrospray

(ESI) (Fenn *et al.*, 1989) e la ionizzazione per desorbimento assistita da matrice indotta da laser (MALDI) (Karas & Hillenkamp, 1988; Tanaka *et al.*, 1988). Queste due tecniche, definite come metodi di ionizzazione *soft*, risolsero il problema di generare ioni da analiti non volatili e di grandi dimensioni, come proteine e peptidi; quindi diventarono metodi di elezione proficuamente applicati allo studio delle macromolecole biologiche grazie anche al successivo sviluppo, che prosegue tutt'ora, di strumentazione sempre più potente. L'importanza della spettrometria di massa applicata alla ricerca biologica è stata sottolineata dal conferimento, nel 2002, a J. Fenn e K. Tanaka del premio Nobel per la Chimica “per il loro sviluppo di metodi gentili di ionizzazione per desorbimento applicabili all'analisi di spettrometria di massa di macromolecole biologiche”.

2.2.1. Spettrometro di massa

La spettrometria di massa misura una proprietà intrinseca delle molecole, cioè la loro massa, con elevata sensibilità. Uno spettrometro di massa è uno strumento che permette di misurare la massa di una molecola dopo che essa è stata ionizzata, o più precisamente il rapporto massa/carica (m/z) degli ioni che si formano dalla molecola in esame. Uno spettrometro di massa permette quindi di ottenere informazioni dall'analisi di ioni in fase gassosa ed è composto tipicamente da tre componenti: una camera di ionizzazione o sorgente, un analizzatore di massa e un rivelatore (*detector*) (fig.20). La sorgente crea dal campione gli ioni e i loro eventuali frammenti. L'analizzatore di massa, in cui è generato il vuoto, risolve e separa gli ioni in base al loro rapporto m/z . Il rivelatore raccoglie gli ioni e genera un insieme di segnali elettrici, proporzionali al numero degli ioni, che viene

registrato dal sistema di elaborazione dati e convertito in uno spettro di massa, cioè un diagramma di abbondanza ionica in funzione del rapporto m/z (Mann *et al.*, 2001).

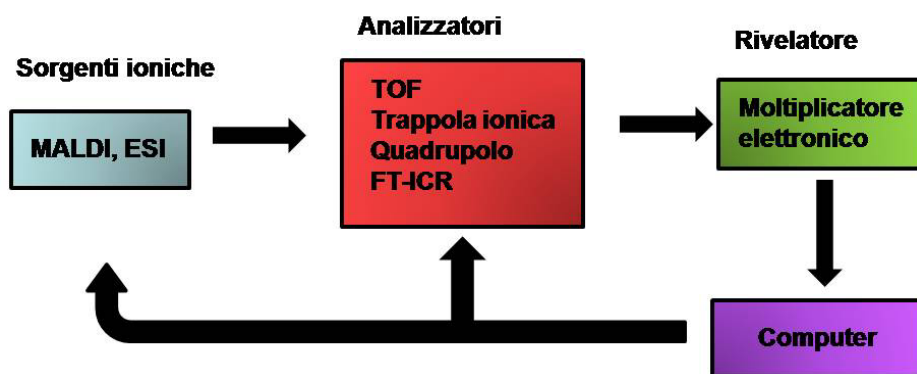


Figura 20/ Schema di uno spettrometro di massa

a) Sorgente ESI

Nella ionizzazione a elettrospray (ESI) gli ioni sono generati a pressione atmosferica facendo passare il campione in soluzione attraverso un piccolo capillare posto ad una differenza di potenziale rispetto al controelettrodo (da +500 V a +4500 V). Il voltaggio richiesto dipende sia dal diametro interno dell'ago che dal solvente che costituisce la soluzione. Sia il diametro interno del capillare che la velocità di flusso del solvente determinano i particolari parametri ESI, che distinguono micro-ESI da nano-ESI. Tipiche strumentazioni nanospray consistono di capillari di silice fusa o vetro con aperture del diametro interno minori di 10 μm , in cui la soluzione normalmente fluisce ad una velocità minore di 100 nL/min; capillari più larghi (tra 10 e 100 μm) vengono utilizzati in micro-spray con velocità di flusso leggermente più alte (tra 100 e 500 nL/min). Il processo di *spraying* elettrostatico genera inizialmente, a partire dal flusso di soluzione espulso

dall'apertura dell'ago sottoposto ad alto voltaggio, un aerosol di goccioline cariche in cui sono presenti sia molecole di analita che di solvente, con carica netta positiva o negativa a seconda della polarità del voltaggio applicato (fig.21).

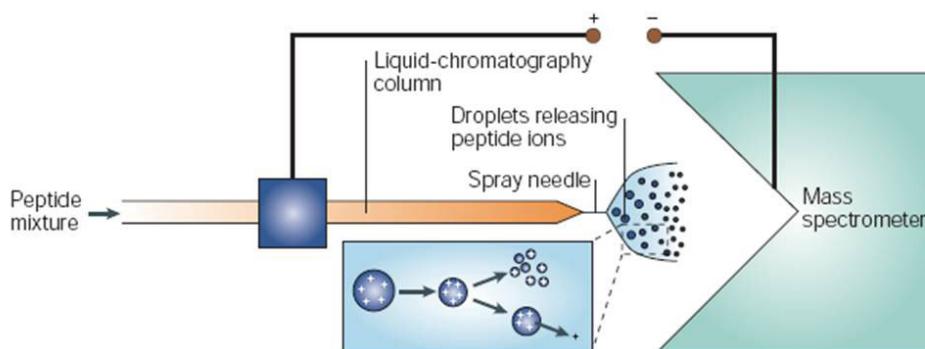


Figura 21/ Rappresentazione schematica di una sorgente ESI. (Tratta da: Steen H. Mol Cell Biol 5:699-711, 2004)

Un flusso di gas inerte (azoto) concentrico può essere utilizzato per facilitare questo processo di nebulizzazione. Il solvente viene eliminato dalle goccioline grazie al capillare ad alte temperature e al gas inerte; gli ioni dell'analita vengono invece spinti verso l'analizzatore di massa. Il processo di protonazione/deprotonazione, che rende carichi elettricamente gli ioni di importanza biologica, è il fenomeno di maggiore importanza nell'ESI. Infatti proteine, peptidi, oligonucleotidi e altre molecole con funzionalità acido/base hanno molti siti di protonazione/deprotonazione che ne determinano l'acquisizione multipla di cariche, la quale permette sia un aumento nella precisione della misurazione (aumento di segnali associati ad ogni singola specie molecolare), sia la possibilità di analizzare molecole ad alto peso molecolare (l'aumento delle cariche diminuisce il valore m/z e lo fa rientrare nella finestra di acquisizione disponibile). Dato

che l'ESI ionizza l'analita a partire da una soluzione, di importanza fondamentale è la possibilità di accoppiare lo spettrometro di massa con tecniche di separazione in fase liquida, quali la cromatografia liquida (Niessen *et al.*, 1995) e l'elettroforesi capillare (Krylov & Dovichi, 2000), per concentrare e purificare i peptidi prima dell'analisi di massa, permettendo così lo studio estensivo, rapido e altamente sensibile di complessi campioni biologici.

b) Analizzatori a raggio

Esistono differenti tipi di analizzatori basati su diversi principi fisici; i principali in uso sono cinque, divisi in due gruppi: analizzatori a raggio e analizzatori a trappola. Negli analizzatori a raggio (a tempo di volo e a quadrupolo) gli ioni lasciano la sorgente come un fascio e passano attraverso la regione dell'analizzatore raggiungendo il rivelatore. Negli analizzatori a trappola gli ioni sono intrappolati nella regione dell'analizzatore dopo essersi formati nell'analizzatore stesso o esser stati iniettati da una sorgente di ioni esterna. Esistono strumenti ibridi che incorporano un tipo di analizzatore con un altro tipo (ad esempio il quadrupolo-tempo di volo, Q-TOF).

- Analizzatori a quadrupolo (Q)

L'analizzatore a quadrupolo utilizza campi elettrici per separare gli ioni in base alla loro m/z ed è composto da quattro aste cilindriche solide e parallele, accoppiate, con sezione trasversale circolare, a cui sono applicate tensioni sia continue (DC, Direct Current) sia in radiofrequenza alternate (RF), le quali formano un "tubo" di campo elettrico (Fig. 24).

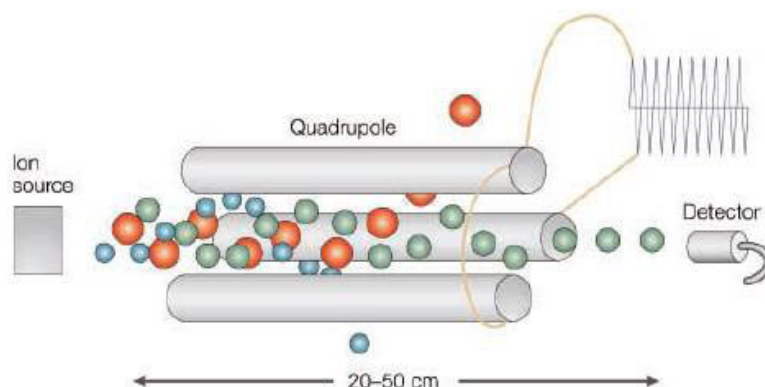


Figura 24. Schematizzazione di un quadrupolo (Tratta da Glish GL. Drug Discovery, 2: 140-150, 2003).

Gli ioni vengono sia deflessi verso le barre che focalizzati verso il *detector* a seconda del campo elettrico generato; per un dato valore di condizioni di campo elettrico solo alcune traiettorie sono stabili, permettendo solo agli ioni di massa specifica di essere trasmessi al rivelatore. L'alterazione delle frequenze e della forza del campo elettrico permette la rivelazione dei diversi ioni. L'ampiezza della finestra di masse analizzabili e la risoluzione dipendono principalmente dalla dimensione fisica (lunghezza e diametro) dei poli. Gli analizzatori a quadrupolo si interfacciano efficientemente con sorgenti ESI perché tollerano molto bene le relativamente alte pressioni prodotte da questo tipo di sorgente, che inoltre generano ioni con cariche multiple, i quali coprono in modo ottimale la finestra di valori m/z rivelabili dal quadrupolo (Yost & Boyd, 1990).

- Analizzatori a tempo di volo (TOF)

Un analizzatore a tempo di volo separa gli ioni in base alla loro velocità (Weickhardt *et al.*, 1996). Teoricamente tutti gli ioni si formano nello stesso momento e nello stesso luogo nella sorgente dello spettrometro di massa e vengono poi accelerati grazie ad un

potenziale fisso (1-20kV) posto prima del cosiddetto tubo di volo, regione di deriva in cui non vi è campo elettrico e posta sotto vuoto. Dopo l'accelerazione in sorgente, gli ioni viaggiano ad una velocità costante e dipendente dalla loro massa, lungo una distanza fissa (il tubo di volo, generalmente 0,5-2 m), prima di raggiungere il detector. Misurando il tempo impiegato per arrivare al rivelatore dopo che l'ione si è formato si può determinare il rapporto m/z dello ione (esperimenti di TOF lineare).

Per aumentare la risoluzione i più sofisticati strumenti includono anche un *reflectron* (Wiley & McLaren., 1955) Gli ioni dopo aver viaggiato lungo una certa distanza entrano in uno specchio elettrostatico (il *reflectron*) che cambia la direzione degli ioni inviandoli in una seconda regione di volo, estendendo il percorso effettuato dallo ione prima di raggiungere il *detector* (fig. 23). La funzione del reflectron è quella di compensare le piccole differenze nelle velocità di ioni con lo stesso m/z , focalizzandoli nel tempo e fornendo così picchi più sottili nello spettro (risoluzione più elevata).

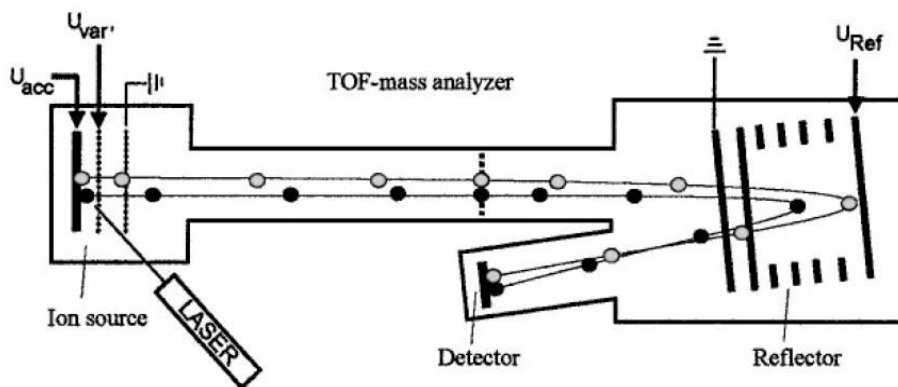


Figura 23/ Rappresentazione schematica di un analizzatore a tempo di volo.
(Tratta da Mann M Annu. Rev. Biochem., 70:437-73, 2001)

2.2.2. Spettrometria di massa tandem

La spettrometria di massa tandem (MS/MS) è basata sulla capacità dell'analizzatore di isolare uno ione, sottoporlo ad ulteriore frammentazione ed analizzarne gli ioni frammentati risultanti. Come implica il nome, MS/MS consiste in due stadi di spettrometria di massa. Nel primo stadio gli ioni di una determinata m/z , rivelati dal primo analizzatore e definiti ione parente o ione precursore, vengono isolati dagli altri e sono soggetti a processi che aumentano l'energia interna degli ioni, causandone la dissociazione. Gli ioni che ne derivano sono definiti ioni prodotto e vengono analizzati nel secondo stadio di MS, separati da un secondo analizzatore prima di essere rivelati dal *detector*.

Gli strumenti MS/MS sono classificati in due categorie: *tandem-in-space* e *tandem-in-time*. Nel primo tipo sono necessari due distinti analizzatori del tipo a fascio, invece gli analizzatori a trappola sono tipicamente *tandem-in-time*, dato che i vari stadi di MS/MS avvengono nello stesso analizzatore ma in tempi separati e ciò fornisce la possibilità di effettuare stadi multipli di MS/MS (MS^n) con un singolo analizzatore. Gli esperimenti di MS^n , in cui n corrisponde al numero di stadi di MS effettuati, sono particolarmente utili nell'analisi di miscele complesse (Glish, 1994).

La decomposizione indotta per collisione (CID) è il metodo di dissociazione quasi universalmente usato nella spettrometria MS/MS. Lo ione parente analizzato nel primo analizzatore viene isolato in una cella di collisione dove collide con un gas inerte (come ad esempio l'elio), aumentandone così l'energia cinetica, di cui una parte può essere convertita in energia interna e causare la frammentazione dello ione stesso (McLucky,

1992). Un esperimento di MS/MS fornisce informazioni sulla m/z sia degli ioni parenti sia degli ioni frammento.

Il *peptide sequencing* è la strategia d'identificazione proteica che si basa sulla rottura casuale, ottenuta grazie alla CID, dei legami peptidici, la quale fornisce una serie ionica necessaria per l'identificazione della proteina in esame (Fig. 25).

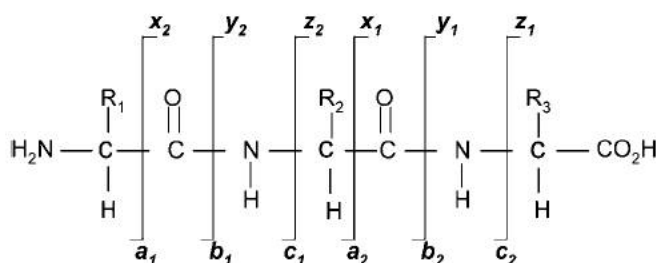


Figura 25/ Frammentazione peptidica. La frammentazione degli ioni indotta da CID avviene generalmente lungo lo scheletro peptidico e la rottura più comunemente osservata avviene tra il gruppo carbossile e quello ammidico formando la serie y e la b. I frammenti peptidici che conservano la carica positiva sull'N-terminale sono designati come a, b e c; i frammenti che la mantengono sul C-terminale sono detti x, y e z. (Tratta da Lim MS Laboratory Investigation 84, 1227–1244, 2004).

Molti legami della sequenza peptidica sono suscettibili al taglio ma i rilevanti al fine del sequenziamento in spettrometria tandem sono quelli che avvengono lungo lo scheletro peptidico. La natura predicibile della frammentazione peptidica indotta dal CID rende possibile identificare una proteina dai *pattern* di frammentazione ottenuti. I dati sia relativi allo ione parente che agli ioni frammento vengono infatti analizzati attraverso particolari *software* che applicano algoritmi volti a ricostruire la precisa sequenza amminoacidica, ottenendo evidenze inequivocabili per l'identificazione proteica. MS/MS ha dunque il vantaggio di permettere l'identificazione precisa di un polipeptide in una

miscela complessa di proteine; infatti il *matching* di più spettri MS/MS (spettro dello ione parente e di tutti gli ioni frammento) con una singola proteina aumenta notevolmente il valore di confidenza dell'identificazione (Fig. 26)

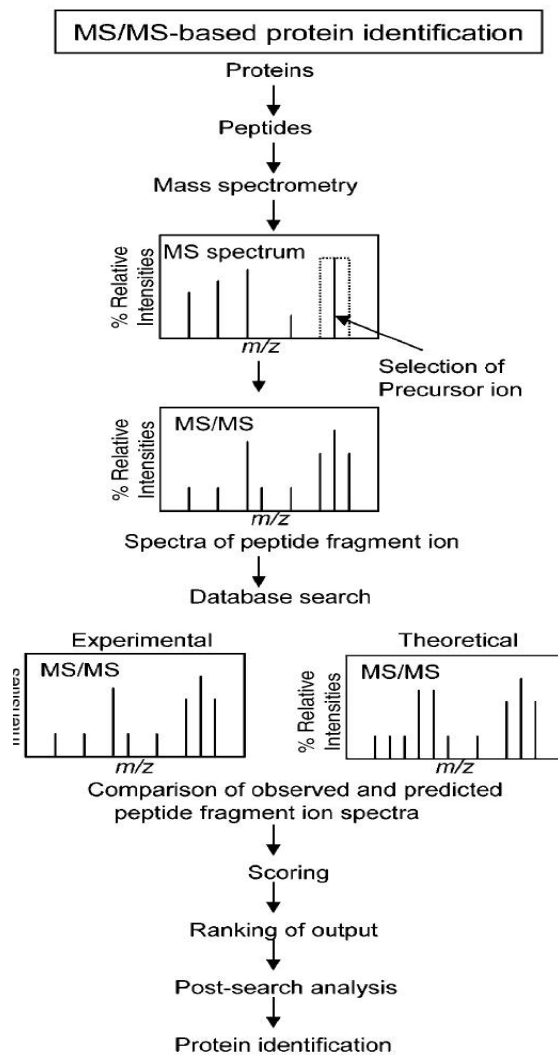


Figura 26/ Identificaziune proteica (Tratta da Lim MS Lab Invest 84: 1227–1244, 2004).

MATERIALI E METODI

1. MODELLO ANIMALE

I topi *Timp-3^{-/-}* utilizzati sono stati precedentemente descritti (Leco *et al.*, 2001). Gli animali sono stati alimentati con una dieta *ad libitum* e con libero accesso all'acqua; mantenuti ad un ciclo di 12 ore luce/buio, in ambiente asettico. Per 16 settimane i topi sono stati nutriti con una dieta ad alto contenuto lipidico (HFD, 58% Kcal derivanti da grassi, Research Diet) (Tab.2).

HFD 58%	
proteine	24%
grassi	34%
carboidrati	38%
fibra	6%
ceneri	4%
acqua	12%

Tab.2/ Composizione della dieta HFD

2. ANALISI METABOLICHE *IN VIVO*

2.1. Misurazione del peso e della glicemia

Le operazioni di peso e controllo della glicemia, a digiuno ed in condizione di libero accesso al cibo, sono state effettuate ogni due settimane. Il sangue è stato prelevato dalla cavità retro-orbitale del topo, mediante l'utilizzo di capillari eparinizzati (Vitrex) e i valori glicemici sono stati determinati utilizzando le striscette reattive OneTouch Ultra e un glucometro commerciale (LifeScan, Johnson & Johnson). Il siero, ottenuto dalla centrifugazione dei campioni di sangue a 6000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente, è stato utilizzato per la determinazione dell'insulinemia.

2.1. Determinazione dei livelli insulinici

La valutazione quantitativa dell'insulina, è stata effettuata mediante Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA (Mercodia). 5 µl di siero sono stati incubati con due anticorpi monoclonali diretti contro due diversi determinanti antigenici della molecola d'insulina. Durante l'incubazione l'insulina presente nel campione reagisce con un anticorpo anti-insulina coniugato con la perossidasi ed un anticorpo anti-insulina legato al pozzetto. I lavaggi rimuovono l'enzima non legato e l'anticorpo marcato in eccesso, mentre il legame del coniugato è determinato tramite reazione con *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*. La reazione viene bloccata con aggiunta di acido, con conseguente reazione colorimetrica che può essere misurata spettrofotometricamente a 450 nm.

2.2. Curve glicemiche

Le curve glicemiche sono state eseguite su animali sottoposti a 16 settimane di dieta. Dopo un digiuno notturno, un test di tolleranza al glucosio (IPGTT, *intraperitoneal glucose tolerance test*) è stato effettuato, iniettando 2gr/Kg di peso corporeo di D-glucosio per via intraperitoneale. Campioni di sangue sono stati prelevati dalla cavità retro-orbitale del topo a 0, 30, 60, 90 e 120 minuti dopo l'iniezione di glucosio, misurando ad ogni punto la glicemia. Il test di tolleranza all'insulina (ITT, *insulin tolerance test*) è stato effettuato iniettando per via intraperitoneale 0.75 U/Kg di peso corporeo di insulina umana (Novo Nordisk) dopo 4 ore di digiuno. Il sangue è stato prelevato a 0, 15, 30 e 60 minuti dalla cavità retro-orbitale del topo per effettuare la misurazione della glicemia.

3. ANALISI ISTOLOGICA

Il tessuto epatico è stato lavato in PBS (phosphate buffered saline: KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10.1 mM) e fissato in 4% paraformaldeide per 24 ore. Il tessuto così fissato è stato lavato due volte in acqua per 10 minuti, una volta in EtOH 70% per 45 min., una volta in EtOH 95% per 45 min., due volte in EtOH 100% per 45 min., due volte in Histolemon (Carlo Erba Reagenti) per 20 min. Infine i tessuti sono stati lavati (due volte per 45 min. a 58-60 °C) e inclusi in paraffina. Sezioni di paraffina di 5µm di spessore sono state colorate con ematossilina-eosina per l'analisi istologica. Un patologo all'oscuro delle condizioni sperimentali ha valutato la severità della NAFLD, in base alla quantità e al tipo di grasso (micro- o macrovescicolare), all'estensione d'infiammazione, alla presenza di degenerazione cellulare o necrosi e in

base al livello di fibrosi. Il grado di infiammazione è stato valutato da 0 a 3: 0, infiammazione assente; 1, leggera; 2, moderata; 3, severa.

4. ANALISI PROTEOMICA

4.1. Preparazione del campione

Dopo 16 settimane di dieta grassa i topi WT e Timp-3^{-/-} sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale; gli organi sono stati prelevati e immediatamente congelati in azoto liquido. Un piccolo pezzo di fegato ancora congelato (circa 60 mg) di ciascun topo (due topi WT e due topi Timp-3^{-/-}) è stato posto in tubi di polipropilene (Falcon) contenenti 2 mL di un tampone di lisi (7 M urea, 2 M tiourea, 40 mM tris, 50 mM DTT, 4% 3-[(3-colamidopropil) dimetilammonio]-1-propansolfonato, CHAPS), preriscaldato a 37 °C. I tessuti sono quindi stati omogeneizzati per pochi secondi con un omogeneizzatore (Ultra Turrax T25, Janke & Kankel) e trasferiti in eppendorf da 1,5 mL. I campioni sono stati incubati 1h a 37 °C in un termoblock. Al fine di rimuovere il materiale insolubile, i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 30 minuti a temperatura ambiente (*room temperature*, RT) e sono stati recuperati i sovranatanti. La concentrazione proteica degli estratti epatici ottenuti è stata determinata usando un metodo densitometrico (Cheung *et al.*, 1987). Alla miscela di reazione (800 µl di 0,1N HCl + 200 µl di acido tricloroacetico al 20%) sono stati aggiunti 10 µl di ogni campione ed è stata misurata l'assorbanza (rispetto a un bianco di sola miscela di reazione) alla lunghezza d'onda di 562 nm. La curva standard, usata come riferimento, è stata determinata misurando l'assorbanza alla stessa lunghezza d'onda di quantità note di BSA (10µg, 20µg, 40µg, 80µg, 100µg) sciolta nello stesso tampone di lisi. 80 µg di proteine di

ciascun genotipo (40 µg per ciascun topo) sono stati precipitati a -20 ° C una intera notte (*overnight*, on) aggiungendo una soluzione di etanolo 50%, metanolo 25%, acetone 25% in proporzione 8:1 con il lisato epatico. Il giorno seguente, i campioni sono stati centrifugati 1h a 13000 rpm a +4 ° C. I pellet ottenuti sono stati lavati 2 volte (in ogni passaggio è stata aggiunta la stessa soluzione, sono stati precipitati i campioni 1h a -20°C e centrifugati 1h a 13000 rpm a +4°C). Infine i pellet sono stati risospesi per 1h a 37 °C in 30 µl di 50 mM ammonio bicarbonato pH 8.5 contenente 3M Urea e 1% CHAPS e sottoposti a sonicazione (tre sonicate di 10 secondi l'una all'80% della potenza). Sono stati quindi centrifugati i campioni a 13000 rpm per 30 minuti a RT e recuperati i sovranatanti. Le proteine sono state ridotte e poi alchilate aggiungendo prima DTT (10 mM) e incubando 1h a 37°C e poi iodoacetammide (50 mM) 1h a RT. I campioni sono stati digeriti con la tripsina in rapporto 1:50 (w/w) a 37°C on. Il giorno successivo la reazione è stata interrotta con l'aggiunta di 5 µl di 1% v/v TFA. 1.3 µg di digesto totale diluito in acido formico addizionato con 100 fmol di standard interno (digesto di Enolase di *Saccharomyces cerevisiae*, Waters), sono stati utilizzati per l'analisi nLC-ESI-MS/MS.

4.2. LC-ESI-MS/MS

I digesti triptici sono stati analizzati (in triplicato) tramite *nanoliquid chromatography-electrospray ionization-tandem MS* (nLC-ESI-MS/MS) grazie ad un sistema di cromatografia liquida UPLC nanoAcquity dotato di auto campionatore con prelievo di 2 µl (Micromass-Waters) accoppiato in linea con uno spettrometro di massa *nano-ESI-Quadrupole Time of Flight* (nano-ESI-Q-TOF, Q-TOF Premiere, Micromass-Waters). La strategia impiega una preliminare separazione cromatografia a fase inversa effettuata usando una precolonna, per intrappolare i peptidi (*Symmetry C18 trapping column* 180

μm X 20mm, 5 μm diametro particelle, Waters) ed una successiva colonna di separazione a fase inversa (BEH 130 C18 *NanoEase*TM 75 μm X 25 cm *nanoscale LC column*, diametro particelle 1.7 μm , Waters), con un gradiente di H₂O/ACN (acetone) in presenza di acido formico 0.1%, ad un flusso di 250 nL/min e durante un periodo di 155 minuti. La temperatura della colonna è mantenuta a 35 °C e la pompa ausiliaria eroga un flusso costante di calibrante *lock mass* ([Glu1]-Fibrinopeptide B, 250 fmol/ μl , Sigma) a 250 nL/min. Dopo l'eluizione dalla colonna, i peptidi sono stati analizzati in spettrometria di massa tandem, con il Q-TOF configurato con acquisizione in MS^e. L'acquisizione dati in tale modalità consiste in un recente protocollo di frammentazione peptidica in parallelo che permette elevata efficienza di rivelazione, ideale per l'identificazione di proteine in campioni molto complessi. Si alterna una singola acquisizione completa in MS (bassa energia di collisione, 4 eV) seguita da un'acquisizione MS/MS (alta energia di collisione, rampa da 15 eV a 40 eV), ogni 1.5 secondi. Grazie all'elevata sensibilità e riproducibilità del sistema nanoLC e al caratteristico profilo *high-low* con cui è fornita l'energia di collisione dallo spettrometro di massa, questo metodo è al momento il più promettente per la quantificazione *high-throughput* delle proteine. I dati provenienti dalle acquisizioni, gestite dal programma *MassLynx* (Waters), sono importati ed elaborati dal programma ProteinLynx Global Server v2.3 (PLGS, Micromass-Waters), che provvede all'identificazione delle proteine (banca dati UniProtKB/Swiss-Prot), alla loro quantificazione relativa e alla validazione statistica dei risultati. I parametri di ricerca utilizzati sono: tolleranza di 15 ppm per gli ioni precursore, di 20 ppm per i prodotti ionici, minimo 3 frammenti ionici identificati per peptide, minimo 7 frammenti ionici e 2 peptidi identificati per proteina, 1 *missed cleavage*, carbidometilazione della cisteine e ossidazione della metionine. Per l'analisi

quantitativa le proteine identificate sono state normalizzate utilizzando come riferimento lo standard interno (Enolase di *Saccharomyces cerevisiae*).

5. ANALISI BIOINFORMATICA

Le relazioni tra le proteine espresse differenzialmente negli estratti di fegato provenienti da topi WT e *Timp-3^{-/-}* sono state valutate tramite il programma bioinformatico, accessibile on-line, *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA 5.0; *Ingenuity® Systems, Mountain View, CA*; www.ingenuity.com). Tale programma consente la ricerca, l'esplorazione e la visualizzazione di associazioni funzionali relative ai risultati sperimentali (Calvano et al., 2005). Inserendo l'elenco dei codici delle proteine identificate e le loro corrispondenti abbondanze relative derivate dagli esperimenti di Expression, abbiamo ottenuto dei *network* interattivi, basati su *pathway* canonici e su modelli probabilistici d'interazioni biologiche. Inoltre IPA ci ha permesso di identificare le patologie più significativamente correlate a livello statistico con il nostro *dataset*, a cui sono state associate i corrispondenti valori *p* indicativi della confidenza dell'associazione.

IPA è un database contenente informazioni su oltre 20000 geni e proteine, 1.4 milioni di interazioni biologiche e un centinaio di *pathway* canonici. Tali informazioni sono integrate con altri importanti *database* quali *EntrezGene* e *Gene Ontology* (<http://www.ingenuity.com/>). Il programma interroga la banca dati (*Ingenuity Pathways Knowledge Base*), in esso residente, per cercare di trovare eventuali interazioni tra i geni forniti dallo sperimentatore, chiamati geni *focus*, e tutti gli altri geni presenti nella banca dati generando algoritmicamente un insieme di *network* (interazioni) dei geni. I *network* sono visualizzati graficamente come dei nodi (geni o prodotti genici) e delle linee che li

uniscono (la relazione biologica tra i nodi). Le interconnessioni tra i vari geni e prodotti genici presenti nella banca dati si basano sulle informazioni derivate solo da giornali scientifici, selezionati per la qualità e validità dei risultati in essi riportati. Ad ogni *network* è associato uno *score*, che prende in considerazione il numero dei geni *focus* presenti in esso rispetto al numero totale di geni/prodotti genici inseriti dallo sperimentatore, la grandezza del *network* stesso e il numero totale di molecole della banca dati (*Ingenuity Pathways Knowledge Base*) che potenzialmente potrebbero essere incluse nel *network*. Lo *score* indica la probabilità che il numero osservato dei geni *focus* sia presente nel *network* solo casualmente: più è alto lo score più è bassa questa probabilità, dunque maggiore è la confidenza della correlazione fra tali geni in quel particolare processo funzionale biologico.

6. ANALISI BIOCHIMICHE

6.1. Western blot

Un piccolo pezzo di fegato ancora congelato (circa 60 mg) di ciascun topo (due topi WT e due topi *Timp-3^{-/-}*) è stato posto in tubi di polipropilene (Falcon) posti in ghiaccio, contenenti 2 mL di un tampone di lisi (137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.6, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂; 2mM EDTA, 1% Triton, 10% glicerolo), addizionato con gli inibitori delle proteasi PMSF (2mM) e Na₃VO₄ (2mM) e con il cocktail di inibitori Complete (Roche). I tessuti, mantenuti in ghiaccio, sono quindi stati omogeneizzati per pochi secondi con un omogeneizzatore (Ultra Turrax T25, Janke & Kankel) e trasferiti in eppendorf da 1,5 mL. I campioni sono stati vortexati e incubati in ghiaccio per 30 minuti (vortexandoli ogni 10 minuti); quindi sono stati centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a

+4 °C e sono stati recuperati i sovranatanti. La concentrazione proteica degli estratti epatici ottenuti è stata determinata con il metodo Bradford (Protein Assay kit; Bio-Rad).

Le proteine sono state quindi separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (*SDS-PAGE*). 50 µg di ciascun estratto di fegato sono stati bolliti per 5 minuti a 95°C in *Laemmli sample buffer* (2X: Tris-HCl 100 mM pH 6.8, DTT 200 mM, SDS w/v 4%, Blu di Bromofenolo w/v 0.2%, glicerolo v/v 20%). La separazione elettroforetica è stata condotta in TGS (Tris 25mM, Glicina 250 mM, w/v SDS 0.1%) a RT, ad un voltaggio costante di 120 V. Le proteine così separate, sono state successivamente trasferite su membrane di nitrocellulosa (Whatman) sottoponendole ad un amperaggio costante di 75mA, per 1 ora e 45 minuti, in uno specifico tampone (Tris 25mM, Glicina 250 mM, w/v SDS 0.1%, v/v alcol metilico 20%). Le membrane sono state sciaquate in acqua bi-distillata, colorate con rosso Ponceau S (Sigma) per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine; successivamente lavate con T/TBS (TBS: Tris 25 mM, NaCl 150 mM, KCl 2 mM, pH 7.4; v/v Tween-20 0.1%). Quindi sono state saturate in 5 % latte in polvere privo di grassi (*non-fat dry milk*, NFDM, Bio-Rad), risciacquate in T/TBS e incubate on a +4 °C in agitazione lenta con l'anticorpo primario diluito in 5% NFDM. Sono stati eseguiti tre lavaggi da 10 minuti, prima di incubare (1h a RT, in agitazione lenta) le membrane con gli anticorpi secondari coniugati con HPR (HorseRadish Peroxidase, Bio-Rad), diretti contro le immunoglobuline di topo (*mouse*), coniglio (rabbit) o pecora (goat), diluiti 1:5000 in 5% NFDM. Sono quindi stati effettuati altri tre lavaggi. Tutti i lavaggi e le diluizioni (della soluzione di saturazione e degli anticorpi) sono state effettuate in T/TBS. L'immunoreattività è stata visualizzata tramite chemiluminescenza enzimatica (ECL, GE-Healthcare, Buckinghamshire, UK). Per evidenziare la reazione, le membrane sono state esposte ad una lastra autoradiografica

(HyperfilmECL, GE-Healthcare) per un tempo variabile da alcuni secondi ad alcuni minuti. La lastra così impressionata è stata quindi sviluppata e fissata (liquidi di sviluppo e fissaggio KODAK GBX developer e KODAK GBX fixer, KODAK Rockester, NY, USA). L'acquisizione delle immagini è stata effettuata mediante Versadoc (Bio-Rad).

6.1.1. Anticorpi

Gli anticorpi primari utilizzati sono: ADK (D-21): sc-23360, MAT I/III (V-15): sc-28029, GNMT (H-225): sc-68871, *Prohibitin* (SPM311): sc-56467, L-FABP (H-120): sc-50380; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Gli anticorpi secondari usati sono: *donkey anti-mouse* IgG-HPR (sc-2314), *goat anti-rabbit* IgG-HPR (sc-2004); *donkey anti-goat* IgG-HPR (sc-2020); Santa Cruz Biotechnology, Inc.

6.2. Oxyblot

L'Oxyblot Protein Oxidation Detection Kit (S17150, Chemicon Int.) è stato utilizzato per individuare la presenza di gruppi carbonilici, potenzialmente introdotti nelle proteine ad opera di reazioni ossidative. Tale kit ha un'alta sensibilità, permette infatti di rilevare dai 5 femtomoli in poi di residui carbonilici.

Per effettuare tale esperimento sono stati utilizzati 18 µg di lisato proteico, trattati come da protocollo. Il principio di azione di tale kit si basa sulla reazione dei gruppi carbonilici delle proteine ossidate con il substrato fornito dal kit (DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine) e sulla conseguente formazione di uno specifico prodotto, *DNP-hydrazone*, (2,4-dinitrophenylhydrazone). I campioni ottenuti sono stati quindi separati tramite *SDS-PAGE* e successivamente è stato effettuato un *Western blot*. Le proteine ossidate sono state quindi rilevate attraverso l'utilizzo degli anticorpi forniti dal kit

(anticorpo primario: *rabbit Anti-DNP*; secondario: *Goat Anti-rabbit IgG-HPR*). I materiali richiesti per effettuare il *Western blot* (buffer di caricamento dei campioni, buffer di trasferimento, T/PBS, soluzione di saturazione/diluizione) sono stati preparati come specificato dal protocollo. L'immunoreattività è stata visualizzata tramite chemiluminescenza enzimatica (ECL), come di *routine*. Come controllo negativo ogni campione preparato in doppio è stato incubato con il substrato o con una soluzione di controllo, al fine di garantire che i segnali rilevati non siano dovuti a reazioni aspecifiche.

6.4. Coomassie

50µg di lisati epatici sono stati separati tramite *SDS-PAGE*. Il gel di poliacrilamide è stato quindi sciacquato in acqua bi-distillata e poi incubato per 30 minuti con un Coomassie commerciale, Brilliant Blue G solution (Sigma) (0.1% w/v *Brilliant Blue G*, 25% v/v alcol metilico, 5% v/v Acido acetico). Il colorante in eccesso è stato eliminato utilizzando una soluzione decolorante (25% alcol metilico; 5% acido acetico). L'immagine del gel è stata acquisita con il Versadoc (Bio-Rad).

SCOPO DELLA TESI

Risale al 1993 la scoperta del primo legame molecolare tra l'obesità e l'infiammazione, il TNF- α . Da allora si è affermato sempre più il concetto di correlazione tra sistema immune e disfunzioni metaboliche (Wellen & Hotamisligil, 2005).

Timp-3 (*Tissue inhibitor of metalloproteinase-3*) è un inibitore delle metalloproteinasi di matrice (MMP) e di TACE (*Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme*), il quale ha ruolo fondamentale come regolatore fisiologico dell'infiammazione (Black, 2004).

In tale contesto, nell'ambito del nostro laboratorio, ci siamo interessati al ruolo di Timp-3 nella modulazione della risposta infiammatoria e metabolica in modelli di obesità murini. E' stato quindi scoperto che la deficienza di Timp-3, potenzia l'insulino-resistenza e le patologie ad essa correlate, quali infiammazione e steatosi epatica, indotte dall'aploinsufficienza del recettore insulinico in concomitanza ad una dieta ricca di grassi (HFD). Tale effetto potrebbe in parte essere dovuto all'attivazione di TACE; infatti viceversa l'aploinsufficienza di tale proteina conferisce una parziale protezione nei confronti dell'insulino-resistenza e dell'infiammazione indotta da HFD (Serino *et al.*, 2007).

Lo scopo di questa tesi era quello di valutare la sinergia tra una dieta ad alto contenuto lipidico e la sovra-attività di TACE indotta da deficit di Timp-3 sul metabolismo glicolipidico in particolare a livello epatico, identificando eventuali meccanismi molecolari a supporto delle osservazioni clinico-morfologiche.

RISULTATI

La deficienza di Timp-3 potenzia l'insulino-resistenza e la steatosi epatica indotta da HFD

In base ad esperimenti preliminari condotti nel nostro laboratorio, è stato ipotizzato che Timp-3 abbia un effetto insulino-sensibilizzante. Infatti è stata riscontrata una riduzione di tale proteina nel tessuto adiposo di modelli murini di obesità (Chavey *et al.*, 2003) e nel muscolo scheletrico di topi $Insr^{+/-}$ diabetici rispetto a topi $Insr^{+/-}$ normoglicemici. Inoltre è stato dimostrato che in topi di 10 settimane $Insr^{+/-}$ $Timp-3^{-/-}$ ad HFD, la deficienza di Timp-3 potenzia gli effetti indotti dall'aploinsufficienza del recettore insulinico e dalla dieta, quali insulino-resistenza, infiammazione e NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*). Tali effetti non sono però stati riscontrati in animali di 10 settimane $Timp-3^{-/-}$ sottoposti ad HFD (Federici *et al.*, 2005; Menghini *et al.*, 2008). Quindi l'assenza di Timp-3 agisce solo in sinergia all'aploinsufficienza di $Insr$ nel peggiorare il quadro metabolico in topi sottoposti ad una dieta grassa a breve termine.

Al fine di studiare l'effetto della deficienza di Timp-3 in animali sottoposti ad HFD per tempi più prolungati, topi di 20 settimane WT e $Timp-3^{-/-}$ ad HFD sono stati utilizzati per la valutazione di alcuni parametri metabolici. La misurazione della glicemia e l'insulinemia a digiuno (*fasting*) e in stato di alimentazione (*fed*), in associazione con i test intraperitoneali di tolleranza al glucosio e all'insulina (rispettivamente IPGTT e ITT), hanno dimostrato che i topi $Timp-3^{-/-}$ sono più iperglicemici, iperinsulinemici, intolleranti al glucosio e insulino-resistenti rispetto ai topi WT (fig. 27).

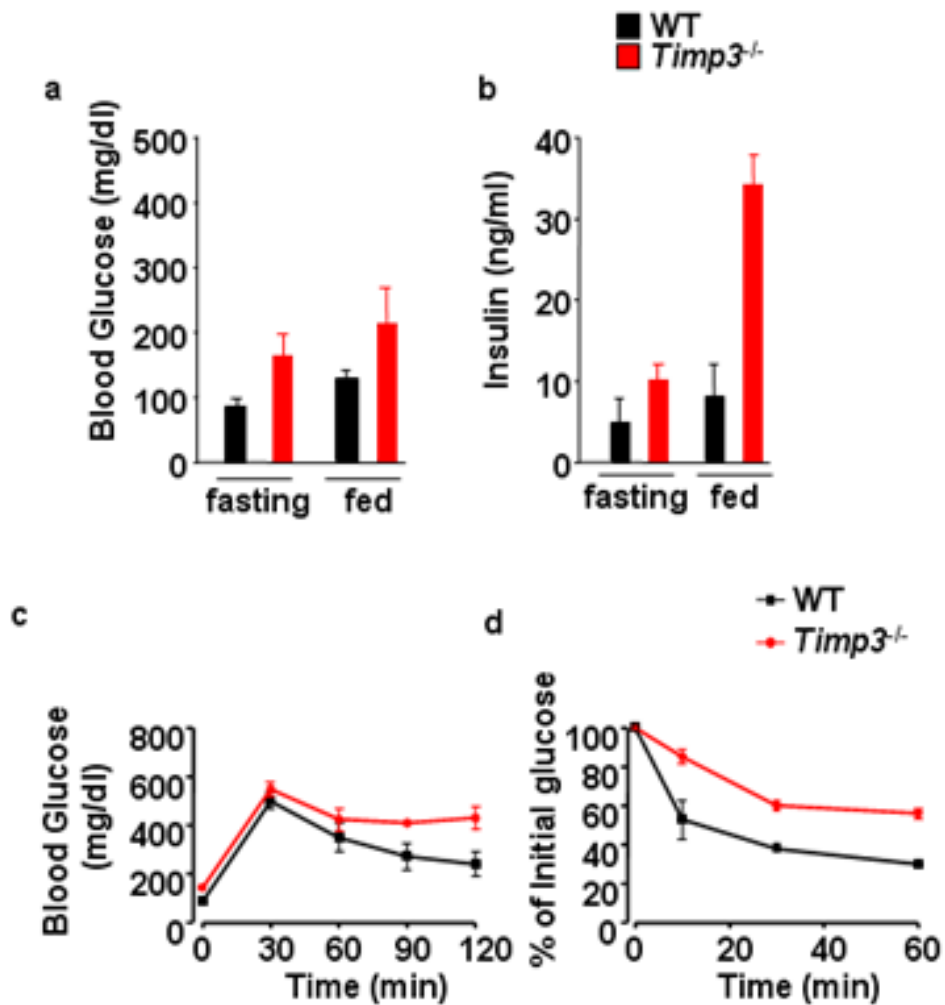


Fig. 27/ La deficienza di Timp-3 potenzia l'insulino resistenza indotta da HFD. In topi WT, *Insr*^{+/-} e *TIMP-3*^{-/-} sottoposti a 16 settimane di HFD sono stati misurati i valori glicemici (a) e insulinemici (b) in stato di digiuno (*fasting*) o di nutrizione (*fed*). (c) Per effettuare l'IPGTT, dopo un digiuno di 16h, sono stati iniettati nei topi, per via intraperitoneale, 2gr/Kg di peso corporeo di D-glucosio; successivamente è stata monitorata la glicemia ai tempi indicati. (d) L'ITT è stata eseguita iniettando nei topi, per via intraperitoneale, insulina umana (0.75U/Kg di peso corporeo) dopo 4h di digiuno e misurando la glicemia ai tempi indicati.

Inoltre l'analisi istologica del fegato dei topi Timp-3^{-/-} ad HFD ha evidenziato un incremento di steatosi, i WT infatti mostrano solo steatosi microvescicolare (primo grado di NAFLD), mentre nei Timp-3^{-/-} è stata evidenziata steatosi mista (micro-e macrovescicolare) estesa tra il 20-30% del parenchima, con scarsi segni d'inflammazione lobulare (qualche neutrofilo lobulare nelle zone di maggiore sofferenza epatocitaria) e rari segni di sofferenza cellulare (degenerazione balloniforme); reminescente di NAFLD di secondo grado (fig. 28).

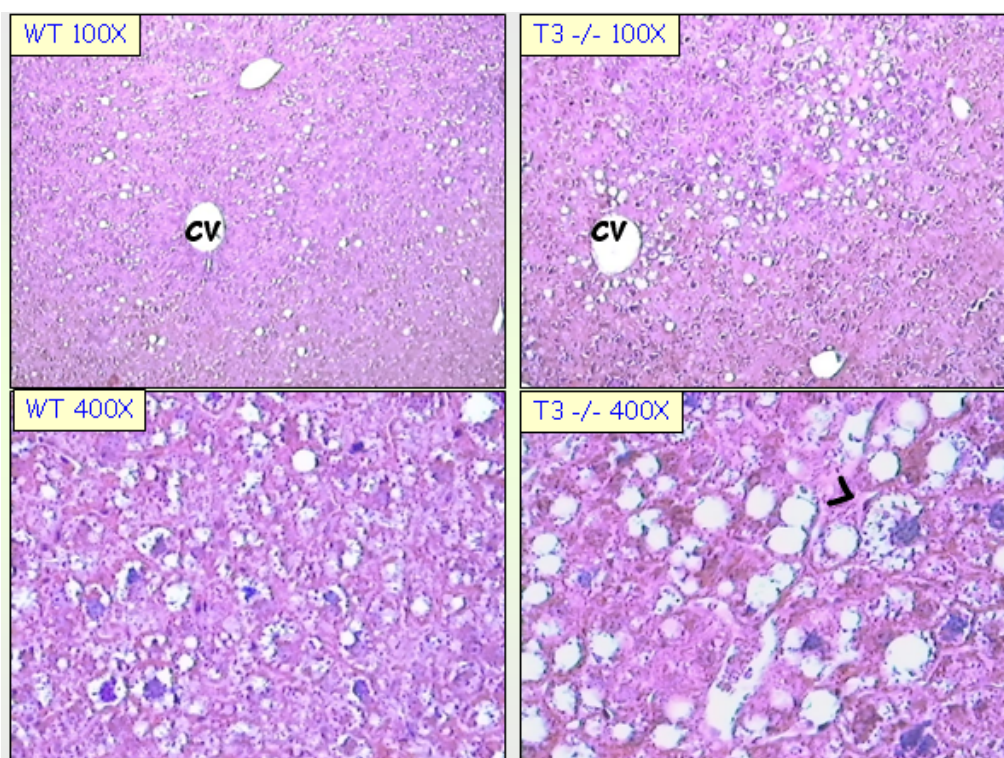


Fig. 28/ L'assenza di Timp-3 potenzia la steatosi epatica. L'istologia del fegato di un topo *knockout* evidenzia l'incremento di steatosi macrovescicolare indotta dall'obesità, rispetto al genotipo WT. Nell'ingrandimento ottico 400X del topo Timp-3^{-/-} è messa in evidenza, dal simbolo >, una degenerazione balloniforme. CV, vena centrolobulare.

Analisi proteomica: proteine differenzialmente espresse nel fegato di topi Timp-3^{-/-} ad HFD

Al fine di identificare le molecole potenzialmente coinvolte nella funzione di Timp-3 in un contesto di obesità indotta è stata effettuata un'analisi di proteomica *shotgun* (nLC-ESI-MS^E) su campioni di fegato omogeneizzati e digeriti con tripsina. I risultati ottenuti sono stati importati e processati con il software PLGS, il quale ha permesso l'identificazione (tramite la banca dati swissProt), la quantificazione proteica e la validazione statistica dei risultati ottenuti (tramite il *software* Expression). Abbiamo quindi ottenuto una lista di proteine differenzialmente espresse nel fegato dei topi *knockout* (KO) rispetto a quelli WT, entrambi sottoposti ad un regime di dieta grassa; la quale è stata utilizzata per creare un grafico(fig. 29).

Nel fegato dei topi Timp-3^{-/-} è stata riscontrata una significativa riduzione nell'espressione di 35 proteine. Tra queste degne di menzione è ALDH2 (precursore mitocondriale della *Fatty Aldehyde Dehydrogenase*), proteina di difesa contro lo stress ossidativo indotto dalla perossidazione lipidica, la cui espressione è ridotta in modelli murini di insulino-resistenza (Demozay *et al.*, 2004). Altre proteine interessanti sono PDIA3 (*Protein disulfide-isomerase A3 precursor*) e HSPA5 (*Heat shock 70 kDa protein 5*), coinvolte nella risposta allo stress del reticolo endoplasmatico (ER). Anche la riduzione di FAH (*fumarylacetoacetate hydrolase*) potrebbe essere associata all'induzione di tale tipo di stress (Ji, 2007). E' da sottolineare inoltre il forte decremento di AADAC (*Arylacetamide deacetylase*), proteina ridotta in ratti diabetici e coinvolta nella sintesi delle VLDL (Gibbons *et al.*, 2004; Trickett *et al.*, 2001).

Tra le 14 proteine i cui livelli sono significativamente maggiori nei topi KO rispetto ai WT, degna di nota è FABP1/L-FABP (*liver Fatty acid-binding protein*), proteina la cui

deficienza ha un effetto protettivo nei confronti dell'obesità e della steatosi epatica indotte da una dieta ricca di grassi (Newberry *et al.*, 2008).

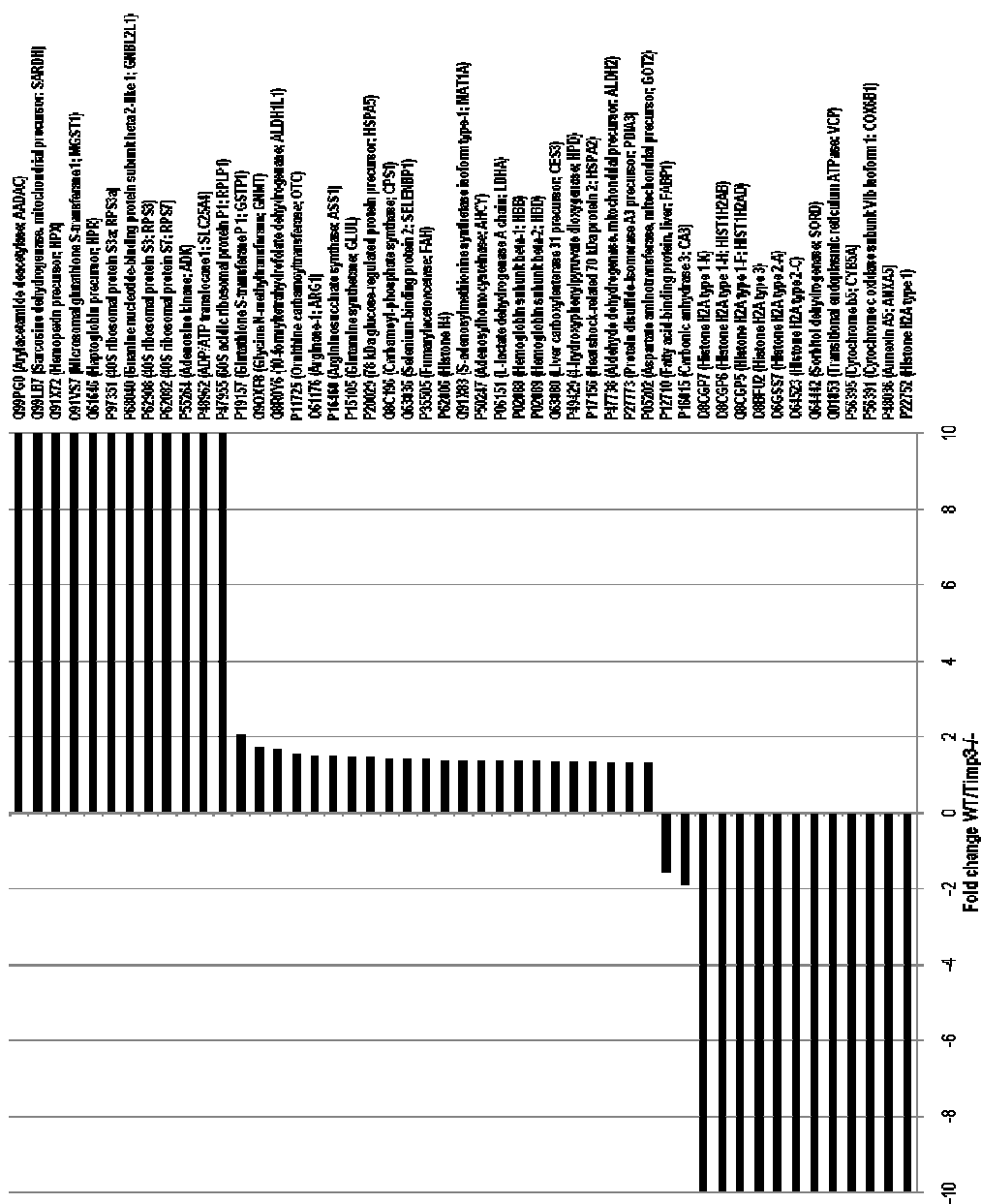


Fig. 29/ Espressione differenziale proteica in topi WT e Timp3^{-/-} ad HFD. Le proteine caratterizzate da un *fold change* positivo sono quelle i cui livelli sono ridotti nei topi WT; viceversa un valore negativo è indice di sovra-espressione.

Analisi bioinformatica: associazioni funzionali tra le proteine identificate

Le relazioni tra le proteine espresse differenzialmente negli estratti di fegato provenienti da topi WT e *Timp-3*^{-/-} sono state valutate tramite il programma di bioinformatica *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). Sono stati inseriti nel programma l'elenco dei codici delle proteine identificate e le loro corrispondenti abbondanze relative derivate dagli esperimenti di Expression. Il programma, interrogando la banca dati (*Ingenuity Pathways Knowledge Base*) in esso residente, ha quindi fornito le interazioni tra i geni da noi inseriti, chiamati geni *focus*, e tutti gli altri geni presenti nella banca dati generando algoritmicamente un *network* interattivo (fig. 30).

Vista l'estrema complessità dei risultati ottenuti, è stato ristretto il campo d'indagine utilizzando una particolare funzione di IPA che identifica le patologie statisticamente correlate con le proteine inserite nel programma (fig. 31). In particolare IPA ha associato la fibrosi (p-value = $3.31E^{-0.3}$ - $3.13E^{-0.3}$), l'infiammazione (p-value = $3.79E^{-0.3}$ - $3.79E^{-0.3}$), la colestasi (p-value = $1.46E^{-0.2}$ - $2.50E^{-0.2}$) e l'iperbilirubinemia epatica (p-value = $1.83E^{-0.2}$ - $1.83E^{-0.2}$) con la riduzione di alcune proteine coinvolte nella regolazione del metabolismo del ferro (HPX, *Hemopexin precursor* e HPR, *Haptoglobin precursor*; rispettivamente recettori *scavenger* dell'emoglobina e dell'eme) e nella risposta allo stress ossidativo (MGST1, *Microsomal Glutathione S-transferase 1* e GSTP1, *Glutathione S-transferase P1*). Sia le prime che le seconde possono essere associate ad una funzione anti-ossidante (Eskew *et al.*, 1999; Faye *et al.*, 2007; Wagener *et al.*, 2001; Siritantikorn *et al.*, 2007; Elsby *et al.*, 2003).

Mentre la steatosi epatica ($p\text{-value} = 9.19E^{-0.3}-1.38E^{-0.1}$) è stata associata da IPA, in base all'articolo pubblicato da D. Boison su PNAS nel 2002, esclusivamente alla riduzione di ADK (*Adenosine kinase*), una chinasi coinvolta nel metabolismo della metionina la cui espressione è ridotta in ratti diabetici (Pawelczyk *et al.*, 2000).

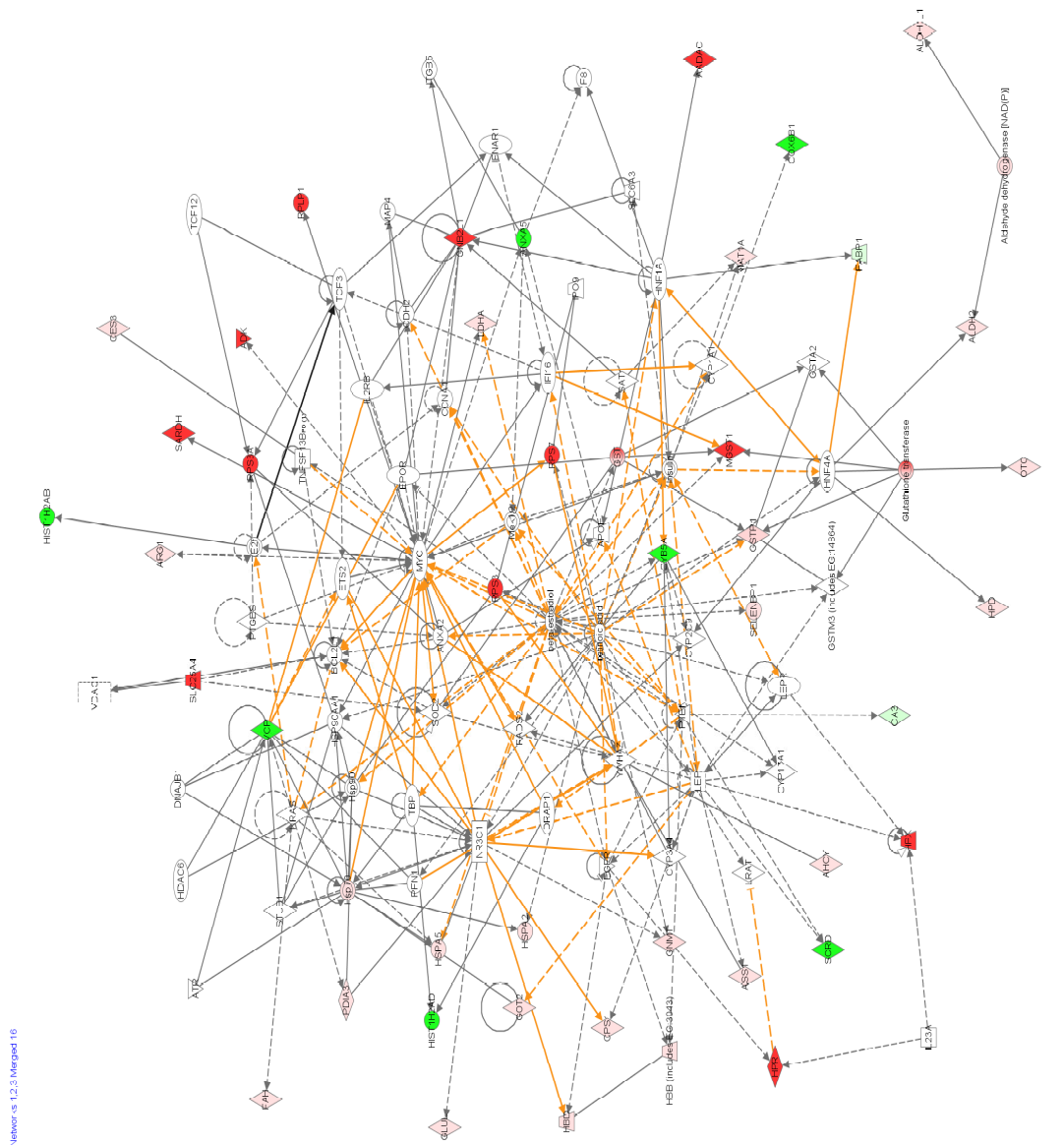


Fig. 30/ Immagine esemplificativa del network interattivo ottenuto da IPA. In verde sono evidenziate le proteine significativamente sovra-regolate nei topi $Timp\text{-}3^{-/-}$, in rosso quelle la cui espressione è invece ridotta. Le linee intere rappresentano le interazioni dirette, quelle tratteggiate le interazioni indirette.

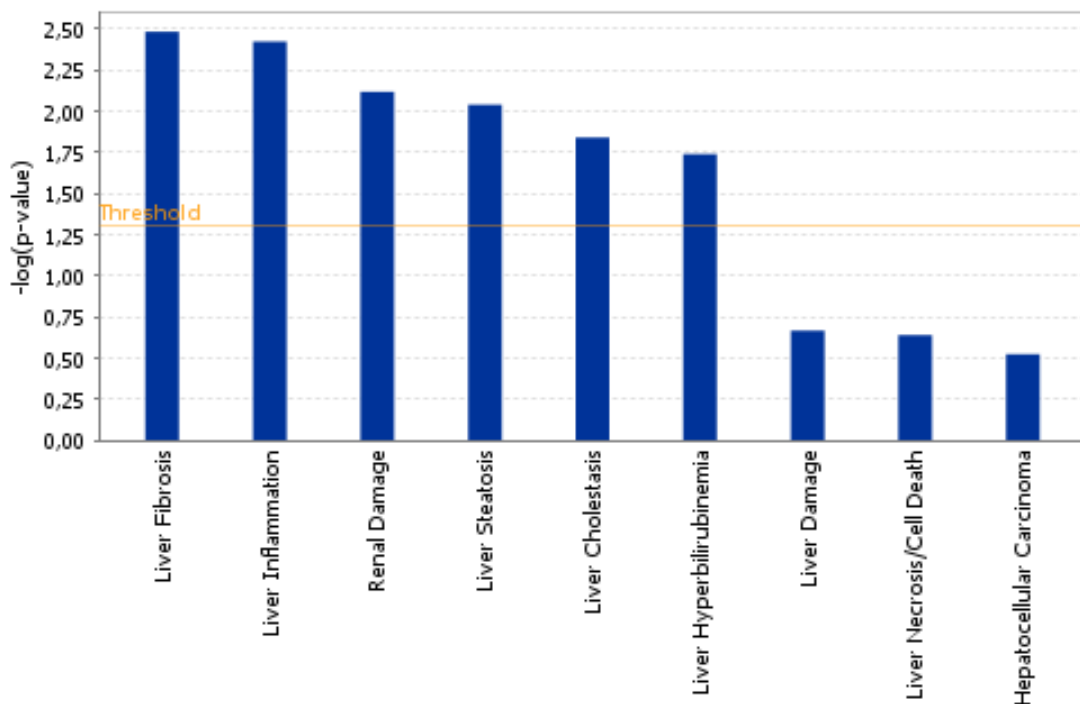


Fig. 31/ Patologie correlate alla deficienza di Timp-3^{-/-}. Il software IPA (*Ingenuity pathways analysis*) ha identificato le patologie più significativamente correlate a livello statistico con il nostro *dataset*, a cui sono state associate i corrispondenti valori *p* indicativi della confidenza dell'associazione.

Alla luce di tale dato, riesaminando la lista di proteine identificate (vedi fig. 29), è stato notato che oltre ad ADK, l'espressione di altre cinque proteine coinvolte nel ciclo della metionina è significativamente diminuita nei topi Timp-3^{-/-} (MAT1A, GNMT, SARDH, AHCY, e ALDH1L1).

Infine sono state utilizzate le annotazioni fornite da IPA per effettuare un'analisi *Gene Ontology* (GO), al fine di associare le proteine d'interesse finora menzionate con specifiche funzioni biologiche. L'indagine così effettuata ha correlato la modulazione di tali molecole con: metabolismo degli amminoacidi (p-value=2.51E^{-0.8} – 4.22E^{-0.2}), patologie del sistema epatico (p-value=9.20E^{-0.6} – 2,50E^{-0.2}) e metabolismo lipidico (p-value=3.07E^{-0.3} – 4.51E^{-0.2}). Sempre tramite IPA sono state individuate le altre proteine correlate a tali funzioni e sulla base dei dati ottenuti è stato disegnato un *network* (fig.

32), al fine di evidenziare altre molecole che potrebbero avere un certo rilievo nel nostro contesto sperimentale.

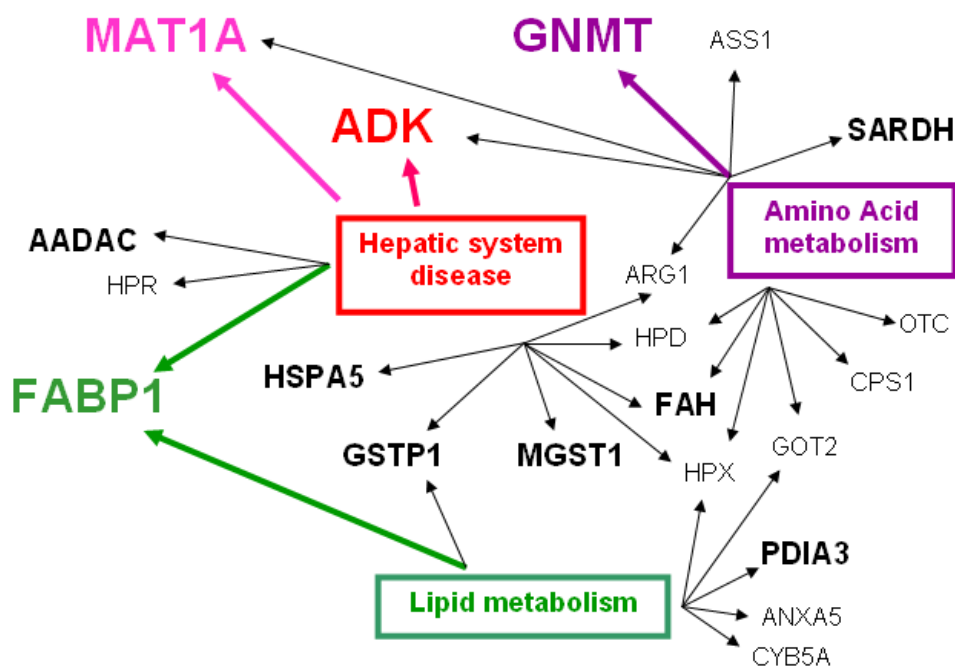


Fig. 32/ Analisi Gene Ontology. Le proteine rappresentate in colore sono quelle la cui modulazione è stata confermata tramite Western blot. Le proteine in grassetto sono quelle di potenziale interesse nel nostro contesto sperimentale. Abbreviazioni: ASS1, *Arginossuccinate synthetase*; SARDH, *Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial precursor*; OTC, *Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial precursor*; CPS1, *Carbamoyl-phosphate synthase*; GOT2, *Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor*; HPD, *4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase*; ANXA5, *Annexin A5*; CYB5A, *Cytochrome b5*; ARG1, *Arginase 1*.

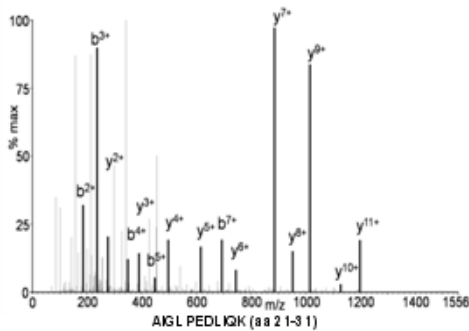
Per quanto riguarda invece l'associazione con *pathway* canonici, IPA ha associato ALDH2, ALDH1L1 (*10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase*) e LDHA (*L-lactate dehydrogenase A chain*) con la glicogenolisi/glicogenosintesi (p-value = $5.88E^{-0.3}$); mentre GSTP1 e MGST1 sono state correlate con il metabolismo del glutatione (p-value = $2.68E^{-0.2}$).

La deficienza di Timp-3 altera il metabolismo della metionina

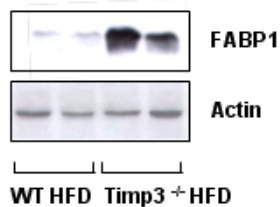
Il ruolo di FABP1 nell'obesità e nella steatosi epatica associate ad HFD (Newberry *et al.*, 2008) ci ha indotti a testare *in primis* i livelli di tale proteina. Come atteso l'analisi tramite *Western blot* ha confermato la forte sovra-espressione di FABP1 nel fegato di topi Timp-3^{-/-} ad HFD rispetto ai corrispondenti WT, come mostrato nella figura 33a.

Considerando l'effetto protettivo di Timp-3 nei confronti della steatosi epatica indotta da HFD e il fatto che la deficienza di ADK induca tale patologia (Boison *et al.*, 2002), abbiamo trovato interessante la diminuzione di tale chinasi nei topi Timp-3^{-/-}, attestata dagli esperimenti di Expression. Abbiamo quindi cercato anche in questo caso di ottenere una convalida tramite *Western blot*, riscontrando una lieve diminuzione di tale proteina (fig. 33b).

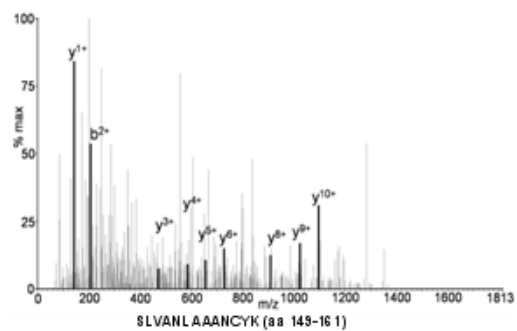
Fatty acid binding protein liver (FABP1)



Peptide MH+ (Da)	MH+ Error (ppm)	Peptide Sequence	Matched Ion Fragment
1195.6766	-9.8947	(K)AIGLPEDLIQK(G)	18
1788.8352	5.0498	(K)YQLSQENFEPFMK(R)	9
2116.9292	11.4176	(R)NEFTLGEECLEMTGEEK(V) (K)SVTELNGDTTNTMTLGDVYK(G)	3
2385.1875	0.9212	(R)	4
1012.5748	7.4141	(K)GLPEDLIQK(G)	2
842.463	1.449	(L)PEDLIQK(G)	1
Combine PLGS assignment score			256.7



Adenosine kinase (ADK)



Peptide MH+ (Da)	MH+ Error (ppm)	Peptide Sequence	Matched Ion Fragment
1394.7218	8.6649	(R)SLVANLA AANCYK(I)	11
1633.8312	-7.3219	(K)YSLKPNQDLAEDK(H) (K)EALMDVMPYVDILFGNETEAAT	4
2819.3198	-2.4247	FAR(G)	4
1299.6473	5.4477	(K)AATFFGCIGIDK(F)	3
1257.669	-11.7442	(K)HKELFDELVK(I)	3
706.4044	-12.701	(K)FGELIK(R)	2
Combine PLGS assignment score			193.9

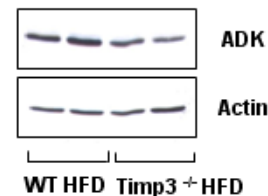


Fig. 33/ Modulazione di FABP1 e ADK nei topi Timp-3^{-/-}. 50µg di lisato epatico di ciascun topo, due topi WT e due Timp-3^{-/-} entrambi nutriti ad HFD per 16 settimane, sono stati analizzati tramite *Western blot*. Sono state in tal modo confermate le modulazioni di FABP1 (a, in basso) e ADK (b, in basso), individuate tramite esperimenti di *Expression*. Nelle tabelle sono indicati il numero dei frammenti identificati da PLGS per ciascun peptide ed inoltre, solo a scopo esemplificativo, è mostrato il *pattern* di frammentazione di uno specifico peptide per ciascuna proteina (a e b, in alto).

Sia i risultati di proteomica *shotgun* sia esperimenti preliminari (Menghini *et al.*, 2008) lasciano presupporre che la deficienza di Timp-3 possa essere associata allo sviluppo di NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*), ci siamo quindi focalizzati su altre due proteine coinvolte nel metabolismo della metionina, che in letteratura sono già state chiaramente associate a tale patologia: MAT1A e GNMT. E' stata quindi dimostrata una netta riduzione nei topi KO rispetto ai WT dei livelli di MAT1A (fig. 34a), proteina la cui deficienza è correlata allo sviluppo di stress ossidativo, steatoepatite (NASH) ed epatocarcinoma (HCC) (Santamaria *et al.*, 2003). Inoltre è risultata diminuita anche

l'espressione di GNMT (fig. 34b), una transmetilasi la cui inattivazione è associata all'induzione di NASH, fibrosi ed HCC (Martinez-Chantar *et al.*, 2008).

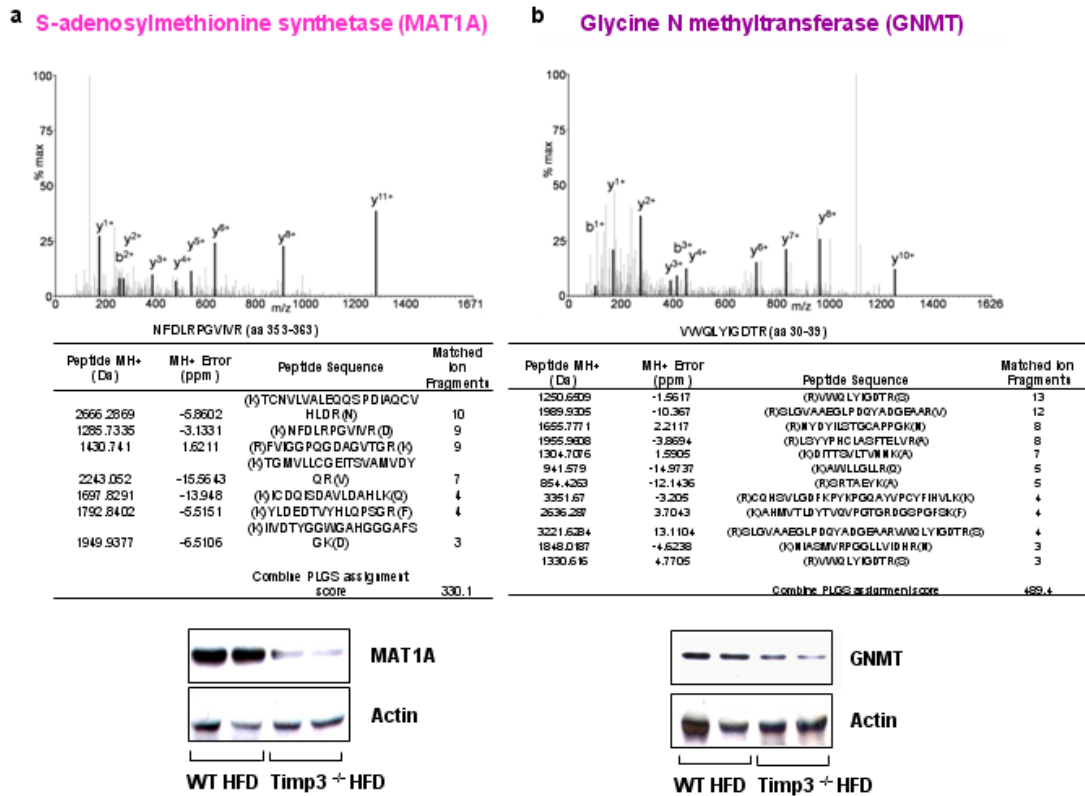


Fig. 34/ Riduzione dei livelli proteici di MAT1A e GNMT in topi Timp3^{-/-}. E' stata utilizzata un'analisi tramite *Western blot* di 50µg di ciascun lisato epatico per confermare i dati ottenuti da esperimenti di proteomica *shotgun*, da cui abbiamo ricavato i dati di frammentazione peptidica e lo spettro rappresentati (a e b, in alto). E' stata in tal modo corroborata la riduzione proteica di MAT1A (a, in basso) e di GNMT (b, in basso) nei topi Timp3^{-/-} ad HFD rispetto ai corrispondenti topi WT.

L'assenza di Timp-3 potenzia lo stress ossidativo indotto dall'obesità

La forte diminuzione di MAT1A nei topi Timp-3^{-/-} ad HFD, ci ha indotto a focalizzarci su questa proteina, per cercare di comprendere quanto le sua modulazione fosse determinante nel nostro contesto sperimentale. E' stato quindi confrontato il nostro *dataset* con quello ottenuto da Enrique Santamaria su topi MAT1A^{-/-} (Santamaria *et al.*, 2003), individuando diverse proteine in comune nei due modelli, di cui alcune ugualmente modulate. La comparazione così effettuata suggerisce che l'espressione delle proteine evidenziate nella tab. 3 in grassetto è mediata da Timp-3 in maniera MAT1A-dipendente.

Nel lavoro di E. Santamaria, attraverso l'utilizzo di esperimenti *in vitro*, è stata dimostrata la correlazione tra la ridotta sintesi di S-adenosilmetionina (SAM) e la diminuzione di PHB1 (*Prohibitin 1*), una proteina che tra le sua varie funzioni ha anche un importante ruolo nell'integrità funzionale dei mitocondri (Merkwirth & Langer, 2009; Mishra *et al.*, 2006; Santamaria *et al.*, 2003).

	TIMP-3^{-/-} HFD (140 GG)	MAT1A^{-/-}
GNMT	↓	↓ 240 gg
ALDH2	↓	↓ 90/240 gg
ARG1	↓	↓ 240 gg
SELENBP2	↓	↓ 90/240 gg
PDIA3	↓	↑ 90 gg ↓ 240 gg *
CA3	↑	↑ 90 gg ↓ 240 gg *
SORD	↑	↑ 90 gg ↓ 240 gg *
SARDH	↓	↑ 90 gg
FAH	↓	↑ 240 gg
ALDH1L	↓	↑ 240 gg
AHCY	↓	↑ 240 gg
FABP1	↑	↓ 90 gg

Tab. 3/ Confronto tra topi Timp-3^{-/-} ad HFD e topi MAT1A^{-/-}. Nel lavoro di E. Santamaria, l'espressione proteica differenziale dei topi MAT1A^{-/-} rispetto ai WT è stata analizzata a 1, 15, 90 e 240 giorni (gg) dalla nascita. In questo contesto, vista l'età dei topi da noi esaminati (140 gg) abbiamo considerato solo le espressioni relative a 90 e 240 gg. * Il contrasto nell'espressione di alcune proteine tra 90 e 240 gg è probabilmente dovuto all'avvenuto sviluppo di NASH nella fase più tardiva; nella quale è stata riscontrata una reversione nella distribuzione delle proteine sovra-regolate e quelle inibite (le proteine inibite passano dal 30-47% a 90 gg al 73% a 240 gg).

Valutando che MAT1A, unico enzima responsabile della sintesi di SAM, è fortemente diminuito nei topi $Timp-3^{-/-}$, è stato ipotizzato che PHB1 fosse ridotta nel nostro sistema modello; pertanto, nonostante fosse assente nel nostro *dataset*, ne è stata valutata l'espressione. In effetti la nostra deduzione ci ha portato a dimostrare la netta riduzione della Proibitina 1 nei topi KO rispetto ai WT (fig. 35).

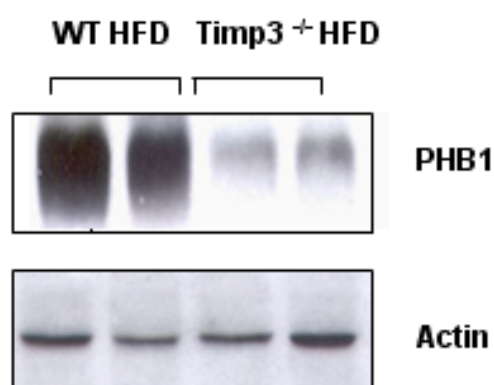


Fig. 35/ La deficienza di Timp-3 riduce l'espressione di PHB1. Il *Western blot* effettuato con 50 μ g di ciascun lisato epatico ha dimostrato la netta riduzione dei livelli proteici della Proibitina 1 (PHB1) in topi $Timp-3^{-/-}$ ad HFD rispetto ai corrispondenti animali WT.

PHB1 ha un importante ruolo nel *folding* e nell'assemblaggio delle subunità dei complessi della catena respiratoria mitocondriale ed è stata correlata ad una funzione protettiva nei confronti dello stress ossidativo. E' stato ipotizzato che la sua diminuzione possa avere un ruolo prioritario nella ridotta funzionalità mitocondriale riscontrata nei topi $MAT1A^{-/-}$, a cui può essere associata l'induzione di ROS, uno dei più importanti fattori ipotizzati essere coinvolti nella patogenesi di NASH (Pessayre, 2007; Santamaria *et al.*, 2003; Theiss *et al.*, 2007).

Considerando quindi i dati ottenuti, *in primis* riduzione di proteine con funzione anti-ossidanti (MGST1 e GSTP1; HPX e HPR) e di proteine correlate direttamente o indirettamente alla funzionalità dei mitocondri (PHB1 e MAT1A), è stato dedotto che tali modulazioni potessero cooperare nell'induzione di stress ossidativo.

In effetti, tramite Oxyblot, abbiamo dimostrato che nei topi *Timp3*^{-/-} ad HFD è esacerbata la condizione di stress ossidativo rispetto ai topi corrispondenti WT (fig. 36).

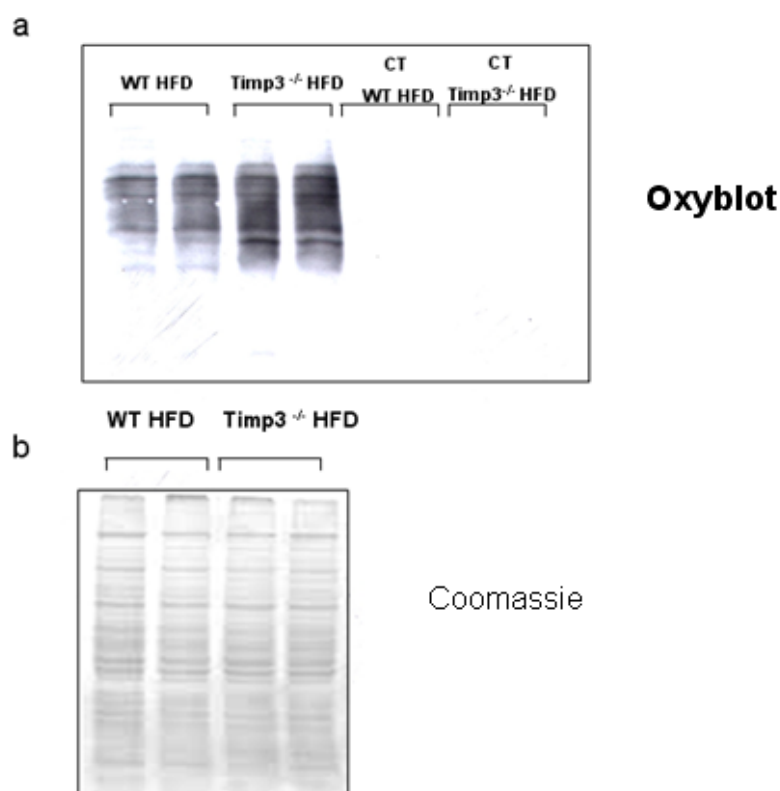


Fig. 36/ L'assenza di *Timp-3* potenzia lo stress ossidativo indotto dall'obesità. (a) 18µg di ciascun lisato epatico sono stati trattati, al fine di marcare i gruppi carbonilici introdotti da reazioni ossidative, tramite l'uso di uno specifico kit. Successivamente i campioni sono stati separati tramite *SDS-PAGE* e le proteine sono state quindi trasferite. La rilevazione delle proteine marcate è stata effettuata tramite l'utilizzo di specifici anticorpi forniti dal kit. L'Oxyblot dimostra che nei topi KO le proteine sono maggiormente ossidate, rispetto ai topi WT, entrambi ad HFD. Al fine di garantire che i segnali rilevati non siano dovuti a reazioni aspecifiche abbiamo utilizzato dei controlli negativi (CT). In questo caso i campioni sono stati incubati con una soluzione di controllo (fornita dal kit), anziché con lo specifico substrato necessario per la marcatura. **(b)** 50 µg di ciascun lisato epatico è stato separato tramite *SDS-PAGE* e il gel di poliacrilammide è stato poi colorato con Coomassie (*Brilliant Blue G-solution*), per confermare che i campioni utilizzati nell'Oxyblot fossero isocaricati.

DISCUSSIONE

Il sistema metabolico e quello immune hanno una origine evolutiva comune e sono tuttora interdipendenti sia dal punto di vista strutturale che funzionale. Infatti l'obesità può indurre uno stato di infiammazione cronica di basso grado, responsabile dell'insorgenza di diverse patologie quali insulino-resistenza, diabete, steatosi epatica ed aterosclerosi (Wellen & Hotamisligil, 2005; Hotamisligil *et al.*, 2006).

Considerando quindi tale stretta correlazione, nell'ambito del nostro laboratorio, ci siamo interessati al ruolo di Timp-3 nella regolazione della risposta infiammatoria e metabolica in modelli di obesità murini. Timp-3 è un inibitore tissutale di metalloproteasi (MMP) ed è anche l'unico inibitore fisiologico di ADAM-17/TACE. Quest'ultima è una proteina in grado di modulare l'attività di una vasta gamma di substrati, attraverso il taglio proteolitico del loro ectodominio, in un processo denominato *shedding*. La maggior parte delle molecole *target* di TACE sono coinvolte nello sviluppo o nei processi infiammatori (es. il TNF- α). Anche le MMP, oltre ad essere responsabili del catabolismo della matrice extracellulare (ECM), hanno un ruolo attivo nella modulazione del sistema immune. Sia tali proteine che ADAM-17 possono svolgere la loro funzione tramite lo *shedding* e quindi la regolazione di molecole di adesione, citochine, chemochine, fattori di crescita e dei loro recettori.

In tale contesto è stato dimostrato che in topi $Insr^{+/-} Timp-3^{-/-}$ ad HFD, l'assenza di Timp-3 peggiora gli effetti indotti dalla carenza del recettore insulinico e dall'obesità, potenziando l'insulino-resistenza, l'infiammazione e la NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*) (Federici *et al.*, 2005; Menghini *et al.*, 2008).

Nell'ambito di questo progetto di ricerca sono stati quindi dimostrati gli effetti dannosi della deficienza di Timp-3 (indipendentemente da altri fattori genetici, quali l'aploinsufficienza di Insr) in un contesto di obesità indotta da un regime di dieta grassa (HFD). Abbiamo dimostrato che l'assenza di tale proteina potenzia gli effetti indotti dall'obesità, quali la steatosi epatica e il deterioramento della sensibilità insulinica. Le istologie epatiche dei topi Timp-3^{-/-} infatti mostrano steatosi mista (micro- e macrovescicolare) e segni di infiammazione e sofferenza cellulare, rispetto alla sola steatosi microvescicolare riscontrata nei topi WT. Inoltre i topi *knockout* sono più iperglicemici, iperinsulinemici, intolleranti al glucosio e insulino-resistenti rispetto ai corrispondenti topi WT.

E' ipotizzabile che il ruolo di Timp-3 nella modulazione dell'insulino-resistenza sia associato, almeno in parte, alla sua funzione di inibitore di ADAM-17. Infatti la deficienza o comunque la riduzione di Timp-3 induce un'aumentata attività di TACE, un incremento dei livelli del TNF- α e quindi d'infiammazione (Federici *et al.*, 2005; Mohammed *et al.*, 2004). Inoltre è stato chiaramente dimostrato il ruolo di TACE nella regolazione della sensibilità insulinica, infatti l'aploinsufficienza di tale proteina conferisce una parziale protezione nei confronti dell'insulino-resistenza e dell'infiammazione indotta da HFD (Serino *et al.*, 2007). E' però molto probabile che esistano altri processi coinvolti nella funzione di Timp-3. Va infatti ricordata la pleora di substrati sui quali TACE agisce e anche il fatto che Timp-3 è un inibitore ad ampio spettro, responsabile della regolazione di diverse proteasi.

Abbiamo ritenuto che l'approccio più adeguato, volto all'identificazione delle molecole potenzialmente coinvolte nella funzione di Timp-3 in un contesto di obesità indotta, fosse quello di proteomica *shotgun*. Tale tecnica permette infatti di effettuare uno screening su

larga scala, accurato e quantitativo di tutte le proteine espresse in un determinato contesto sperimentale.

L'analisi in nLC-ESI-MS^e ci ha condotto all'identificazione delle proteine differenzialmente espresse nel fegato dei topi *knockout* (KO) rispetto a quelli WT, entrambi sottoposti ad un regime di dieta grassa. In particolare nel fegato dei topi Timp-3^{-/-} è stata riscontrata una significativa riduzione nell'espressione di 35 proteine e un'altrettanto significativo aumento di 14 molecole.

Abbiamo quindi utilizzato il programma di bioinformatica *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) per identificare le patologie statisticamente correlate con le proteine identificate. In particolare IPA ha associato la fibrosi, l'infiammazione, la colestasi e l'iperbilirubinemia epatica con alcune proteine coinvolte nella regolazione del metabolismo del ferro e nella risposta allo stress ossidativo. Mentre la steatosi epatica è stata associata esclusivamente alla riduzione di ADK (*Adenosine kinase*), una chinasi coinvolta nel metabolismo della metionina. Nonostante l'analisi tramite *Western blot* abbia rilevato che tale modulazione sia di lieve entità, supponiamo che possa essere comunque funzionalmente significativa. ADK infatti è il principale enzima responsabile della rimozione dell'adenosina (Ado) nel fegato (fig. 37). In base a considerazioni termodinamiche (Lu *et al.*, 2002) è ragionevole presupporre che anche una modesta riduzione di ADK, comportando un incremento nei livelli di Ado, favorisca la produzione di S-adenosilomocisteina (SAH). A supporto di tale ipotesi, tra le proteine significativamente ridotte nei topi Timp-3^{-/-} è stata trovata AHCY (*Adenosylhomocysteinase/SAH-hydrolase*), enzima responsabile della rimozione di SAH, inibita dall'Ado (fig. 37).

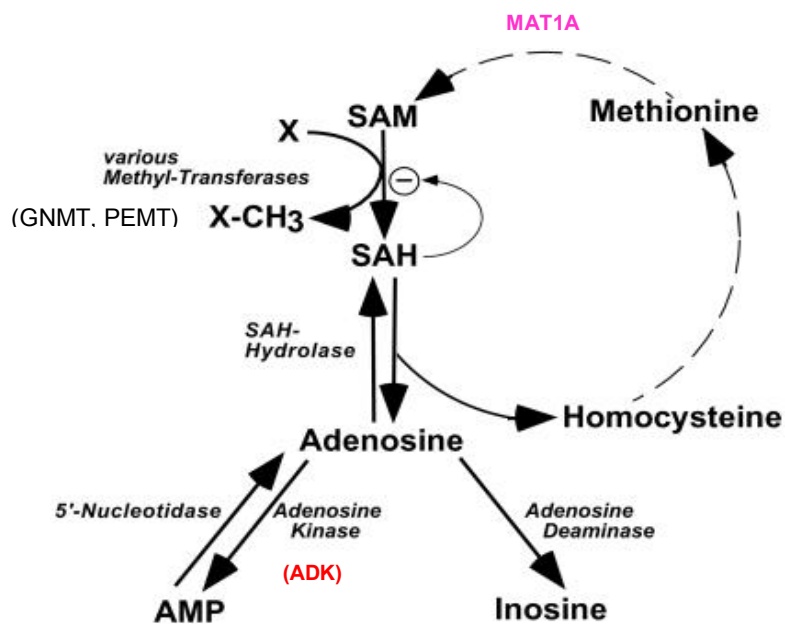


Fig. 37/ Metabolismo dell'adenosina. L'adenosina è degradata a inosina dall'adenosina deaminasi (ADA) durante lo sviluppo embrionale, dopo la nascita è invece convertita ad AMP tramite l'adenosin-chinasi (ADK). L'adenosina viene formata tramite l'idrolisi di AMP o di SAH. (Modificata da Boison *et al.*, 2002)

L'espressione di altre quattro proteine coinvolte nel ciclo della metionina, MAT1A, GNMT, SARDH e ALDH1L1, è significativamente diminuita nei topi *Timp-3^{-/-}*. In tali animali inoltre è stata riscontrata la netta riduzione dei livelli di PHB1, una proteina coinvolta nella funzionalità mitocondriale (Merkwirth & Langer, 2009; Mishra *et al.*, 2006). Tali circostanze hanno portato ad ipotizzare che nei topi KO ci sia una riduzione di S-adenosilmetionina (SAM). Infatti la diminuzione di ALDH1L1 (vedi Anguera *et al.*, 2006) e di MAT1A, enzima responsabile della sintesi epatica di SAM (Avila *et al.*, 2002), potrebbero causarne il depauperamento. Tale evento potrebbe indurre, come effetto compensatorio, la riduzione dei livelli di GNMT e SARDH. Questi due enzimi sono infatti coinvolti nel ciclo futile di SAM, necessario per impedirne il deleterio accumulo. Va ricordato inoltre che l'espressione e l'attività di GNMT è regolata

positivamente da SAM (Martinez-Chantar *et al.*, 2008; Mato & Lu, 2007). Infine la riduzione dell'S-adenosilmetionina giustificherebbe anche la riduzione di PHB1 (Santamaria *et al.*, 2003).

In base ai dati ottenuti abbiamo quindi formulato un'ipotesi secondo la quale l'alterata modulazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo della metionina (ADK, MAT1A e ALDH1L1), comporterebbe una riduzione del rapporto SAM/SAH, la quale è correlata a varie disfunzioni tra cui la steatosi epatica (Kharbanda *et al.*, 2007). Inoltre anche la riduzione di proteine coinvolte nella risposta allo stress del reticolo endoplasmatico (HSPA5 e PDIA3) potrebbe essere associata all'induzione di tale patologia (Ji, 2008); così come anche la modulazione di altre due proteine riscontrata nei topi *Timp-3^{-/-}*, ovvero la riduzione di AADAC (coinvolta nella sintesi di VLDL) e l'aumento di FABP1, la cui deficienza ha un effetto protettivo nei confronti della steatosi epatica. Mentre il decremento di PHB1 (proteina associata alla funzionalità dei mitocondri) potrebbe cooperare, assieme alla ridotta espressione di proteine antiossidanti (coinvolte nel metabolismo del glutatione, MGST1 e GSTP1, e in quello del ferro, HPX e HPR), nell'incremento di stress ossidativo riscontrato nei topi KO.

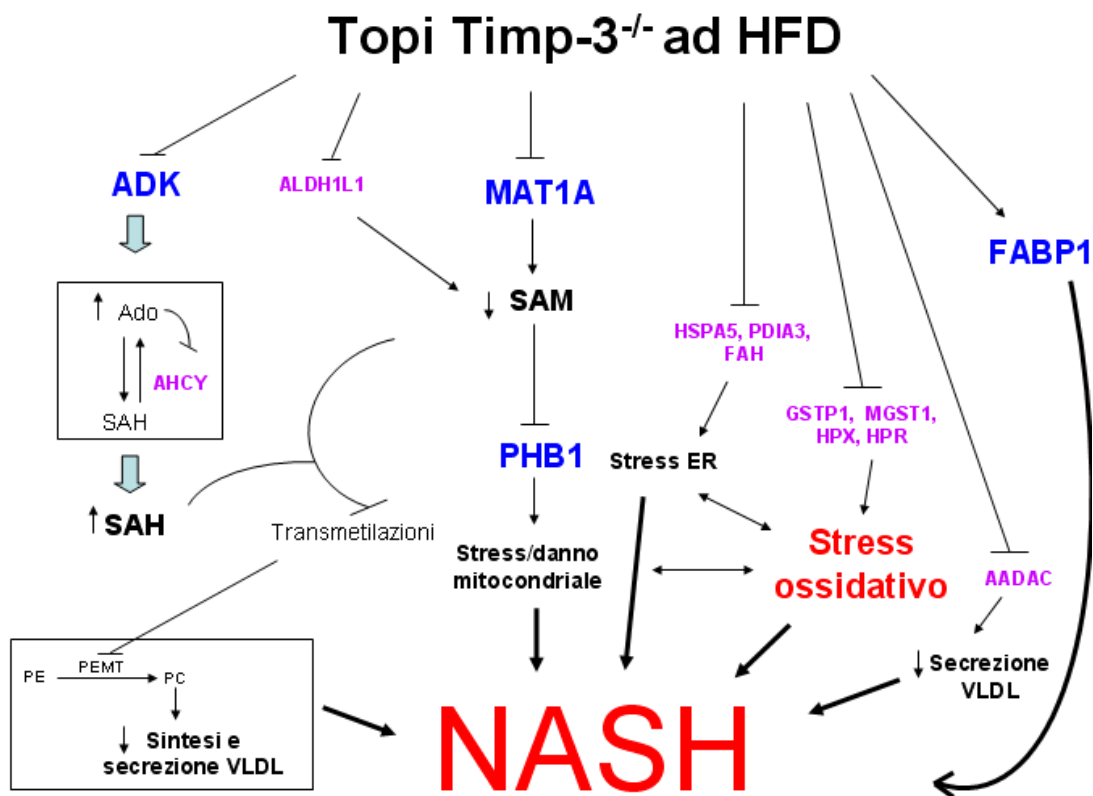


Fig. 38/ Modello di induzione di steatoepatite in topi *Timp-3*^{-/-} ad HFD. In tale figura sono indicati la maggior parte degli elementi che supponiamo possano essere coinvolti nell'induzione di steatoepatite (NASH). In blu e rosa sono evidenziate le proteine la cui modulazione è stata rilevata tramite esperimenti di proteomica *shotgun* (tranne PHB1). L'espressione delle proteine indicate in blu è stata inoltre confermata tramite *Western blot*. Infine sono indicati le molecole ed i processi dimostrati sperimentalmente (in rosso) o inseriti nel nostro modello in base ad un'indagine speculativa, basata sull'integrazione dei dati in nostro possesso con un vasto numero di riferimenti bibliografici (in grassetto). L'accumulo epatico di acidi grassi, lo stress ossidativo, lo stress dell'ER e le disfunzioni mitocondriali, in quanto attivatori delle chinasi JNK e IKK- β , possono inibire il segnale insulinico e quindi indurre l'ulteriore accumulo di grassi nel fegato.

Riassumendo, in base ai dati ottenuti da esperimenti di proteomica *shotgun*, integrati con un'analisi bioinformatica e un'accurata ricerca bibliografica, abbiamo quindi creato un modello (fig. 38) secondo il quale le varie modulazioni proteiche riscontrate nei topi *Timp-3*^{-/-} potrebbero agire sinergicamente per indurre disfunzioni epatiche, tra cui *in primis* la steatosi e la sua progressione a steatoepatite, la quale si pensa possa essere associata ad alterazioni nel metabolismo del ferro (Kohgo *et al.*, 2008), a disfunzioni mitocondriali e a stress ossidativo (Browning & Horton, 2004; Mantena *et al.*, 2007; Santamaria, *et al.*, 2003; Torres & Harrison, 2008).

In conclusione il tipo di tecnica utilizzata ci ha permesso di effettuare un'analisi ad ampio spettro dei potenziali meccanismi molecolari d'induzione di steatosi correlati alla deficienza di Timp-3 in un modello animale di obesità. Ulteriori studi saranno necessari per confermare ed approfondire i singoli *pathway* proposti. Di particolare interesse è la via d'induzione MAT1A-dipendente, la quale potrebbe essere correlata a Timp-3 in base alla sua funzione d'inibitore fisiologico di TACE. Infatti, come già menzionato, la riduzione di Timp-3 induce un'aumentata attività di TACE e, di conseguenza, un incremento dei livelli del TNF- α ; citochina di cui è stata recentemente dimostrata la capacità di reprimere MAT1A (Frago *et al.*, 2001; Mari *et al.*, 2004).

I risultati di questa ricerca suggeriscono che un approfondimento nello studio della funzionalità di Timp-3 potrebbe sfociare nell'utilizzo di una nuova strategia terapeutica atta alla prevenzione o riduzione dell'insorgenza di insulino-resistenza e NAFLD in soggetti obesi.

CONCLUSIONI

Nell'ambito di questo progetto di ricerca sono state effettuate analisi metaboliche e istologiche di topi $Timp-3^{-/-}$ sottoposti ad un regime di dieta grassa (HFD), dimostrando che la deficienza di tale proteina potenzia l'insulino-resistenza e la steatosi epatica indotte da obesità. E' stata inoltre condotta uno studio di proteomica e un'analisi bioinformatica dei risultati ottenuti, per cercare di comprendere i meccanismi di azione di Timp-3 a livello epatico. Tale indagine ha rilevato la modulazione di proteine coinvolte nel metabolismo della metionina, nella risposta allo stress del reticolo endoplasmatico (ER) e nel metabolismo lipidico, le quali potrebbero cooperare nell'induzione della steatosi epatica riscontrata. La riduzione di proteine con funzioni anti-ossidanti (coinvolte nel metabolismo del glutatione e in quello del ferro) e il decremento di molecole necessarie per una corretta funzionalità mitocondriale potrebbe invece essere responsabile dell'esacerbata condizione di stress ossidativo, uno dei più importanti fattori ipotizzati essere coinvolti nella progressione della steatosi a steatoepatite (NASH) (Pessayre, 2007). Infatti è stato dimostrato che le proteine estratte dal fegato dei topi $Timp-3^{-/-}$ sono maggiormente ossidate rispetto alle proteine corrispondenti ottenute dai topi WT. Inoltre gli eventi dimostrati (accumulo epatico di acidi grassi e stress ossidativo) e quelli ipotizzati in base alle modulazione proteiche riscontrate (stress dell'ER e disfunzioni mitocondriali), in quanto attivatori delle chinasi JNK e IKK- β e quindi inibitori del segnale insulinico, potrebbero ampiamente giustificare l'esasperazione della condizione d'insulino-resistenza riscontrata nei topi $Timp-3^{-/-}$ ad HFD rispetto ai corrispondenti WT.

BIBLIOGRAFIA

- Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 231-240, 1996.
- Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 17: 443-453, 1996.
- Anguera MC, Field MS, Perry C, Ghandour H, Chiang E, Selhub J, Shane B, Stover PJ. Regulation of folate-mediated one-carbon metabolism by 10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J Biol Chem* 281: 18335-18342, 2006.
- Arribas J, Borrato A. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* 102: 4627-4638, 2002.
- Avila MA, Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, Perez-Mato I; Martinez-Cruz LA, del Pino MM, Corrales FJ; Mato JM. S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol* 27: 163-167, 2002.
- Bevan P. Insulin signalling. *J Cell Sci* 114:1429-1430, 2001.
- Bhaskar PT, Hay N. The Two TORCs and Akt. *Dev Cell* 12: 487-502, 2007.
- Black RA. TIMP3 checks inflammation. *Nat genet* 36: 934-935, 2004.
- Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 32-43, 2005.
- Boison D, Scheurer L, Zumsteg V, Rulicke T, Lytinski P, Fowler B, Brandner S, Mohler H. Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6985-6990, 2002.

- Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS Proteins, Insulin Action and Insulin Resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. Aug 26 (In stampa)
- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114:147-152, 2004.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820, 2001.
- Burgering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* 27: 352-360, 2002.
- Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 437: 1032-1037, 2005.
- Calvisi DF, Simile MM, Ladu S, Pellegrino R, De Murtas V, Pinna F, Tomasi ML, Frau M, Viridis P, De Miglio MR, Muroli MR, Pascale RM, Feo F. Altered methionine metabolism and global DNA methylation in liver cancer: Relationship with genomic instability and prognosis. *Int J Cancer* 121: 2410-2420, 2007.
- Canault M, Tellier E, Bonardo B, Mas E, Aumailley M, Juhan-Vague I(?), Nalbone G, Pei retti F. FHL2 interacts with both ADAM-17 and the cytoskeleton and regulates ADAM-17 localization and activity. *J Cell Phys* 208: 363-372, 2006.
- Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve? S, Barve S, McLain C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* 18:184-195, 2007.
- Chang C, Weber Z. The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11: S37-S43, 2001.

- Chavey C, Mari B, Monthouel MN, Bonnafous S, Anglard P, Van Obberghen E, Tartare-Deckert S. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 278:11888-11896, 2003.
- Cheung CK, Mak YT, Swaminathan R. Automated trichloroacetic acid precipitation method for urine total protein. *Ann Clin Biochem* 24: 140-144, 1987.
- Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Esparis-Ogando A, Yuste L, Pandiella A. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor α -converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell* 13: 2031-2044, 2002.
- Doedens JR, Black RA. Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J Biol Chem* 275: 14598-14607, 2000.
- Elsby R, Kitteringham NR, Goldring CE, Lovatt CA, Chamberlains M, Henderson CJ, Wolf CR, Park BK. Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking Glutathione S-Transferase Pi. *J Biol Chem* 278: 22243-22249, 2003.
- Eskew JD, Vanacore RM, Sung L, Morales PJ, Smith A. Cellular protection mechanism against extracellular heme. Heme-hemopexin, but not free heme, activates the N-terminal c-jun kinase. *J Biol Chem* 274: 638-648, 1999.
- Eyster CA, Duggins QS, Gorbsky GJ, Olson AL. Microtubule network is required for insulin signaling through activation of Akt/protein kinase B: evidence that insulin stimulates vesicles docking/fusion but not intracellular mobility. *J Biol Chem* 281: 39719-39727, 2006.
- Federici M, Hribal ML, Menghini R, Kanno H, Marchetti V, Porzio O, Sunnarborg SW, Rizza S, Serino M, Cunsolo V, Lauro D, Mauriello A, Smookler DS, Sbraccia P,

- Sesti G, Lee DC, Khokha R, Accili D, Lauro R. Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF- α . *J Clin Inv* 115: 3494-3505, 2005.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246: 64-71, 1989.
 - Fournier ML, Gilmore JM, Martin-Brown SA Washburn MP. Multidimensional separations-based shotgun proteomics. *Chem rev* 107: 3654-3686, 2007.
 - Frago Lm, Paneda C, Fabregat I, Varela-Nieto I. Short-chain ceramide regulates hepatic methionine adenosyltransferase expression. *J Hepatol* 34: 192-201, 2001.
 - Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359: 1-16, 2001.
 - Garton KJ, Gough PJ, Raines EW. Emerging roles for ectodomain in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 79: 1105-1116, 2006.
 - Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, Hebbachi AM. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 32:59-64, 2004.
 - Glish GL. Multiple Stage Mass Spectrometry: The Next Generation Tandem Mass Spectrometry. *Experiment Analyst* 119: 533-537, 1994.
 - Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:367-377, 2008.
 - Hamilton RJ, Sewell PA. Introduction to High-performance Liquid Chromatography. *Chapman and Hall, London. 2nd ed., 1982.*
 - Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic Steatohepatitis: What We Know in the New Millennium. *Am J Gastroenterol* 97: 2714-2724, 2002.

- Hirosawa M, Hoshida M, Ishikawa m, Toya T. MASCOT: multiple alignment system for protein sequences based on three-way dynamic programming. *Comput Appl Biosci* 9: 161-167, 1993.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867, 2006.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a casual role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440: 944-948, 2006.
- Hu L, Ye M, Jiang X, Feng S, Zou H. Advances in hyphenate analytical techniques for shotgun proteome and peptidome analysis – a review. *Anal Chim Acta* 598: 193-204, 2007.
- Huovila AP, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 30: 413-422, 2005.
- Ji C. Dissection of endoplasmic reticulum stress signalling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 23: S16-S24, 2008.
- Jonsson JA. Chromatography theory and basic principles. *Marcel Dekker, inc., New York, 1987.*
- Jump DB, Botolin D, Wang J, Christian B, Demeure O. Fatty acid Regulation of Hepatic Gene Transcription. *J Nutr* 135: 2503-2506, 2005.
- Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 473-481, 2000.
- Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46:2-19, 2003.
- Kamagate A, Qu S, Prdomo G, Dongming S, Kim DH, Slusher S, Meseck M, Dong HH. FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. *J Clin Invest* 118: 2347-2364, 2008.

- Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Proc* 78: 53-68, 1987.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption of protein with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299-2301, 1988.
- Kharbanda KK. Role of transmethylation reactions in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 13: 4947-4954, 2007.
- Kheradmand F, Werb Z. Shedding light on sheddases: role in growth and development. *Bioessays* 24:8-12, 2002.
- Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Torimoto Y, Kato J. Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 23: S78-S81, 2007.
- Krylov SN, Dovichi NJ. Capillary Electrophoresis for the Analysis of Biopolymers. *Anal Chem* 72: 11-128, 2000.
- Laiko VV, Baldwin MA, Burlingame AL. Atmospheric Pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 72: 652-657, 2000.
- Leko KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KL, Poole AR, Wakeham A, Mak TW, Khokha R. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 108: 817-829, 2001.
- Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum M. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC1 transcription coactivator. *Nature* 447: 1012-1016, 2007.
- Li Z, Agellon LB, Allen TM, Umeda M, Jewell L, Mason A, Vance DE. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab* 3:321-331, 2006.

- Lieber C, Packer L. S-Adenosylmethionine: molecular, biological, and clinical aspects – an introduction. *Am J Clin Nutr* 76: 1148S-11450S, 2002.
- Lizcano JM, Alessi DR. The insulin signalling pathway. *Curr Biol* 12: R236-238, 2002.
- Lu SC, Tsukamoto H, Mato JM. Role of abnormal methionine metabolism in alcoholic liver injury. *Alcohol* 27: 155-162, 2002.
- Lu SC. S-Adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *Am J Clin Nutr* 76: 1183S-1187S, 2002.
- Lu SC. S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 391-395, 2000.
- Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic Reticulum stress and Oxidative Stress: A vicious cycle or a double-edged sword? *Antiox Redox Signal* 9:2277-2293, 2007.
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Ann Rev Biochem* 70: 437-473, 2001.
- Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver disease. *Free Radicals Biol & Med* 44: 1259-1272, 2008.
- Mari M, Colell A, Morales A, Paneda C, Varela-Nieto I, Garcia-Ruiz C, FernandezCheca JC. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest* 113: 895-904, 2004.
- Martinez-Chantar ML, Vazquez-Chantada M, Ariz U, Martinez N, Varela M, Luka Z, Capdevila A, Rodriguez J, Aransay AM, Matthiens R, Yang H, Calvisi DF, Esteller M, Fraga M, Lu SC, Wagner C, Mato JM. Loss of the glycine N-methyltransferase

- gene leads to steatosis and hepatocellular Carcinoma in Mice. *Hepatology* 47: 1191-1199, 2008.
- Mato JM, Lu SC. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology* 45: 1306-1312, 2007.
 - Mato JM, Martinez-Chantar ML, Lu Sc. Methionine metabolism and liver disease. *Annu Rev Nutr* 28: 273-293, 2008.
 - McLuckey. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry *J Am Soc Mass Spectrom* 3:599-614, 1992.
 - Menghini R, Menini S, Amoruso R, Fiorentino L, Casagrande V, Marzano V, Tornei F, Bertucci P, Iacobini C, Serino M, Porzio O, Hribal ML, Folli F, Khokha R, Urbani A, Lauro R, Pugliese G, Federici M. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 Deficiency Causes Hepatic Steatosis and Adipose Tissue Inflammation in Mice. *Gastroenterology*. 2008 Nov 6. [doi:10.1053/j.gastro.2008.10.079](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.079)
 - Merkwirth C, Langer T. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1793:27-32, 2009.
 - Mezyk R, Bzowska M, Bereta J. Structure and function of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Acta Biochim Pol* 50: 625-645, 2003.
 - Mohammed FF, Smookler DS, Khokha R. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62: ii43-ii47, 2003.
 - Mohammed FF, Smookler DS, Taylor SE, Fingleton B, Kassiri Z, Sanchez OH, English JL, Matrisian LM, Au B, Yeh WC, Khoka R. Abnormal TNF activity in *Timp3*^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat genet* 36: 969-977, 2004.

- Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y, Furlanetto RW. Suppressors of cytokine signalling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 276: 25889-25893, 2001.
- Murphy G, Murthy A, Khokha R. Clipping, shedding and RIPing keep immunity on cue. *Trens Immunol* 29:75-82, 2008.
- Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 4: 119-129, 2003.
- Nelson KK, Schlondorff J, Blobel CP. Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor α convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2 β . *Biochem J* 343: 673-680, 1999.
- Nesvizhskii AI. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol Biol* 367: 87-119, 2007.
- Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Sternard BT, Luo Jianyang, Davidson NO. Diet-induced obesity and hepatic steatosis in L-Fabp^{-/-} mice is abrogated with SF, but not PUFA, feeding and attenuated after cholesterol supplementation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G307-G314, 2008.
- Newton RC, Solomon KA, Covington MB, Decicco CP, Haley PJ, Friedman SM, Vaddi K. Biology of TACE inhibition. *Ann Rheum Dis* 60: iii25-iii32, 2001.
- Nguyen MTA, Satoh H, Favelyukis S, Babendure JL, Inamura T, Sbodio JI, Zalevsky J, Dahiyat B, Chi N, Olefsky JM. JNK and tumor necrosis factor- α mediated free fatty

- acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocyte. *J Biol Chem* 280: 35361-35371, 2005.
- Niessen WM, Tinke AP. Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles and instrumentation. *J Chromatogr* 703: 37-57, 1995.
 - Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxidant Redox Signal* 9: 343-353, 2007.
 - Noga AA, Vance DE. A gender-specific role for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-derived phosphatidylcholine in the regulation of plasma high density and very low density lipoproteins in mice. *J Biol Chem* 278: 21851-21859, 2003.
 - Noga AA, Zhao Y, Vance DE. An unexpected requirement for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in the secretion of very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 277: 42358-42365, 2002.
 - O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. 250: 4007-4021, 1975.
 - Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado (?) YS. Matrix metalloproteases modulators of inflammation and innate immunity. *Nat rev immunol* 4: 617-629, 2004.
 - Pawelczyk T, Sakowicz M, Szczepanska-Konkel M, Angielski S. Decreased expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Arch Biochem Biophys* 375: 1-6, 2000.
 - Peiretti F, deprez-Beauclair P, Bonardo B, Aubert H, Juhan-Vague I, Nalbone G. Identification of SAP97 as an intracellular binding partner of TACE. *J Cell Sci* 116: 1949-1957, 2003.

- Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22: S20-S27, 2007.
- Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri VO, Palasciano G. Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management. *Clin Biochem* 38: 203-217, 2005.
- Postic C, Girard J. Contribution of the novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118: 829-838, 2008.
- Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trend Genet* 16: 83-87, 2000.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC1 α interaction. *Nature* 423: 550-555, 2003.
- Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 21: 1443-1455, 2007.
- Qui JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 9: 407-415, 2003.
- Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine & Growth Factor Review* 14: 447-455, 2003.
- Saltiel AR, Kahn R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806, 2001.

- Sanal MG. The blind men ‘see’ the elephant-the many faces of fatty liver disease. *World J Gastr* 14: 831-844, 2008.
- Santamaria E, Avila MA, Latasa MU, Rubio A, Martin-Duce A, Lu SC, Mato JM, Corrales FJ. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: Mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18: 3065-3070, 2003.
- Santos-Martinez, MJ, Medina C, Jurasz P, Radomski MW. Role of metalloproteinases in platelet function. *Thromb Res* 121:535-542, 2008.
- Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanism of insulin resistance. *Diabet Med* 22: 674-682, 2005.
- Serino M, Menghini R, Fiorentino L, Amoruso R, Mauriello A, Lauro D, Sbraccia P, Hribal ML, Lauro R, Federici M. Mice heterozygous for tumor necrosis factor- α converting enzyme are protected from obesity-induced insulin resistance and diabetes. *Diabetes* 56: 2541-2546, 2007.
- Sesti G, Federici M, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant form. *Diabetes Metab Res Rev* 17: 363-373, 2001.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insuline resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801, 2006.
- Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-176, 2000.
- Siritantikorn A, Johansson K, Ahlen K, Rinaldi R, Suthiphongchai T, Wilairat P, Morgenstern R. Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 592-596, 2007.

- Smookler DS, Mohammed FF, Kassiri Z, Duncan GS, Mak TW, Khokha R. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. *J Immunol* 176:721-725, 2006.
- Soond SM, Everson B, Riches DW, Murphy G. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* 118: 2371-2380, 2005.
- Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54: 1926-1933, 2005.
- Swartz ME. UPLC: An introduction and review. *J Liq Chrom* 28: 1253-1263, 2005.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2: 151-153, 1988.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96, 2006.
- Tellier E, Canault M, Rebsomen L, Bonardo B, Juhan-Vague(?) I, Nalbone G, Peiretti F. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res* 312:3969-3980, 2006.
- Theiss AL, Idell RD, Srinivasan S, Klapproth JM, Jones DP, Merlin D, Sitaraman SV. Prohibitin protects against oxidative stress in intestinal epithelial cells. *FASEB J* 21: 197-206, 2007.
- Thomson JJ. Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis. *Longmans, Green & Co, London, 1913.*

- Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 131: 934-945, 2006.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature* 6: 772-783, 2006.
- Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med* 14: 222-231, 2008.
- Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 134: 1682-1689, 2008.
- Trickett JI, Patel DD, Knight BL, Saggerson ED, Gibbons GF, Pease RJ. Characterization of the rodent genes for arylacetamide deacetylase, a putative microsomal lipase, and evidence for transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276: 39522-39532, 2001.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2: 827-839, 2003.
- Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, de Witte T, Fogdor CG. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 98: 1802-1811, 2001.
- Wasinger VC, Cordwell SL, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16: 1090-1094, 1995
- Wassink AM, Olijhoek JK, Visseren FL. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Inv* 37:8-17, 2007.

- Wei S, Kashiwagi M, Kota S, Xie Z, Nagase H, Brew K. Reactive site mutations in tissue inhibitor of metalloproteinases-3 disrupt inhibition of matrix metalloproteinases but not tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *J Biol Chem* 280: 32877-32882, 2005.
- Weickhardt C, Moritz F, Grotemeyer J. Time-of-flight mass spectrometry: state of the art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrom Rev* 15: 139-162, 1996.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119, 2005.
- White JM. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Cur Opin Cell Biol* 15: 598-606, 2003.
- Wiley WC, McLaren IH. Time of flight mass spectrometer with improved resolution. *Rev Sci Instr* 26: 1150-1157, 1955.
- Wortham M, He L, Gyamfi M, Copple BL, Wan JY. The transition from fatty liver to NASH associates with SAMe depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet. *Dig Dis Sci* 53: 2761-2774, 2008.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR Signaling in growth and metabolism. *Cell* 10: 471-484, 2006.
- Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2: 502-511, 2001.
- Yost RA, Boyd RK. Tandem mass spectrometry: quadrupole and hybrid instruments. *Methods Enzymol* 193: 154-200, 1990.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI.

Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277: 50230-50236, 2002.

- Zhang Z, Chait BT. ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem* 72: 2482-2489, 2000.
- Zhang Z, Oliver P, Lancaster JR, Schwarzenberg PO, Joshi MS, Cork J, Kolls JK. Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *FASEB J* 15:303-305, 2001.
- Zheng Y, Schlondorff J, Blobel CP. Evidence for regulation of the tumor necrosis factor α -convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *J Biol Chem* 277:42463-42470, 2002.
- Zhu X, Song J, Mar M, Edwards LJ, Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline. *Biochem J* 370: 987-993, 2003.
- Zick Y. Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochem Soc Trans* 32: 812-816, 2004.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Renato Lauro per avermi accolta nel suo laboratorio, il Prof. Massimo Federici, tutor del mio Dottorato di Ricerca, per essere stato un modello per la sua dedizione al lavoro e il Prof. Andrea Urbani per avermi ospitata temporaneamente nel laboratorio di neuroproteomica (FSL/EBRI).

Ringrazio la dot.ssa Valentina Marchetti, per aver seguito minuziosamente i miei primi passi nell'ambito del mio Dottorato ed aver contribuito alla mia crescita professionale.

Sono grata a Valeria Marzano per avermi pazientemente propiziata al mondo della proteomica, per la sua estrema disponibilità, per avermi aiutata e sostenuta nei momenti di scoraggiamento, mostrandomi stima ed affetto. Grazie a Maurizio Ronci per il supporto tecnico e per i consigli (e per le lezioni di salsa!). Un caloroso ringraziamento a tutto il gruppo del Prof. Urbani (che stimo per professionalità e dedizione al lavoro), per i consigli elargiti, ma soprattutto per avermi accolta con calore e simpatia.

La mia stima e i miei ringraziamenti vanno a quei colleghi, in particolare il dot. Marco Lombardo e la dot.ssa Barbara Capuani, ricchi di spirito collaborativo, che in maniera del tutto disinteressata mi hanno offerto “consulenze”, consigli o anche un semplice appoggio morale (a volte una semplice pacca sulla spalla o un pensiero delicato al momento del bisogno valgono più di mille parole).

Uno spontaneo moto di affetto va alla mia “gemella” Dona, semplicemente per il suo candore e la sua spontaneità. Ringrazio Sharon per esserci sempre (almeno telefonicamente) e Faby per tutte le chiacchierate di sfogo, di confidenze e per le (fondamentali) serate di svago.

Ovviamente ringrazio tutti i miei amici/colleghi con il quale ho mangiato, riso, scherzato e condiviso gran parte della mia giornata e della mia vita per tre anni (e che mi mancheranno molto!), per la collaborazione ma soprattutto per aver reso piacevole la mia permanenza in laboratorio. Mi riferisco al dot. Roberto Arriga, al dot. Michele Cavalerà, alla dot.ssa Roberta Amoruso, alla dot.ssa Viviana Casagrande e al Sig. Ezio Caniglia (alias Scamorzo', Spike, Roby, Svvv ed Eziù). Ed in particolare mi riferisco alla dot.ssa Federica Tornei (alias Frog), lavoratrice instancabile e soprattutto amica sincera, leale, dal cuore d'oro (che è stata il mio raggio di sole nel periodo più buio).

Ringrazio infine la mia famiglia per il loro affetto e la loro presenza “invisibile”, che mi ha fatto sempre sentire amata ma libera; sono debitrice soprattutto a mia madre che involontariamente è sempre stata la “molla” che mi ha spinto a dare il massimo in ogni circostanza.

Alla fine di questo lungo percorso è bello fermarsi a riflettere e realizzare di essere appagati. Un po' (lo ammetto) per aver ottenuto un qualsivoglia risultato lavorativo, che dopo tante incertezze, riconsola dalla fatica e migliora l'autostima. Ma molto di più per aver scoperto che nessuna delle difficoltà incontrate è stata in grado di spegnere la mia passione per questo lavoro affascinante, che richiede tanta tenacia e devozione ma offre anche molti stimoli.