



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

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
**FISIOPATOLOGIA SPERIMENTALE**

XXII CICLO

**RUOLO DELLA DIADE TACE/TIMP3**  
**NELL'INSULINO-RESISTENZA E NELLA STEATOSI**  
**EPATICA**

**LOREDANA FIORENTINO**

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof. MASSIMO FEDERICI

Coordinatore: Prof. RENATO LAURO

# INDICE

<b>SOMMARIO</b>	pag. 5
<b>ABSTRACT</b>	pag. 7
<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 9
<b>1. INFIAMMAZIONE E DISORDINI METABOLICI</b>	pag. 9
1.1 LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE INSULINICO	pag. 12
1.2 FUNZIONI DELL'INSULINA	pag. 16
1.2.1 <i>Funzioni PI3K-indipendenti</i>	pag. 16
a) Ruolo mitogenico	pag. 16
b) Ruolo nella regolazione dell'assorbimento del glucosio	pag. 16
1.2.2 <i>Funzioni PI3K-dipendenti</i>	pag. 17
a) L'assorbimento del glucosio	pag. 18
b) La sintesi del glicogeno	pag. 19
c) La gluconeogenesi, la glicolisi e l'omeostasi lipidica	pag. 19
d) mTOR e la sintesi proteica	pag. 21
1.3 LO SPEGNIMENTO DEL SEGNALE INSULINICO	pag. 22
1.4 INFIAMMAZIONE, OBESITA' ED INSULINO-RESISTENZA	pag. 24
1.4.1 <i>L'insulino-resistenza</i>	pag. 24
1.4.2 <i>Meccanismi infiammatori d'induzione dell'insulino-resistenza</i>	pag. 25
a) Citochine infiammatorie	pag. 26
b) Stress del reticolo endoplasmatico	pag. 28
c) Stress ossidativo	pag. 29
d) Disfunzioni mitocondriali	pag. 30
e) Altri mediatori di infiammazione: SOCS ed iNOS	pag. 31
1.5 STEATOSI EPATICA E NAFLD	pag. 32
1.5.1 <i>Regolazione della sintesi di trigliceridi nel fegato</i>	pag. 35
1.5.2 <i>Metabolismo della metionina e disfunzioni epatiche</i>	pag. 38
<b>2. METALLOPROTEASI</b>	pag. 42
2.1 <i>SHEDDING</i>	pag. 42

2.2 ADAM17/TACE	pag. 47
2.3 METALLOPROTEASI DI MATRICE (MMP)	pag. 49
2.4 INIBITORI TISSUTALI DI METALLOPROTEASI (TIMP)	pag. 51
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	pag. 54
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag. 55
<b>1. COLTURE CELLULARI</b>	pag. 55
1.1 INFEZIONE CON ADENOVIRUS	pag. 55
1.2 TRATTAMENTI METABOLICI	pag. 56
<b>2. MODELLI ANIMALI</b>	pag. 56
<b>3. ANALISI METABOLICHE <i>IN VIVO</i></b>	pag. 57
3.1 MISURAZIONE DEL PESO E DELLA GLICEMIA	pag. 57
3.2 DETERMINAZIONE DEI LIVELLI INSULINEMICI	pag. 57
3.3 CURVE GLICEMICHE	pag. 58
<b>4. ANALISI ISTOLOGICA</b>	pag. 58
<b>5. ANALISI PROTEOMICA</b>	pag. 59
5.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	pag. 59
5.2 LC-ESI-MS/MS	pag. 60
<b>6. ANALISI BIOINFORMATICA</b>	pag. 62
<b>7. ANALISI BIOCHIMICHE</b>	pag. 63
7.1 WESTERN BLOT	pag. 63
7.1.1 <i>Anticorpi</i>	pag. 64
7.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA	pag. 65
7.3 MISURAZIONE DELL'ATTIVITA' DI TACE	pag. 66
<b>8. MISURAZIONE DEI LIVELLI DI SAM E SAH</b>	pag. 67
<b>9. ANALISI STATISTICA</b>	pag. 68
<b>RISULTATI</b>	pag. 69

1. L'attività di TACE è indotta da stimoli metabolici ed inibisce la trasduzione del segnale insulinico <i>in vitro</i>	pag. 69
2. L'espressione e l'attività di TACE sono modulate da una dieta ricca in grassi	pag. 73
3. La deficienza di Timp-3 potenzia l'insulino-resistenza e la steatosi epatica indotta dalla dieta grassa	pag. 75
4. Analisi del proteoma epatico di topi Timp-3 <sup>-/-</sup> e <i>wild type</i> sottoposti a dieta grassa	pag. 78
5. Analisi bioinformatica: associazioni funzionali tra le proteine identificate	pag. 82
6. La diade TACE/Timp-3 è coinvolta nella regolazione del metabolismo epatico	pag. 85
7. L'attività di TACE è responsabile dei difetti metabolici osservati nei topi Timp-3 <sup>-/-</sup>	pag. 89
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 92
<b>CONCLUSIONI</b>	pag. 97
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 98
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	pag. 113

# SOMMARIO

Nel nostro laboratorio è stato recentemente dimostrato che l'enzima TACE (TNF $\alpha$ -converting enzyme) e il suo inibitore fisiologico Timp-3 sono coinvolti nella patogenesi dell'insulino-resistenza e conseguentemente nell'omeostasi metabolica.

Nel presente lavoro sono stati effettuati studi metabolici su topi sottoposti ad un regime alimentare ricco in grassi ed è stato osservato un aumento dell'attività di TACE nel fegato di tali animali e, in misura minore, anche nel muscolo e nel tessuto adiposo, rispetto a topi di controllo nutriti con una dieta normale. E' stato anche dimostrato che l'attività di TACE può essere indotta in diversi sistemi cellulari da numerosi stimoli metabolici, come l'acido palmitico, il lipopolisaccaride, alte concentrazioni di glucosio o di insulina, e questa attivazione è in grado di interferire con la via di trasduzione del segnale insulinico, determinando una diminuzione nella fosforilazione di Akt, GSK3 e FoxO1.

Per studiare *in vivo* il ruolo dell'attività di TACE sono stati utilizzati dei topi *knockout* per Timp-3 (Timp-3<sup>-/-</sup>) che, mancando dell'inibitore dell'enzima, hanno di base un'aumentata attività di TACE. I topi Timp-3<sup>-/-</sup> sottoposti a dieta grassa sono caratterizzati da una ridotta tolleranza al glucosio e da steatosi epatica. Allo scopo di individuare i meccanismi molecolari responsabili del fenotipo osservato, è stato analizzato mediante spettrometria di massa il proteoma epatico di topi *wild type* (WT) e Timp-3<sup>-/-</sup> sottoposti a dieta grassa per 20 settimane e i dati ottenuti sono stati interpretati e integrati mediante programmi di bioinformatica. Sono state così identificate alcune proteine che

presentano livelli di espressione diversi nei due genotipi; tra queste l'adenosina-chinasi (ADK), la metionina adenosil-trasferasi I/III (MATI/III) e la glicina N-metiltrasferasi (GNMT) risultano meno espresse, mentre l'espressione di FABP-1 (fatty acid binding protein 1) risulta aumentata nei topi  $Timp3^{-/-}$  rispetto ai topi WT. Le stesse variazioni nei livelli di espressione di tali molecole sono state riscontrate anche in epatociti *in vitro* in cui l'espressione di TACE è stata aumentata mediante infezione retrovirale. Tutte queste proteine svolgono un ruolo importante nel metabolismo degli acidi grassi e della metionina. Queste alterazioni hanno contribuito a chiarire il meccanismo molecolare che è alla base dell'aumentata insulino-resistenza e della steatosi epatica che caratterizza i topi  $Timp3^{-/-}$ , fornendo così un'evidenza del ruolo importante che la diade TACE-Timp-3 assume nella risposta dell'organismo ad una dieta ricca di grassi.

# ABSTRACT

Tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme (TACE) and its physiological inhibitor Timp-3 were recently involved in the pathogenesis of insulin resistance. We observed that TACE activity was significantly higher in mice fed a high fat diet, particularly in livers but also in muscle and adipose tissue, compared to littermates fed a regular diet. In mouse hepatocytes, myocytes and adipocytes TACE activity was triggered by several metabolic stimuli, such as palmitic acid, lipopolysaccharide, high glucose and high insulin. TACE overexpression significantly impaired insulin-dependent phosphorylation of Akt, GSK3 and FoxO1, the major controllers of gluconeogenesis and lipogenesis.

To test the role of TACE activation *in vivo*, we used Timp3 null mice which have higher TACE activity compared with wild type (WT) mice. Timp3<sup>-/-</sup> mice fed a high fat diet for 20 weeks were glucose-intolerant and insulin-resistant; they showed macrovesicular steatosis and ballooning degeneration compared to WT mice, which presented only microvesicular steatosis.

Shotgun proteomic analysis revealed that Timp3<sup>-/-</sup> liver has a significant differential expression of 38 proteins, including lower levels of adenosine kinase (ADK), methionine adenosyltransferase I/III (MATI/III) and glycine N-methyltransferase (GNMT), and higher levels of liver fatty acid-binding protein 1 (FABP-1). These changes in protein levels were also observed in hepatocytes infected with an adenovirus encoding TACE. All these proteins play a role in fatty acid uptake, trygliceride synthesis and

methionine metabolism, providing a molecular explanation for the increased hepatosteatosis observed in  $Timp3^{-/-}$  compared to WT mice.

So we have identified novel mechanisms governed by the TACE/ Timp3 dyad involved in the determination of insulin resistance and liver steatosis during overfeeding in mice.



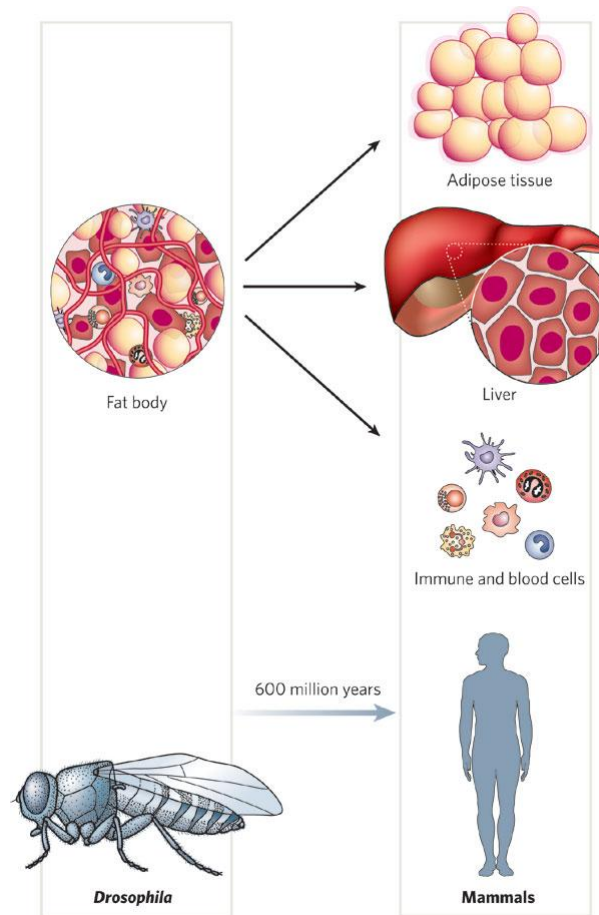
# INTRODUZIONE

## 1. INFIAMMAZIONE E DISORDINI METABOLICI

La sopravvivenza degli organismi multicellulari dipende dalla loro capacità di rispondere in maniera efficiente alle infezioni e di conservare l'energia metabolica per poterla utilizzare nei periodi di scarsa disponibilità di nutrienti o di aumentata richiesta energetica. Per questo motivo, i meccanismi molecolari che regolano tali capacità risultano altamente conservati a livello evolutivo da organismi piuttosto semplici come il nematode *Caenorhabditis elegans* o la mosca *Drosophila melanogaster* fino all'uomo. Un'ulteriore prova delle funzioni fondamentali svolte da questi sistemi risiede nel fatto che essi si sono evoluti da unità ancestrali comuni, quali possono essere considerati i *fat bodies* di *Drosophila* (fig.1), che comprendono gli omologhi del fegato, del tessuto adiposo, del sistema immunitario ed ematopoietico, e che risultano strettamente interdipendenti sia strutturalmente che funzionalmente anche negli organismi superiori.

A livello molecolare, molte citochine, ormoni, fattori di trascrizione e lipidi bioattivi mediano risposte sia immunitarie che metaboliche, anche grazie ad una particolare architettura che nel tessuto adiposo e nel fegato degli organismi superiori porta in stretta vicinanza le cellule metaboliche (adipociti ed epatociti), con le cellule del sistema immunitario (macrofagi e cellule di Kupffer). Entrambi questi tipi cellulari hanno poi accesso ad una vasta rete di vasi sanguigni che permette un'interazione dinamica e continua tra risposta metabolica ed

immunitaria, e la comunicazione con altri distretti come il pancreas ed i muscoli. Grazie a questa stretta integrazione, i nutrienti possono indurre infiammazione ed agenti patogeni possono regolare i processi metabolici, permettendo quindi ai due sistemi di modificarsi a vicenda.

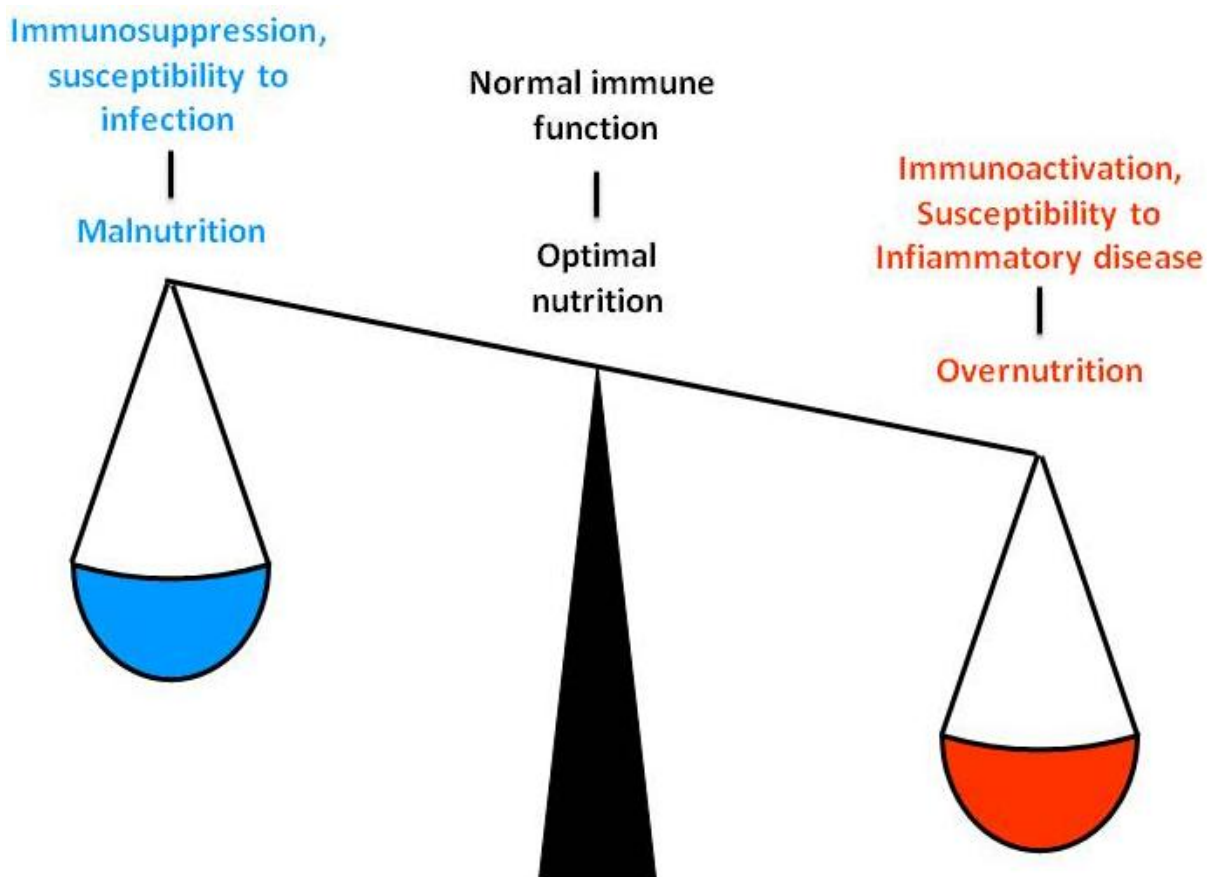


**Figura 1. Evoluzione del tessuto adiposo, del fegato e del sistema ematopoietico in organi distinti nei mammiferi.** In *Drosophila melanogaster* il tessuto adiposo, il fegato ed il sistema ematopoietico sono organizzati in una singola unità funzionale, il “*fat body*”. Questa eredità sottolinea l’alto grado di integrazione di questi organi, e lo stretto legame tra il sistema immunitario e la regolazione del metabolismo (tratta da Hotamisligil, 2006).

Questo tipo di organizzazione risulta vantaggiosa in alcune condizioni, ad esempio quando l’organismo deve organizzare e ridistribuire le

proprie riserve energetiche per attuare una efficace risposta immunitaria o infiammatoria. In questo caso è necessario favorire i processi catabolici, in particolare la trasformazione dei grassi in mediatori lipidici, e bloccare i processi anabolici, molti dei quali sono attivati dall'insulina, l'ormone responsabile della trasformazione dei nutrienti in riserve di grassi e zuccheri.

La stretta correlazione tra metabolismo e immunità risulta quindi vantaggiosa in condizioni normali, quando i due sistemi si trovano in equilibrio, ma qualunque variazione che modifichi tale equilibrio per un lungo periodo di tempo produce effetti deleteri nell'organismo (fig.2). Se da un lato un'esposizione prolungata ad agenti patogeni altera le funzioni metaboliche dalla *Drosophila* all'uomo, dall'altro è ben noto che individui malnutriti sono più suscettibili alle infezioni perché non sono in grado di attivare una risposta immunitaria efficace. Tuttavia dal secolo scorso, grazie ai progressi scientifici ed al generale miglioramento delle condizioni di vita, ha cominciato ad emergere un nuovo aspetto in grado di alterare l'equilibrio fra sistema metabolico ed immunitario, e cioè la sovra nutrizione, il surplus calorico che caratterizza le abitudini alimentari dei paesi sviluppati, e che, insieme alla diminuita attività fisica, ha portato circa 1 miliardo di persone nel mondo ad essere sovrappeso od obeso. Con l'avvento dell'obesità pandemica, l'interfaccia tra metabolismo e sistema immunitario si è arricchita di nuove complicazioni, compresi il diabete, l'aterosclerosi, e la steatosi epatica, e proprio in virtù della stretta relazione tra i due sistemi, tali patologie metaboliche risultano tutte caratterizzate da fenomeni infiammatori cronici (Hotamisligil, 2006; Wellen & Hotamisligil, 2005).

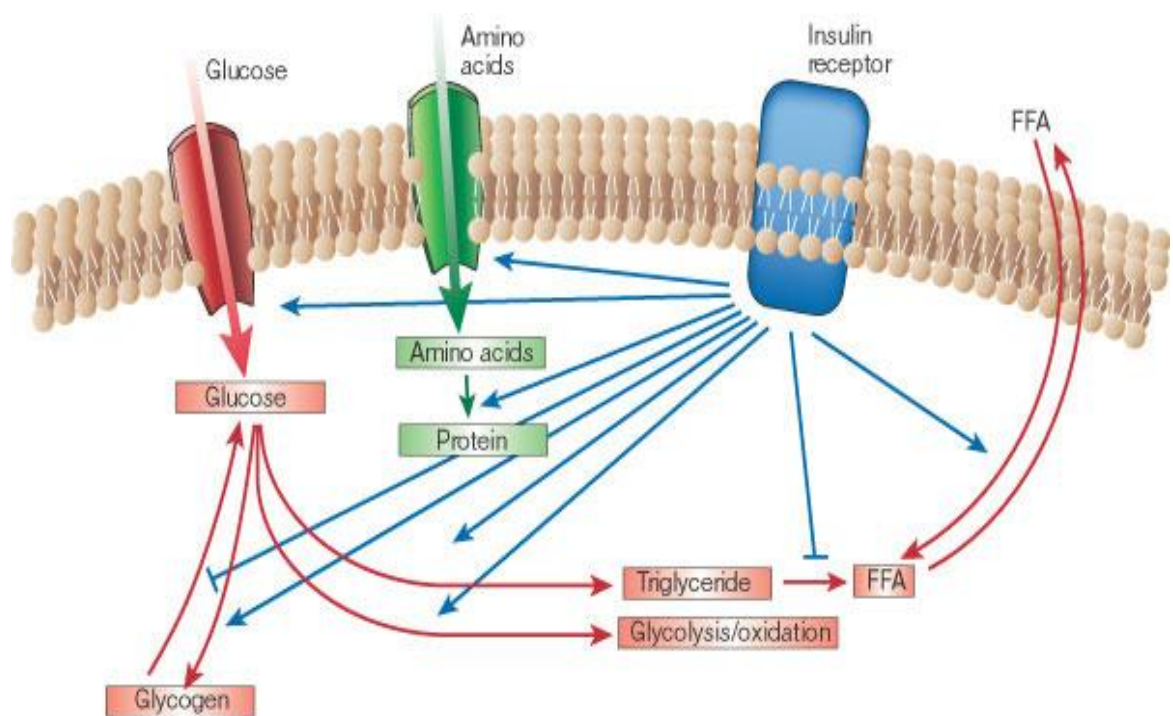


**Figura 2. Il metabolismo ed il sistema immune.** Il sistema metabolico e quello immune sono strettamente associati. Sbilanciamenti nell'alimentazione possono avere implicazioni nelle funzioni immunitarie. La malnutrizione o il digiuno deprimono il sistema immunitario, comportando una maggiore suscettibilità alle infezioni. Viceversa l'obesità è associata con un'inflammatione cronica di basso grado e con l'aumentato rischio di malattie infiammatorie, quali aterosclerosi, diabete e steatosi epatica (tratto da Wellen & Hotamisligil, 2005).

## 1.1 La trasduzione del segnale insulinico

Come accennato prima, l'insulina è il principale ormone anabolizzante, secreto dalle cellule  $\beta$ -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  $\beta$ -pancreatiche.

L'insulina facilita l'assorbimento del glucosio presente in circolo da parte del tessuto adiposo e del muscolo e ne inibisce la produzione da parte del fegato, agendo così da regolatore primario della concentrazione ematica di tale zucchero. Inoltre questo ormone promuove l'accumulo di nutrienti (glucosio, amminoacidi e acidi grassi) nel fegato, nel tessuto adiposo e nel muscolo in quanto stimola la sintesi di glicogeno e la lipogenesi e allo stesso tempo sopprime la glicogenolisi e la lipolisi (fig. 3) (Lizcano & Alessi, 2002; Saltiel & Kahn, 2002; Zick, 2004)

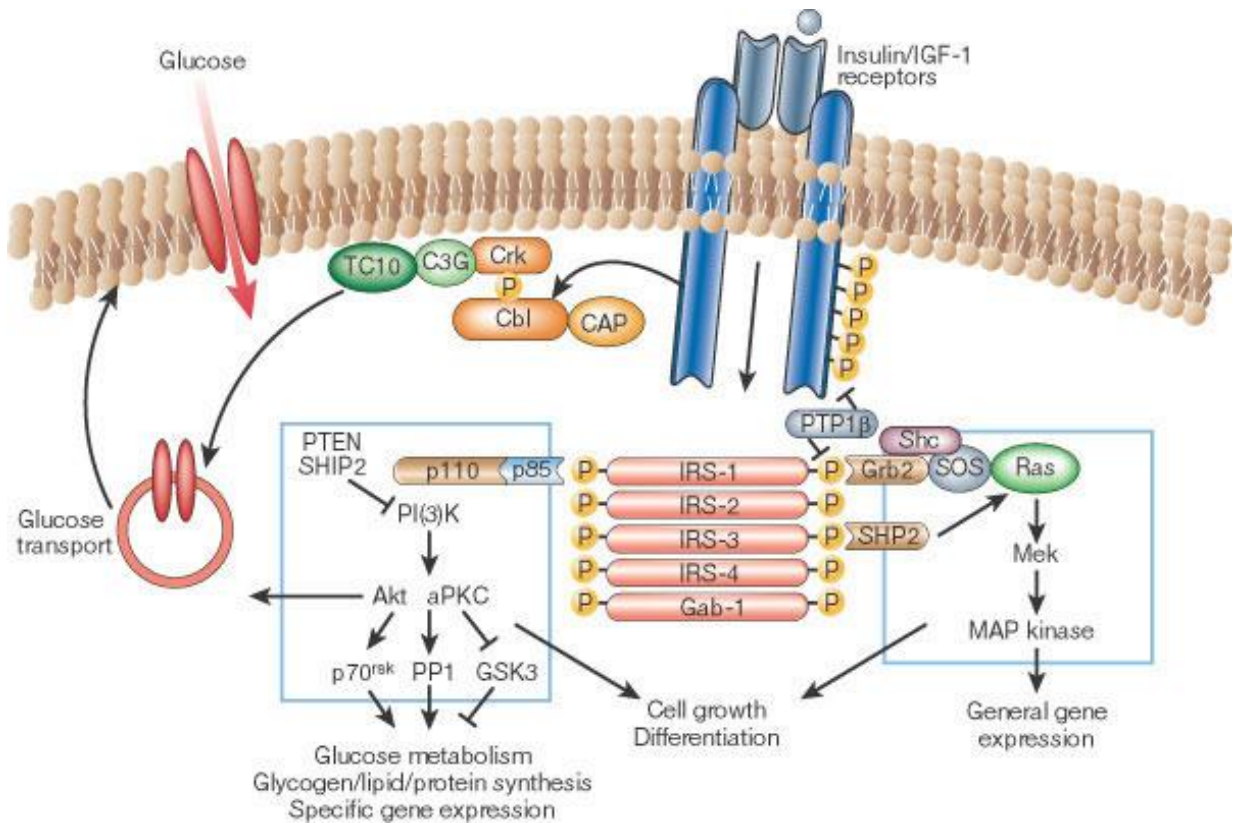


**Figura 3. Regolazione del metabolismo da parte dell'insulina.** L'insulina è il più potente ormone anabolizzante; promuove la sintesi e la conservazione di carboidrati, grassi e proteine, inibendone al tempo stesso la degradazione e il rilascio in circolo. L'insulina infatti stimola l'assorbimento del glucosio, degli amminoacidi e degli acidi grassi nella cellula, ed aumenta l'espressione o l'attività di enzimi che catalizzano la sintesi del glicogeno, dei lipidi e delle proteine, mentre inibisce l'attività e l'espressione di quelli che ne catalizzano la degradazione (tratto da Saltiel & Kahn, 2001).

L'insulina agisce attraverso l'interazione con il suo recettore (IR, *insulin receptor*), presente nei principali tessuti responsivi, come il muscolo, il tessuto adiposo e il fegato. Tale recettore è una glicoproteina eterotetramerica che appartiene ad una famiglia di recettori tirosino-chinasici, la quale include anche il recettore di IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) e IRR (*insulin receptor-related receptor*). Tali proteine sono composte da due subunità  $\alpha$  extracellulari e due subunità  $\beta$  transmembrana, unite da ponti disolfuro, che funzionano come enzimi allosterici: la subunità  $\alpha$  inibisce l'attività chinasi della subunità  $\beta$ . Il legame dell'insulina alla porzione extracellulare del recettore smaschera l'attività tirosino-chinasica del dominio intracellulare, comportandone l'autofosforilazione e il conseguente legame a diverse proteine citoplasmatiche, che vengono a loro volta fosforilate.

Le principali molecole coinvolte in tale processo sono le proteine substrato di IR (IRS 1-6); in particolare IRS-1 e IRS-2 sono quelle espresse più diffusamente e maggiormente coinvolte nel metabolismo glucidico. Sono inoltre stati identificati altri substrati del recettore insulinico, quali Cbl, APS, Gab-1, p60<sup>dok</sup> e alcune isoforme della proteina Shc. Tali substrati sono a loro volta responsabili del reclutamento sulla membrana plasmatica di varie proteine che mediano la trasduzione del segnale insulinico a valle, determinando risposte diverse all'interno della cellula.

Il segnale insulinico si propaga infatti principalmente attraverso tre vie di trasduzione, mediate da MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), Cbl/CAP (*Cbl-associated protein*) o PI3K (fig. 4) (Saltiel & Kahn, 2001; Schinner *et al.*, 2005; Sesti *et al.*, 2001; Zick, 2004).



**Figura 4. 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 altre proteine segnale, le quali sono coinvolte in diversi *pathways*. Le tre principali vie di trasduzione del segnale insulinico sono mediate da Ras/MAPK, Cbl/CAP e PI3K (tratto 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, che viene attivato in maniera indipendente anche dalla via di trasduzione di PI3K. Tale chinasi inoltre stimola la sintesi di glicogeno, proteine e lipidi ed inibisce la gluconeogenesi epatica, mediando quindi gli effetti metabolici dell'insulina (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 un altro adattatore, la proteina SOS (*Son-of-sevenless*) (fig. 4). Questa interazione determina la traslocazione in membrana e la conseguente attivazione della GTPasi Ras. Tali processi, in associazione con l'interazione della tirosin-fosfatasi SHP2 con Gab-1 o IRS1/2, inducono la stimolazione a catena di diverse serin-chinasi: Raf, MEK ed ERK/MAPK. Quest'ultima, una volta attivata, trasloca nel nucleo e fosforila vari fattori di trascrizione coinvolti nella proliferazione cellulare o nel differenziamento (Saltiel & Kahn, 2001).

#### b) Ruolo nella regolazione dell'assorbimento del glucosio

Nel tessuto adiposo e nel muscolo l'insulina stimola un accumulo del trasportatore di glucosio GLUT-4 sulla membrana plasmatica, inducendo un aumentato assorbimento di tale nutriente da parte di questi tessuti. A livello molecolare tale azione può essere conseguita parallelamente tramite la via PI3K-dipendente, descritta in seguito, e per mezzo della via di trasduzione del segnale mediata da Cbl/CAP. Il proto-oncogene Cbl viene infatti fosforilato dal recettore insulinico e associa con la proteina adattatrice CAP: tale complesso trasloca sulla membrana plasmatica, dove interagisce con altre proteine (CrkII e C3G), inducendo l'attivazione della proteina G TC10 (fig. 4). Tale molecola è coinvolta nel reclutamento del trasportatore di glucosio GLUT-4 sulla

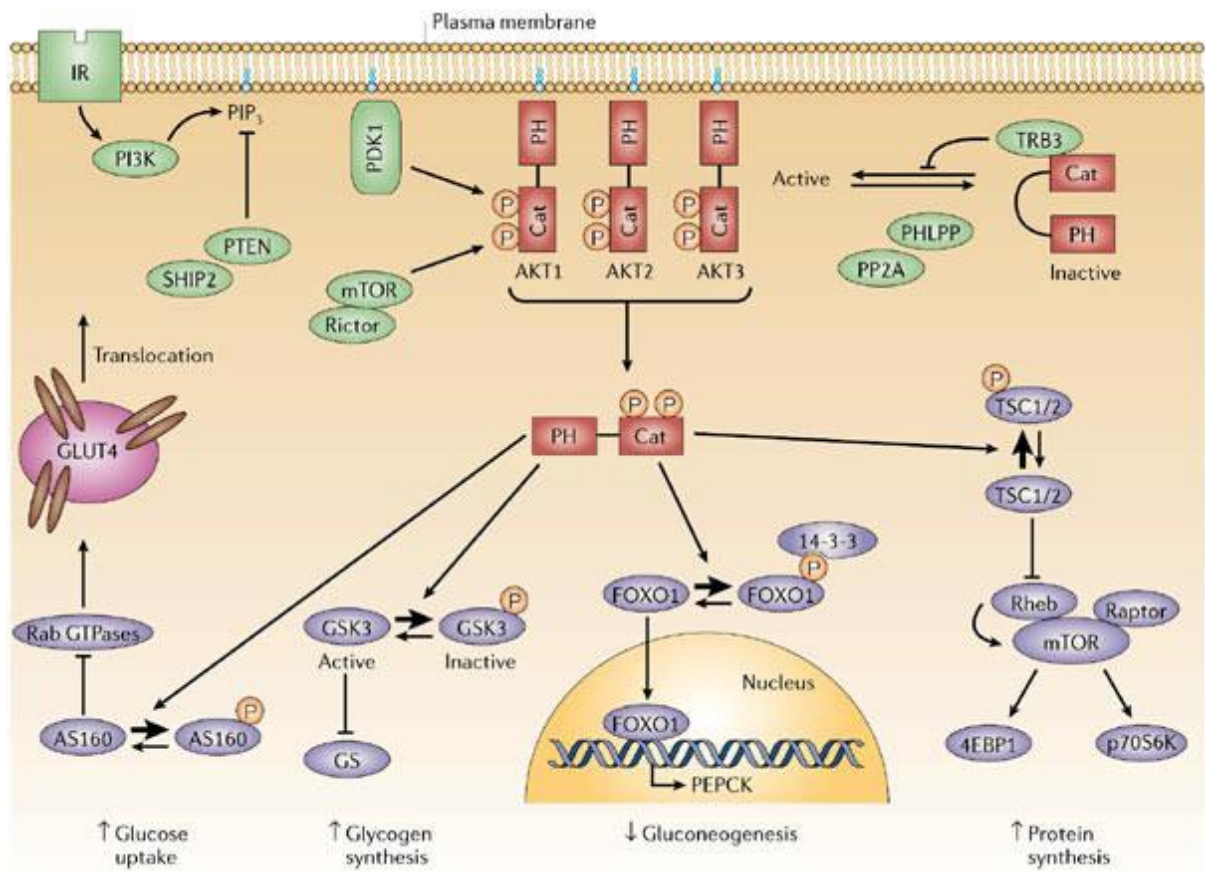


membrana plasmatica, probabilmente mediante la stabilizzazione dei microtubuli di actina che sono necessari per la traslocazione delle vescicole contenenti GLUT4 in membrana e la successiva esocitosi (Eyster *et al.*, 2006; Saltiel & Kahn, 2001; Schinner *et al.*, 2005; Taniguchi *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Funzioni PI3K-dipendenti

L'enzima PI3K è costituito da una subunità regolatoria p85 ed una subunità catalitica p110. In condizioni basali la subunità p85 reprime l'attività della subunità catalitica. 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 (PIP<sub>2</sub>) in fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> è in grado di legare proteine contenenti un dominio PH (*pleckstrin homology*), provocandone la traslocazione sulla membrana plasmatica e l'attivazione (Saltiel & Kahn, 2001; Schinner *et al.*, 2005; Taniguchi *et al.*, 2006). Tra queste proteine, di particolare importanza nel segnale insulinico è la chinasi PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*): tale molecola è in grado di fosforilare Akt sulla tirosina 308, determinandone una parziale attivazione. Per essere completamente attiva, Akt necessita di un'ulteriore fosforilazione in corrispondenza della serina 473 e, poiché PDK1 non è in grado di catalizzare questa modifica, è stata postulata l'esistenza di una PDK2, che recentemente è stata identificata con il complesso mTOR (*mammalian target of rapamycin*)/rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*). La completa attivazione di Akt porta alla fosforilazione di diversi substrati, sia citoplasmatici che nucleari, coinvolti in vari processi metabolici (fig. 5) (Bhaskar & Hay, 2007;

Burgering & Kops, 2002; Lizcano & Alessi, 2002; Saltiel & Kahn, 2001; Taniguchi *et al.*, 2006).



**Figura 5. Via di trasduzione del segnale insulinico PI3K-dipendente.** PI3K produce PIP<sub>3</sub> in risposta all'insulina. PIP<sub>3</sub> recluta sulla membrana plasmatica PDK1 e AKT, dove quest'ultima viene fosforilata da PDK1 e dal complesso mTOR/rictor. I regolatori negativi di tale *pathway* sono rappresentati da PTEN, SHIP2, PP2A, PHLPP e TRB3. I substrati a valle di AKT sono rappresentati in viola. AS160 è un *target* di Akt responsabile della traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT4. GSK3 inibisce la glicogeno sintasi. La forma fosforilata di FoxO1 viene trattenuta nel citoplasma dal legame con le proteine 14-3-3. Il complesso TSC1/2, una volta fosforilato da Akt, non è più in grado di inibire mTOR, che può quindi fosforilare i suoi substrati 4EBP1 e p70S6K (tratto da Taniguchi *et al.*, 2006).

### a) Assorbimento del glucosio

L'enzima PI3K regola l'assorbimento del glucosio 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 delle GTPasi della famiglia Rab, le quali sono coinvolte nella riorganizzazione del citoscheletro, necessaria per la traslocazione di GLUT-4 in membrana (fig. 5). Lo stesso effetto è ottenuto anche tramite l'attivazione PI3K-dipendente delle isoforme atipiche della protein-chinasi C (aPKC), PKC- $\lambda$  e PKC- $\zeta$ . Come per Akt, anche l'attivazione delle aPKC richiede il secondo messaggero lipidico PIP<sub>3</sub> e l'attivazione della PDK1 (Taniguchi *et al.*, 2006).

### **b) La sintesi di glicogeno**

La maggior parte del glucosio assorbito dal circolo sanguigno in seguito alla stimolazione insulinica viene 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 ed impedendo quindi la realizzazione del passaggio finale nella sintesi di glicogeno, la conversione dell'UDP-glucosio in glicogeno. In seguito ad uno stimolo insulinico, Akt fosforila GSK3, la inattiva e quindi, dereprimendo GS, stimola la sintesi del glicogeno (fig. 5). Inoltre l'insulina attiva la GS attraverso l'inibizione di un'altra chinasi, PKA, e mediante l'attivazione della proteina fosfatasi-1 (PP1). (Frame & Cohen, 2001; Lizcano & Alessi, 2002; Saltiel & Kahn, 2001; Schinner *et al.*, 2005).

### **c) La gluconeogenesi, la glicolisi e l'omeostasi lipidica**

L'insulina inibisce la produzione e il rilascio di glucosio dal fegato bloccando la gluconeogenesi e la glicogenolisi. Essa 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  $\beta$ -pancreatiche. FoxO1 viene fosforilato da Akt sulla serina 256 ed interagisce con le proteine 14-3-3, restando così sequestrato nel citoplasma, dove viene ubiquitinato e degradato. Inoltre tale modificazione post-traduzionale ne provoca il distacco dal suo coattivatore PGC-1 $\alpha$  (*PPAR- $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$* ). Questi eventi impediscono l'attivazione dei geni bersaglio di FoxO1, tra cui la glucosio-6-fosfatasi (*G6Pase*), la fruttosio 1-6 bifosfatasi e la fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK), enzimi fondamentali nella gluconeogenesi (fig. 5) (Nakae *et al.*, 2003; Postic & Girard, 2008; Puigserver *et al.*, 2003; Taniguchi *et al.*, 2006). Akt fosforila (in Ser-570) anche PGC-1 $\alpha$ , inibendola; 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, come la FAS (*fatty acid synthase*) e nell'ossidazione degli acidi grassi, come la acetil-CoA carbossilasi (ACC) (Li *et al.*, 2007). Inoltre questa fosforilazione determina il distacco di PGC-1 $\alpha$  dal fattore di trascrizione HNF4 (*hepatic nuclear factor 4*), il quale di conseguenza viene attivato ed induce due enzimi glicolitici, la glucochinasi e la piruvato chinasi. Questo processo rappresenta un meccanismo importante alla base della stimolazione della glicolisi indotta dall'insulina (Schinner *et al.*, 2005).

Come accade per il metabolismo glucidico, l'insulina è in grado di regolare anche la sintesi di acidi grassi (lipogenesi). 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 da questo organo viene utilizzato per la sintesi di acidi grassi. 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 gli enzimi coinvolti nella sintesi degli acidi grassi (*free fatty acids*, FFA), quali ACC (*Acetyl-CoA carboxylase*) e FAS (*Fatty acid synthase*). Tale fattore è anche coinvolto nell'inibizione della lipolisi e nell'esterificazione di FFA in trigliceridi (TG), come descritto in seguito. Inoltre 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).

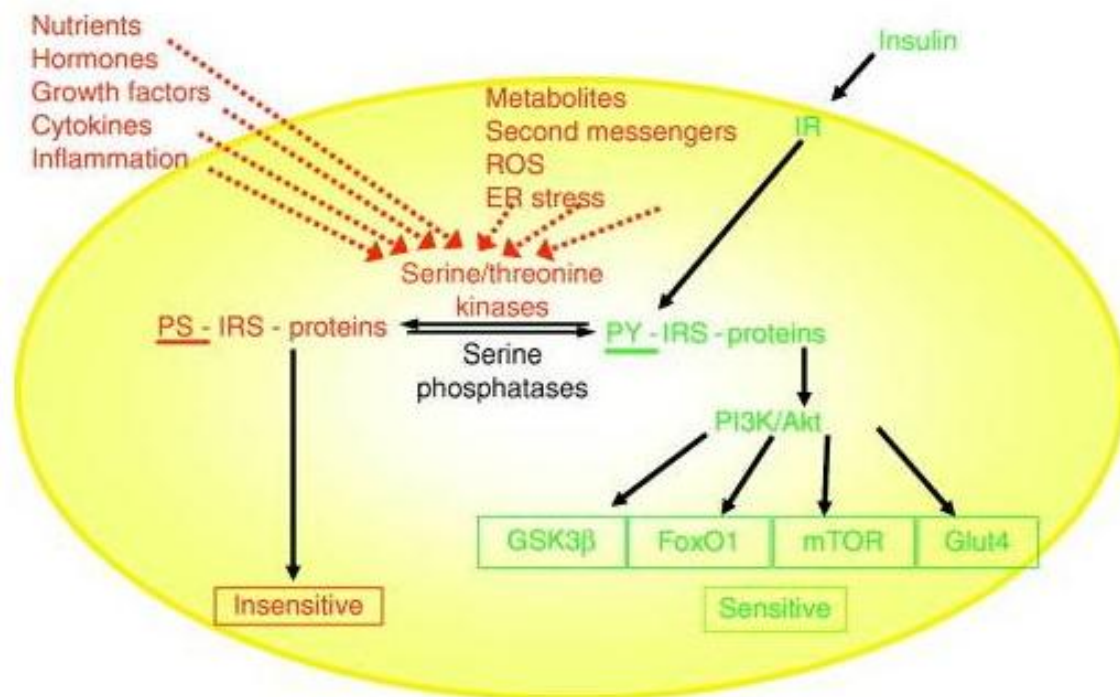
#### **d) mTOR e la sintesi proteica**

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. 5). Akt può inibire TSC2 anche indirettamente, tramite l'inibizione di GSK3; infatti la fosforilazione da parte di tale chinasi è necessaria per attivare TSC2. In condizioni basali, GSK3 fosforila e inibisce anche il fattore eIF2B, che controlla il primo passaggio nella sintesi proteica; l'insulina determina la defosforilazione di eIF2B, stimolando così la traduzione delle proteine. 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 del recettore stesso. Tale endocitosi ha la funzione di avvicinare i recettori negli endosomi e permettere quindi alla loro attività tirosin-chinasica 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 (*protein tyrosine phosphatase 1B*), che interagisce direttamente con IR e defosforila importanti residui tirosinici. Altre proteine, come SOCS1 (*suppressor of cytokine signalling-1*), SOCS3 e Grb10 (*growth-factor-receptor-bound protein 10*) riducono l'attività del recettore.

Un altro meccanismo di spegnimento o attenuazione del segnale insulinico è dato dalla fosforilazione dei substrati del recettore (IRS) su residui di serina e treonina (fig.6). Molte chinasi come ERK, S6 chinasi, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), PKC $\zeta$  (*protein kinase C*) e IKK $\beta$  (*I-kappaB kinase  $\beta$* ) responsabili di tali fosforilazioni, sono attivate dall'insulina, a dimostrazione dell'esistenza di un meccanismo a *feedback* negativo per lo spegnimento del segnale. L'azione insulinica è controllata anche tramite la defosforilazione di PIP<sub>3</sub> 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 inibitorie 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. 5).



**Figura 6. Ruolo della fosforilazione di IRS in serina/treonina nell'azione insulinica.** Stimoli extracellulari ed intracellulari determinano il livello di fosforilazione in serina e treonina delle proteine IRS.

I sopra menzionati meccanismi si 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 recettore, 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; Taniguchi *et al.*, 2006; Zick, 2004)

## **1.4 INFIAMMAZIONE, OBESITA' ED INSULINO-RESISTENZA**

Studi condotti nell'ultimo decennio hanno dimostrato che un'inflammatione cronica di basso grado rappresenta una caratteristica comune a molte disfunzioni metaboliche, come l'insulino-resistenza e l'obesità.

Il lavoro pionieristico di Hotamisligil ha fornito la prima evidenza che una citochina pro-infiammatoria, il TNF $\alpha$ , fosse in grado di indurre insulino-resistenza (Hotamisligil *et al.*, 1993; Uysal, KT *et al.*, 1997). L'espressione di questa molecola risulta infatti aumentata nel tessuto adiposo di topi obesi, che risultano essere anche insulino-resistenti. Inoltre, la somministrazione di TNF $\alpha$  ad animali o cellule in coltura è in grado di interferire con il segnale insulinico, mentre topi obesi privi del TNF $\alpha$  o del suo recettore hanno una migliore sensibilità insulinica rispetto agli animali di controllo. E' quindi evidente che l'aumentata produzione di TNF $\alpha$  da parte del tessuto adiposo, che si realizza in condizioni di obesità, contribuisce in maniera significativa all'instaurarsi di una condizione di insulino-resistenza. Questa idea rivoluzionaria, che una sostanza prodotta dal tessuto adiposo potesse avere effetti sistemici sul metabolismo, fu presto sostanziata dalla scoperta di altre molecole, principalmente citochine pro-infiammatorie e chemochine, responsabili dell'instaurarsi di quello stato infiammatorio cronico di basso grado che è associato all'insulino-resistenza e all'obesità.

### **1.4.1 L'insulino resistenza**

Le fosforilazioni in serina e treonina delle proteine IRS, oltre a costituire un meccanismo fisiologico di spegnimento del segnale insulinico, sono anche coinvolte in diversi processi patologici che inducono uno stato d'insulino-resistenza, ovvero una condizione in cui i tessuti bersaglio non sono più in



grado di rispondere ai livelli normali d'insulina in circolo (fig. 6) (Zick, 2004). Negli stadi precoci d'insulino-resistenza, viene mantenuta una normale glicemia grazie a processi adattativi che avvengono nelle cellule  $\beta$ -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. Col perdurare di questa situazione però nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche insorgono delle disfunzioni che riducono la secrezione d'insulina, che seppur ancora piuttosto elevata non è più in grado di compensare l'insulino-resistenza. La conseguente iperglicemia, in concomitanza con l'accumulo di FFA (*free fatty acid*) nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche, dovuto alla mancata azione inibitoria dell'insulina, ne comporta infine l'apoptosi. La conseguente scarsità delle cellule  $\beta$ -pancreatiche compromette ulteriormente la secrezione insulinica, inducendo un ulteriore aumento delle concentrazioni glicemiche in circolo.

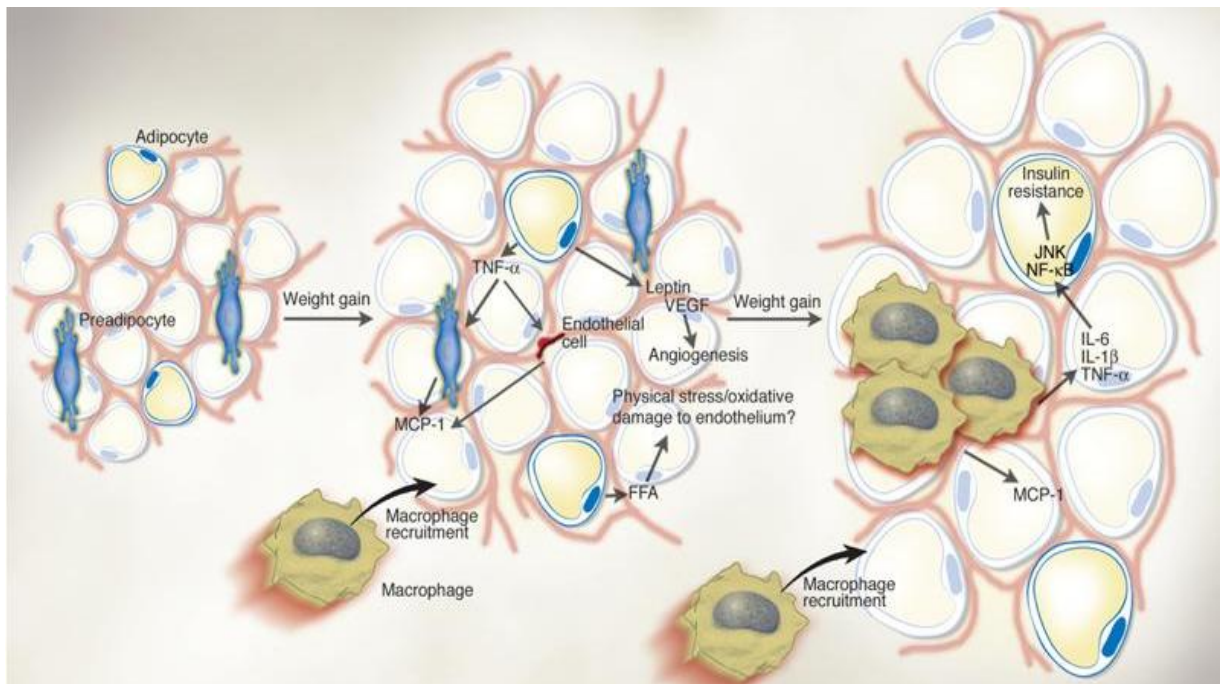
Sebbene diversi fattori, quali ad esempio la suscettibilità genetica e lo stile di vita, possano influire nella patogenesi dell'insulino-resistenza, è ormai appurato che l'instaurarsi di uno stato infiammatorio cronico svolge un ruolo determinante in tale processo.

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

Come accennato prima, esistono diversi mediatori di infiammazione che agiscono in maniera interdipendente, cooperando nel determinare l'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 acidi grassi liberi (FFA) nello stato di digiuno. Gli FFA rilasciati in circolo vengono poi trasportati nei tessuti bersaglio, ossidati nei mitocondri e utilizzati come fonte energia (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 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, come MCP-2 e RANTES, nonché i recettori per tali molecole, come Ccr2 e Ccr5, che contribuiscono ad un ulteriore richiamo di macrofagi nel tessuto adiposo in espansione. Inoltre producono TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis factor- $\alpha$* ) e diverse citochine, come l'interleuchina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e l'interleuchina 6, che avviano e amplificano una risposta infiammatoria (Guilherme *et al.*, 2008; Tilg & Moschen, 2006). Oltre alle citochine pro-infiammatorie, anche altre sostanze prodotte principalmente dagli adipociti, e perciò definite adipochine, come la leptina, l'adiponectina e la resistina, possono regolare la risposta infiammatoria che si instaura in condizioni di obesità (Tilg & Moschen, 2006).



**Figura 7. Il tessuto adiposo e l'infiammazione.** Il tessuto adiposo obeso è caratterizzato da infiammazione e da una progressiva infiltrazione di macrofagi man mano che l'obesità aumenta. Gli adipociti cominciano a secernere bassi livelli di  $TNF\alpha$  che può stimolare i preadipocititali a produrre MCP-1 e a richiamare altri macrofagi nel tessuto adiposo. L'aumento nella secrezione di leptina, insieme alla diminuzione nella produzione di adiponectina da parte degli adipociti può anche contribuire al reclutamento di macrofagi. (tratto da Tilg & Moschen, 2006).

Sia il  $TNF\alpha$  e le altre citochine infiammatorie, che gli FFA e i suoi metaboliti, quali diacilglicerolo (DAG) e ceramidi, attivano una cascata di chinasi, come  $PKC\theta$  (*protein kinase C theta*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e  $IKK-\beta$  (*I kappa B kinase beta*), che, come descritto prima, fosforilano la proteina IRS-1 in residui di serina o treonina, impedendone la fosforilazione in tirosina e quindi inibendo il segnale insulinico (fig. 6). Gli acidi grassi contribuiscono all'insulino-resistenza anche attraverso l'attivazione dei recettori TLR (*Toll-like receptors*), che sono 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  $IKK-\beta$  causa anche l'ulteriore induzione

di molecole infiammatorie, come il TNF $\alpha$  stesso, 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; Yu *et al.*, 2002)

Va comunque ricordato che i lipidi intracellulari possono anche avere un ruolo antiinfiammatorio. 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'insulinoresistenza (Wellen & Hotamisligil, 2005).

## **b) Stress del Reticolo Endoplasmatico (ER)**

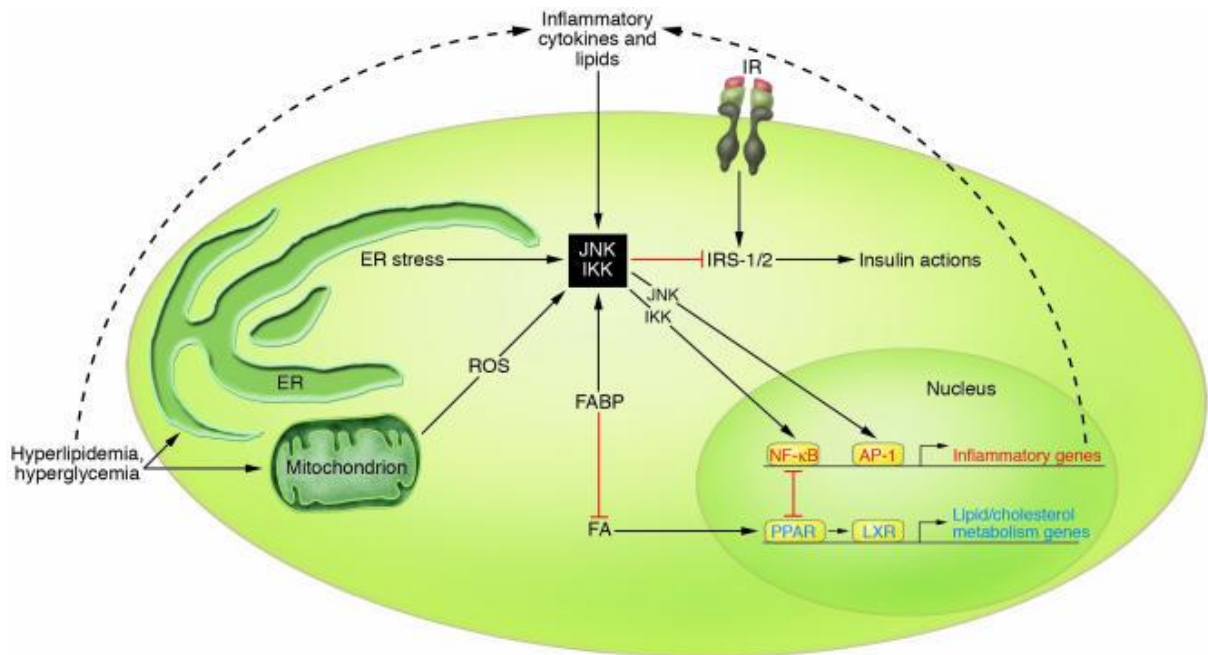
Negli organismi eucariotici tutte le proteine secretorie passano nel reticolo endoplasmatico (ER), dove vengono ripiegate assumendo la loro struttura tridimensionale, in un processo detto *folding*, ed assemblate in complessi, prima di essere trasportate nel Golgi. Il reticolo endoplasmatico può essere 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, ed agisce da sensore dello stress metabolico, inducendo poi una conseguente risposta infiammatoria.

L'aumento di adiposità nei soggetti obesi sovraccarica 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*), volta a ristabilire l'integrità funzionale di tale organello citoplasmatico. Se il difetto di *folding* proteico non è risolto avviene un'attivazione cronica di UPR, la quale induce apoptosi. Inoltre lo stress dell'ER è coinvolto nell'induzione d'insulino-resistenza tramite l'attivazione di JNK e IKK- $\beta$  (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 $\alpha$  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- $\beta$  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; Houstis *et al.*, 2006; Nishikawa & Araki, 2007; Qatanami & Lazar, 2007).



**Figura 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 nei 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 (tratto da Wellen & Hotamisligil, 2005).

#### **d) Disfunzioni mitocondriali**

L'insulino-resistenza ed il diabete sono stati associati anche con una diminuzione delle funzioni mitocondriali: in particolare, è stata osservata una ridotta espressione di PGC-1 e NRF-1 nel muscolo scheletrico di soggetti obesi, alla quale è associata una diminuzione nell'ossidazione degli acidi grassi e nella sintesi di ATP. 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 (Qatanani & Lazar, 2007).

#### **e) Altri mediatori di infiammazione: SOCS ed iNOS**

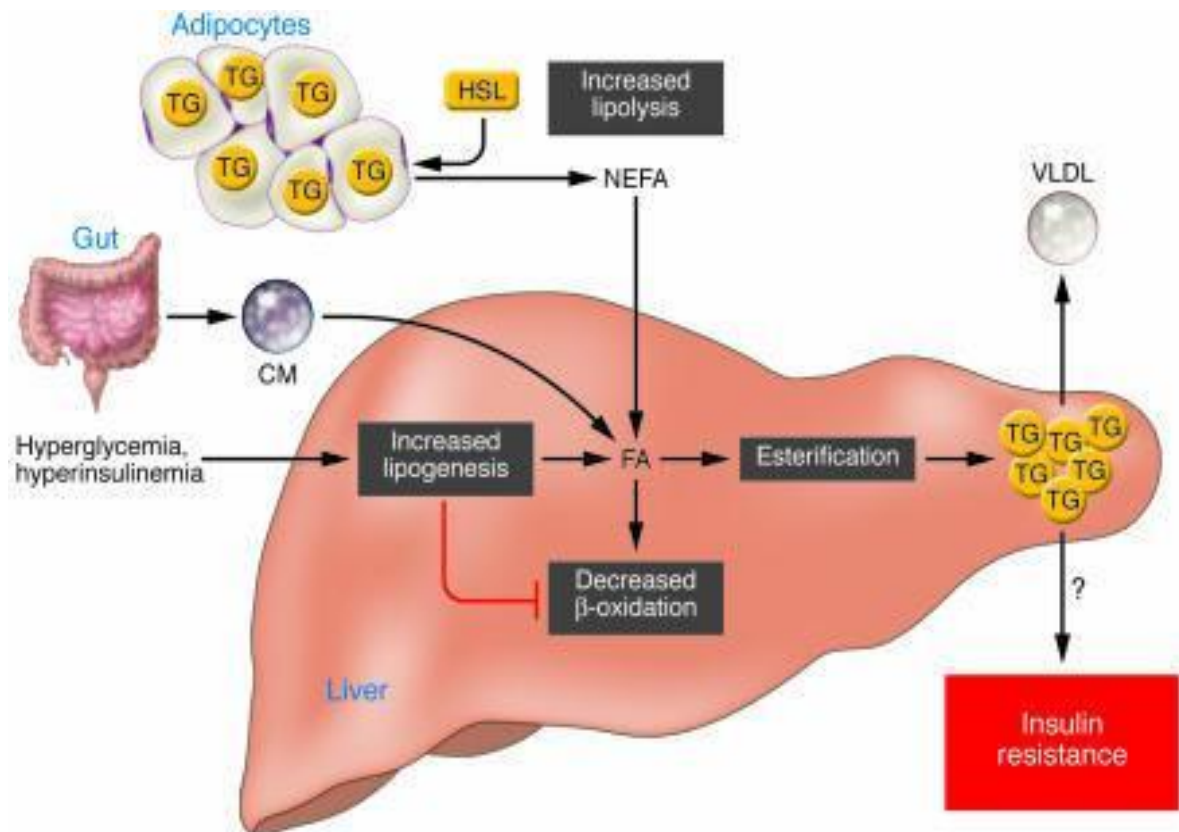
Oltre ai *pathway* dipendenti dalle serin/treonin chinasi, ci sono altri fattori che contribuiscono all'insulino-resistenza indotta da infiammazione. Per esempio almeno 3 membri della famiglia di proteine SOCS (*soppressor of cytokine signalling*), SOCS-1, -3 e -6, sono coinvolti nell'inibizione della fosforilazione in tirosina di IRS-1 e -2 o nella loro degradazione ad opera del proteosoma. 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 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , induce l'espressione di una o più SOCS in maniera tessuto-specifica. La stimolazione di citochine infiammatorie può anche causare l'induzione dell'ossido nitrico sintetasi (iNOS) e quindi la sovrapproduzione di ossido nitrico (NO), coinvolta nell'inibizione sia dell'azione insulinica nel muscolo che della funzionalità delle  $\beta$ -cellule pancreatiche. Inoltre la sovraespressione di iNOS nel fegato è stata anche 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

Oltre al tessuto adiposo, anche il metabolismo epatico subisce modificazioni sostanziali in un contesto di obesità. L'insulino-resistenza da sola o in associazione al diabete è una delle cause che può indurre NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*), la cui caratteristica principale è l'accumulo di trigliceridi (TG) negli epatociti. La stretta associazione che intercorre tra obesità, insulino-resistenza e NAFLD ha portato a considerare quest'ultima patologia come la manifestazione epatica della sindrome metabolica.

Diversi meccanismi contribuiscono ad aumentare la quantità di TG presenti nel fegato. In condizioni normali, 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 loro 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. Inoltre la condizione di iperinsulinemia e iperglicemia stimola anche la sintesi epatica di acidi grassi, rispettivamente tramite l'attivazione di SREBP-1c e ChREBP (*carbohydrate response element-binding protein*) (Pessayre, 2007), come descritto in seguito. Inoltre l'iperinsulinemia induce anche la riduzione della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, l'aumento della loro esterificazione a TG e una ridotta secrezione di VLDL (*very low density lipoprotein*) dipendente da quest'ultimi (fig.9). L'insieme di queste alterazioni ha come conseguenza l'accumulo di trigliceridi nel fegato e quindi la comparsa di steatosi.

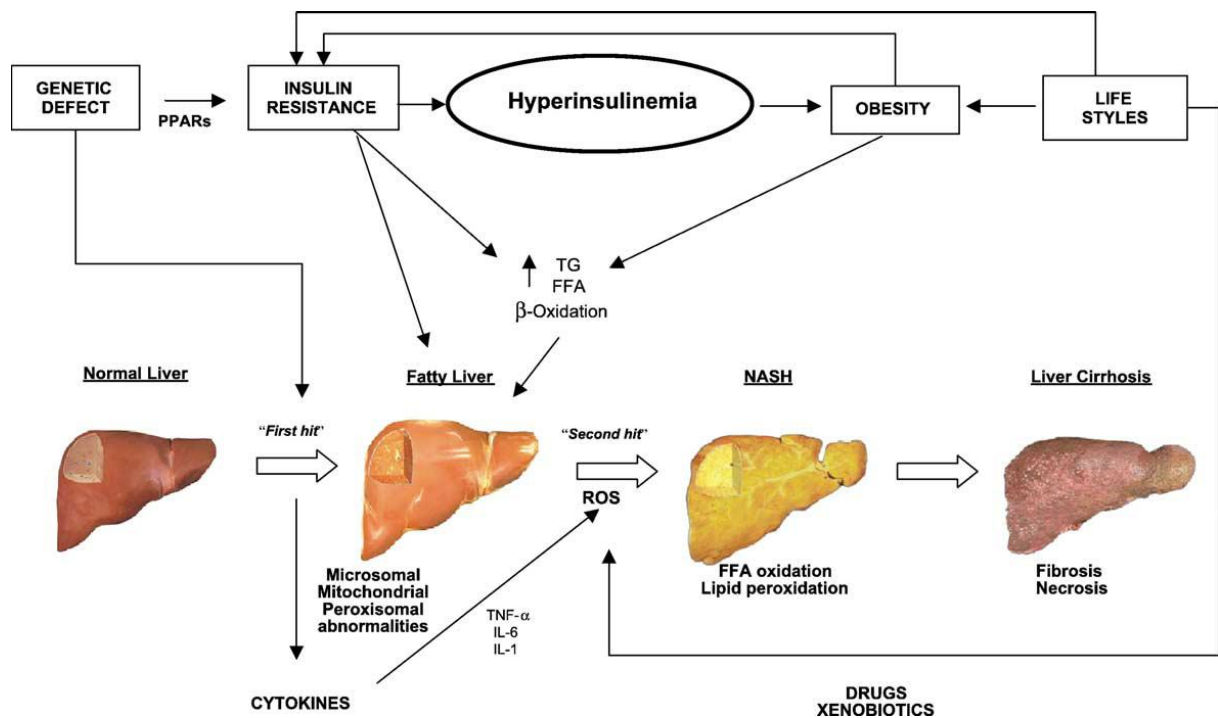




**Figura 9. Meccanismi d'induzione della steatosi epatica.** Differenti fonti di FFA contribuiscono all'induzione della steatosi epatica. L'insulino-resistenza causa la mancata inibizione di HSL da parte dell'insulina e quindi l'aumentato rilascio di FFA dal tessuto adiposo e un incremento del loro assorbimento 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  $\beta$ -ossidazione e la secrezione di VLDL. NEFA, *non-esterified fatty acid* (tratto da Postic & Girard, 2008).

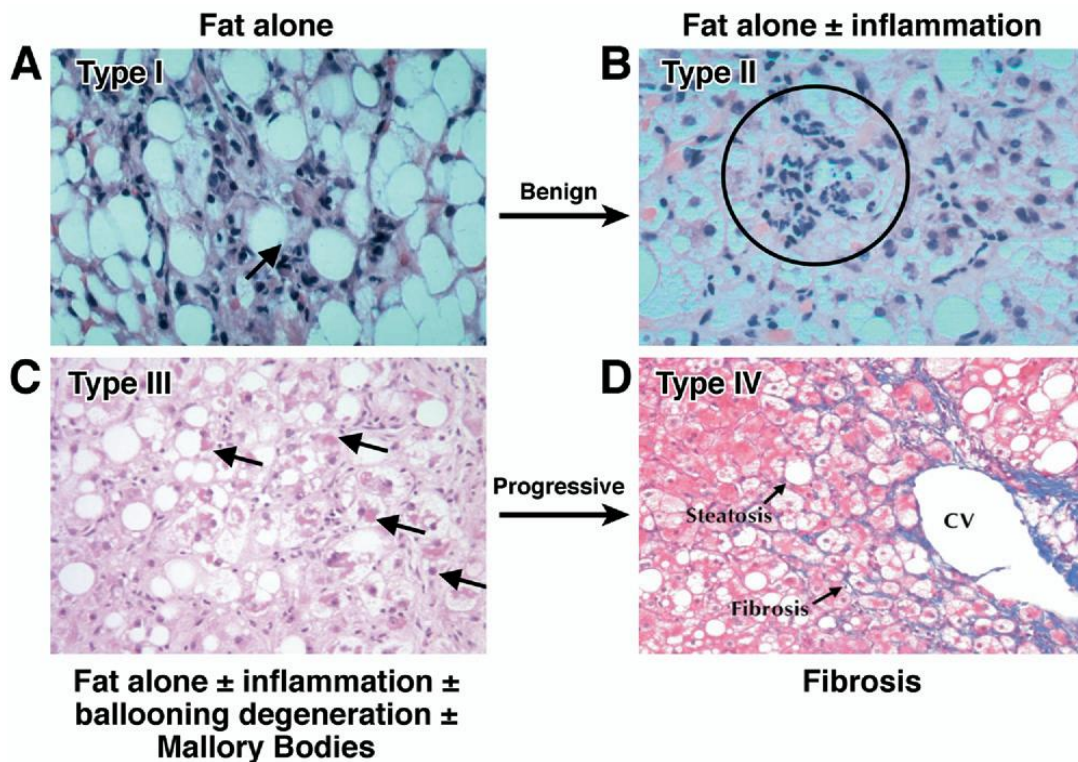
Eventi secondari possono in alcuni casi far progredire la steatosi epatica in steatoepatite (NASH, *non-alcoholic steatohepatitis*), fibrosi e cirrosi (fig. 10).

Sicuramente i meccanismi responsabili di questa progressione 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).



**Figura 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 (tratto da Portincasa *et al.*, 2005).

L’azione lipotossica degli FFA e dei loro metaboliti lipidici, infatti, altera la funzionalità dei mitocondri, determinando un aumento nella produzione di ROS, e porta anche all’attivazione di una risposta infiammatoria da parte delle cellule di Kupffer. Lipidi e citochine interferiscono con il segnale insulinico, e questo contribuisce alla riduzione dell’assemblaggio e della secrezione delle VLDL attraverso un’alterata regolazione dei fattori di trascrizione che controllano la lipogenesi. Le citochine infiammatorie prodotte dalle cellule di Kupffer attivate stimolano le cellule stellate (HSCs, *hepatic stellate cells*) a produrre grandi quantità di collagene, che determinano l’instaurarsi di uno stato fibrotico (fig. 11)



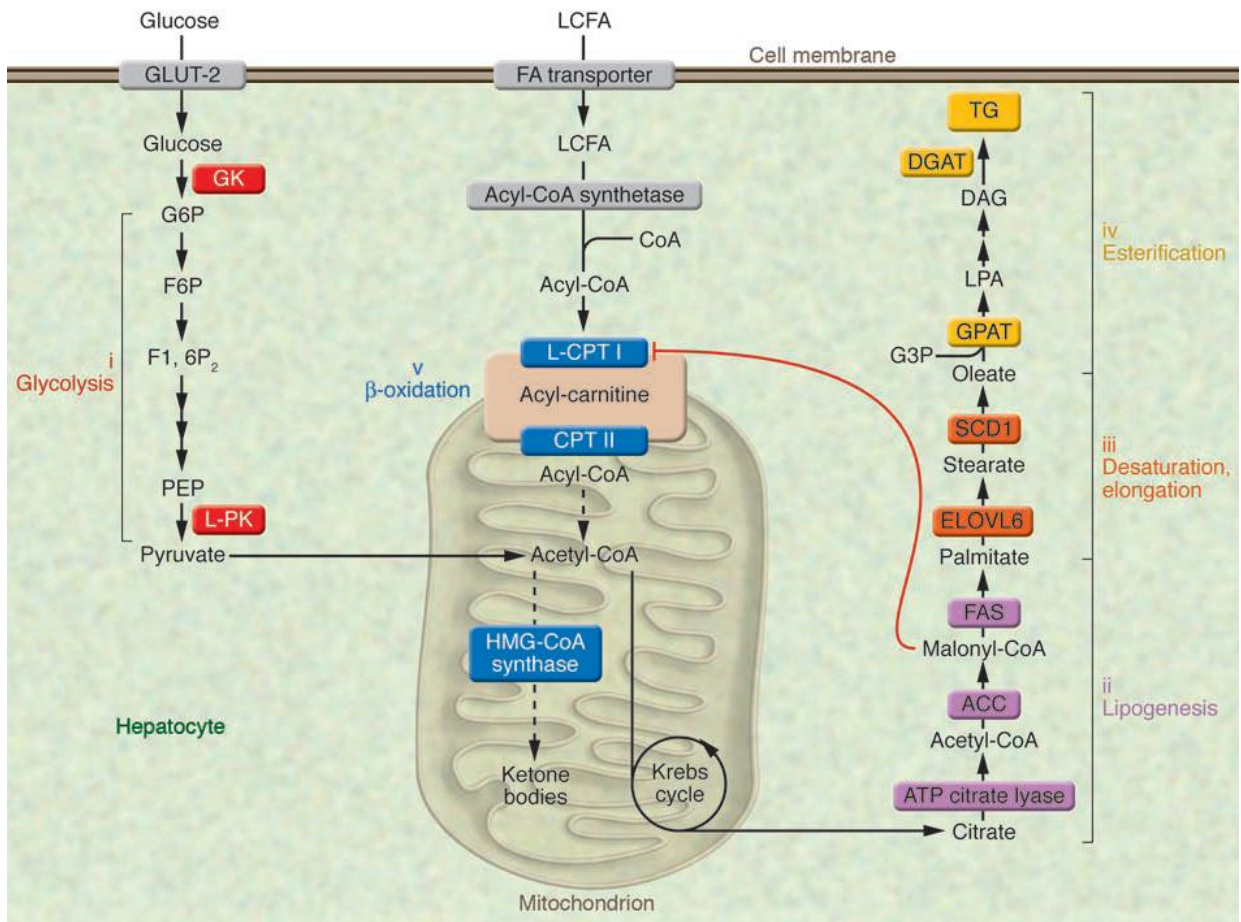
**Figura 11. Progressione della NAFLD.** A) Steatosi: la freccia indica l'accumulo di trigliceridi negli epatociti; B) infiltrazione di leucociti polimorfonucleati che può causare infiammazione e steatoepatite; C) degenerazioni balloniformi e perdita di steatosi che indicano un danno profondo; D) la presenza di fibrosi pericellulare e pericentrale indica una steatoepatite grave che molto probabilmente evolverà in cirrosi. Ingrandimento 200x (tratto da Parech & Anania, 2007).

### 1.5.1. Regolazione della sintesi di trigliceridi nel fegato

L'eccessivo accumulo di grassi nel fegato caratteristico della NAFLD può essere dovuto ad un aumento dell'assorbimento o della loro sintesi, ad una diminuzione della loro ossidazione, o ad una ridotta secrezione di tali sostanze sotto forma di VLDL. Tuttavia è stato dimostrato che i primi due processi, assorbimento e sintesi, giocano un ruolo preponderante nella NAFLD.

La sintesi di trigliceridi (TG) nel fegato è regolata nutrizionalmente, e la loro formazione a partire da glucosio o altri carboidrati semplici richiede una serie di complesse trasformazioni biochimiche che comprendono la glicolisi per generare l'acetil-coenzima A (acetil-CoA), la sintesi, l'elongazione e la

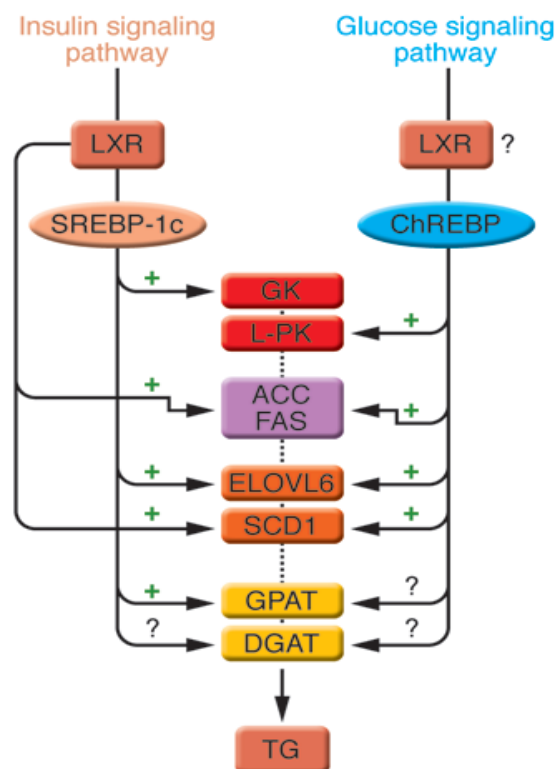
desaturazione degli acidi grassi, l'esterificazione di questi ultimi col glicerolo ed infine l'impacchettamento in lipoproteine per l'esporto (fig. 12).



**Figura 12. Sintesi dei trigliceridi nel fegato.** La sintesi di trigliceridi nel fegato è regolata dall'apporto di nutrienti. Una dieta ricca in carboidrati determina l'induzione degli enzimi coinvolti in questo *pathway* metabolico, come (i) la glucochinasi (GK) e la piruvato chinasi epatica (L-PK) per la glicolisi, (ii) l'ATP citrato liasi, l'acetil-CoA carbossilasi (ACC) e la sintetasi degli acidi grassi (FAS, *fatty acid synthetase*) per la lipogenesi, (iii) l'elongasi 6 (ELOVL6, *long chain fatty acid elongase*) e la stearil-CoA desaturasi (SCD1, *stearoyl-CoA desaturase*) per l'allungamento e la desaturazione della catena degli acidi grassi, e (iv) la glicerolo-3-fosfato aciltrasferasi (GPAT, *glycerol-3-phosphate O-acyltransferase*) e la diacilglicerolo aciltrasferasi (DGAT, *diacylglycerol acyltransferase*) per la sintesi dei trigliceridi. In queste condizioni, un aumento delle concentrazioni di malonil-CoA, il prodotto dell'enzima lipogenico ACC, inibisce la carnitina O-palmitoiltrasferasi I epatica (L-CPT I), l'enzima limitante per la β-ossidazione (v), che regola il passaggio degli acil-CoA a catena lunga dal citoplasma ai mitocondri, e spostando così l'equilibrio dal *pathway* di ossidazione (con formazione di corpi chetonici) a quello di esterificazione (che porta alla sintesi dei trigliceridi). Abbreviazioni: F6P, fruttosio-6-fosfato; F1,6P2, fruttosio-1-6 bisfosfato; G3P, glicerolo 3-fosfato; G6P, glucosio 6-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; LCFA, *long chain fatty acids*; CPT II, carnitina O-palmitoiltrasferasi II (tratto da Postic & Girard, 2008).



Gli enzimi che catalizzano tutte queste reazioni possono essere strettamente regolati da modificazioni post-traduzionali e da meccanismi allosterici, ma soprattutto grazie alla modulazione del loro tasso di trascrizione. I principali fattori di trascrizione responsabili di questa regolazione sono SREBP-1c (*sterol responsive element binding protein 1c*), LXRs (*liver X receptors*) e ChREBP1 (*carbohydrate responsive element binding protein 1*) (fig.13)



**Figura 13. Controllo trascrizionale degli enzimi responsabili della sintesi di trigliceridi.** Sia l'insulina che il glucosio regolano la sintesi di trigliceridi, attraverso i fattori di trascrizione SREBP-1c e ChREBP, rispettivamente. Anche LXR è un regolatore della sintesi di trigliceridi attraverso l'attivazione trascrizionale diretta di ACC, FAS e SCD1, ma anche indirettamente tramite l'attivazione di SREBP-1c e ChREBP (tratto da Postic & Girard, 2008).

SREBP1c media gli effetti dell'insulina sulla sintesi del colesterolo e dei trigliceridi. Sono sotto il suo controllo trascrizionale gli enzimi ACC, FAS, SCD1, ELOVL6 e GPAT. In presenza di una severa insulino-resistenza, l'insulina stimola

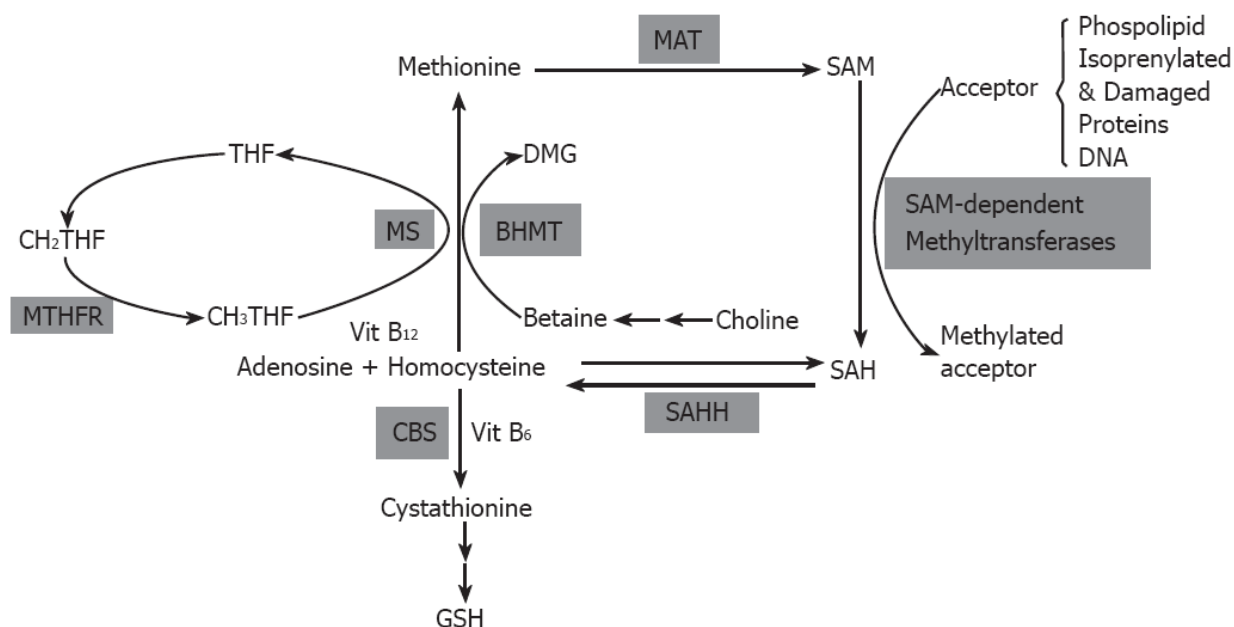
la trascrizione di SREBP-1c nel fegato, che porta ad un aumento nella neosintesi di acidi grassi (Malaguarnera et al., 2009; Postic and Girard, 2008).

Oltre a SREBP-1c, anche i fattori di trascrizione della famiglia LXR regolano l'espressione di enzimi come FAS, ACC e SCD1, ma sono anche necessari per il controllo di SREBP-1c da parte dell'insulina. Tuttavia, l'attivazione di SREBP1c da sola non è in grado di spiegare la stimolazione dell'espressione genica da parte dei carboidrati; inoltre l'induzione di L-PK (*liver pyruvate kinase*), uno degli enzimi chiave della glicolisi, è dipendente solo dal glucosio e non è soggetto a regolazione da parte di SREBP-1c. Di recente è stato identificato un altro fattore di trascrizione, ChREBP, che viene regolato in maniera specifica dal glucosio; in particolare, esso promuove la sua traslocazione dal citoplasma nel nucleo, dove ChREBP può legare ed attivare i promotori di geni coinvolti nella glicolisi e nella lipogenesi, come L-PK, ACC, FAS, ELOV6 e SCD1. Anche ChREBP è sotto il controllo di LXR, che si pone quindi al crocevia tra i segnali attivati dall'insulina e quelli regolati dal glucosio (Postic & Girard, 2008).

### **1.5.2. 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. La metionina viene convertita in una molecola ad alta energia, S-adenosilmetionina (SAM), in una reazione catalizzata dalla metionina adenosiltransferasi (MAT) (fig.14). 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 convertita in S-adenosilomocisteina (SAH). Le transmetilazioni sono

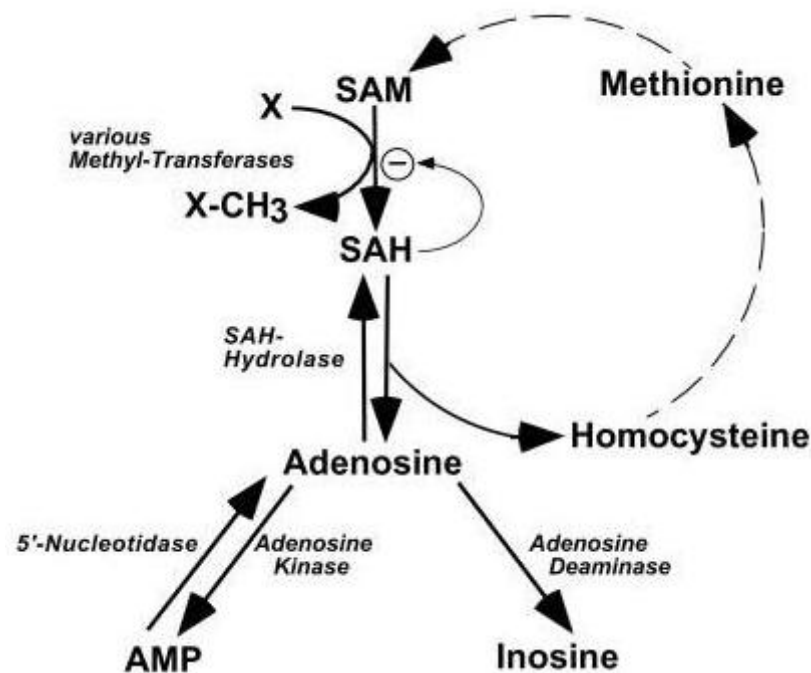
regolate negativamente sia da un aumento di SAH che da una riduzione di SAM o del rapporto SAM/SAH. Pertanto la rimozione di SAH ha un ruolo essenziale ed è mediata dall'enzima SAHH (*SAH hydrolase*), in grado di convertire tale molecola in omocisteina (Hcy) e adenosina (Ado). Sebbene dal punto di vista termodinamico venga favorita la sintesi di SAH, in vivo la reazione procede nella direzione dell'idrolisi se i prodotti finali, Hcy e Ado, vengono rimossi rapidamente (Lieber & Packer, 2002; Lu, 2000; Lu *et al.*, 2002). ADK (*Adenosine kinase*) è il principale enzima responsabile della rimozione di adenosina nel fegato (fig. 15)(Boison *et al.*, 2002).



**Figura 14. Metabolismo della metionina nel fegato.** MS, *methionine synthase*; MTHFR, *5, 10 methylene tetrahydrofolate reductase*; BHMT, *betaine-homocysteine methyltransferase*; CBS, *cystathionine β-synthase* (tratto 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 ( $\text{CH}_3\text{THF}$ ) o dalla betaina (metabolita della colina) (fig. 14) (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 glutatione, anche dal livello di espressione dell'enzima MAT (Lu, 2000).



**Figura 15. 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 (tratto da Boison *et al.*, 2002).

Inoltre esistono due importanti enzimi che, regolando il ciclo futile di SAM, ne garantiscono l'omeostasi ed impediscono che un aumentato rapporto SAM/SAH induca delle reazioni di metilazione aberranti e quindi delle patologie, quali l'epatocarcinoma. Tali proteine 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. 14) (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).

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;).

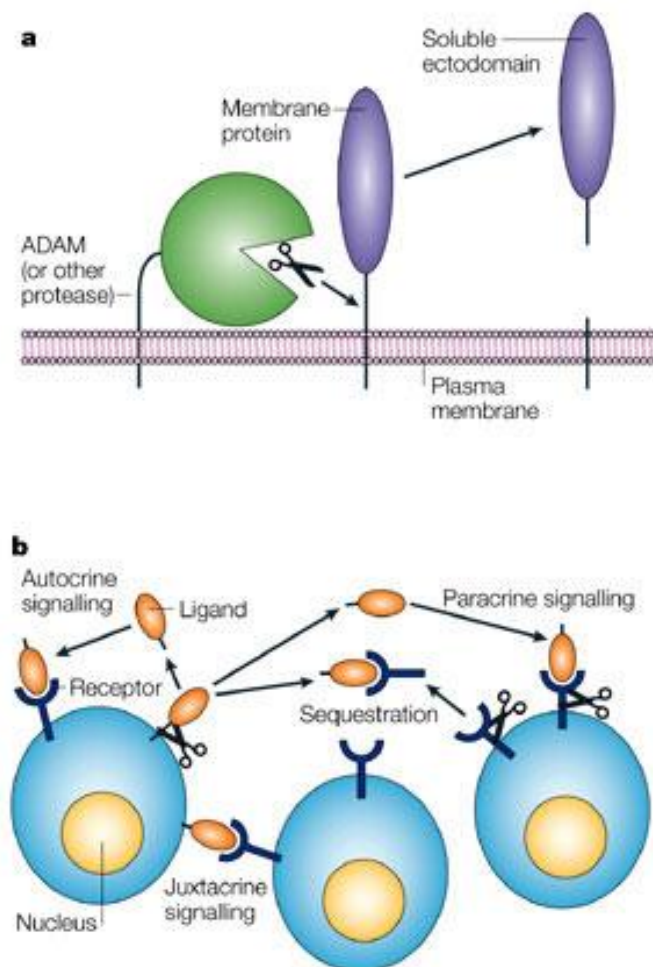
## 2. METALLOPROTEASI

La risposta infiammatoria viene attivata in maniera rapida, ma allo stesso modo deve essere terminata velocemente quando non è più necessaria, per evitare che diventi dannosa. Molti segnali infiammatori sono orchestrati all'interno dei tessuti nello spazio extracellulare, dove mediano l'infiltrazione dei leucociti, la coagulazione, la distruzione della matrice extracellulare e dei tessuti. Tutti questi processi sono mediati da proteasi; in particolare le metalloproteasi di matrice (MMP, *matrix metalloproteinases*) regolano la degradazione della matrice extracellulare ed il rimodellamento tissutale. Strettamente correlate alle MMP sono altre due famiglie di proteasi, le ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) che risiedono nella membrana plasmatica, e le ADAMTS (*ADAM with thrombospondin domain*) che vengono invece secrete nello spazio extracellulare. Recentemente è stato dimostrato che MMP ed ADAM possono tagliare, oltre a componenti della matrice extracellulare, anche citochine, chemochine, molecole di adesione, fattori di crescita e i loro recettori, e sono quindi dei regolatori fondamentali dei processi infiammatori e delle patologie ad essi correlate (Mohammed *et al.*,2003).

### 2.1. *Shedding*

Una piccola percentuale (2-4%) delle proteine di membrana possono essere tagliate proteoliticamente nella loro regione juxtamembrana attraverso un meccanismo denominato *shedding* che 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

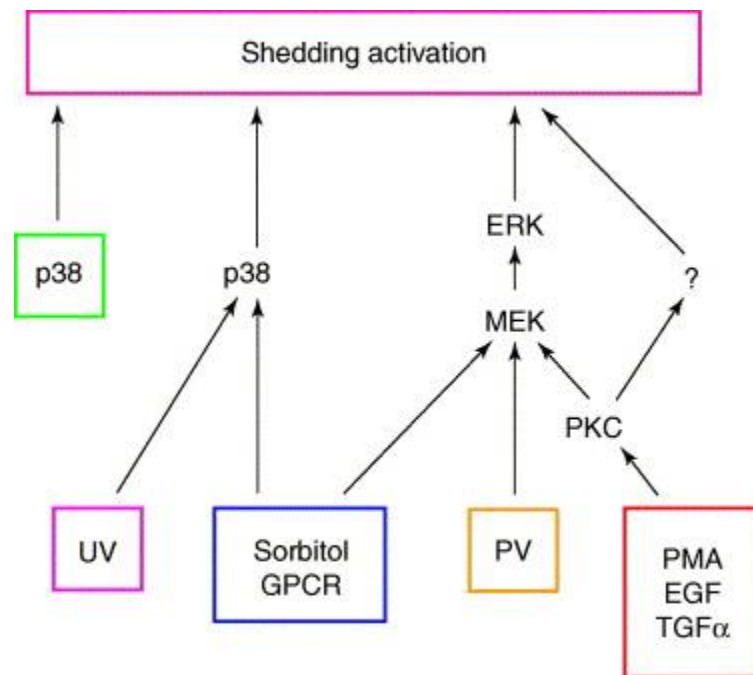
maniera paracrina, anziché solo in maniera autocrina o juxtacrina. Inoltre anche alcuni recettori possono subire *shedding* ed essere di conseguenza attivati oppure inibiti. Infine il taglio dell'ectodominio di proteine recettore può far sì che i suoi ligandi vengano sequestrati e quindi inibiti (fig. 16) (Blobel, 2005).



**Figura 16. 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 (tratto 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. 17).

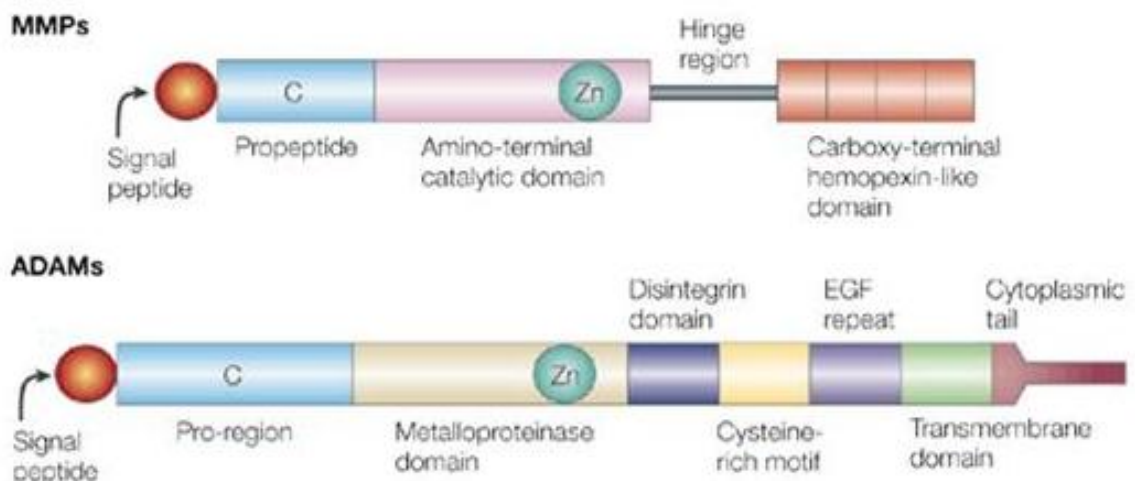


**Figura 17. I pathway MAPK-dipendenti attivano lo *shedding*.** La stimolazione associata al PMA può essere mediata da PKC anche indipendentemente da ERK, attraverso meccanismi non ancora identificati. PV, pervanadato; PMA, *phorbol myristate acetate*; EGF, *epidermal growth factor*; TGF $\alpha$ , *transforming growth factor  $\alpha$* ; PKC, *protein kinase C*; MEK, MAPK/ERK kinase; ERK, *extracellular signal-regulated kinase* (tratto da Huovila et al., 2005).

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

Borrato, 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. 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 (fig. 18).



**Figura 18. 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 (tratto da Yong *et al.*, 2001).

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

**Tabella 1. Substrati e regolazione delle proteine ADAM.** La lettera C indica lo shedding costitutivo, R quello regolato. Abbreviazioni: APP, *amyloid precursor protein*; BACE,  *$\beta$ -site PP-cleaving enzyme*; CD, *cluster of differentiation*; CHL1, *close homologue of L1*; CXCL/CX3CL, *chemokine ligand*; DPANSAIDs, *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.

## 2.2. ADAM-17/TACE

Adam-17 fu la prima proteina ADAM implicata nello *shedding*, identificata come responsabile del rilascio del TNF $\alpha$  solubile (sTNF $\alpha$ ) e per questo denominata anche TACE (*Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme*). Il TNF $\alpha$  infatti è sintetizzato come un precursore (proTNF $\alpha$ ) di 26 kDa ancorato alla membrana e solo successivamente processato nella forma matura solubile da 17 kDa. Il pro-TNF $\alpha$  e il sTNF $\alpha$  hanno effetti fisiologici distinti, mediati da due diversi recettori, rispettivamente TNFR2 (p75) e TNFR1 (p55). TACE 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 $\alpha$ . Infatti se da un lato il TNF $\alpha$  solubile 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 $\alpha$ , riducendo così i suoi effetti sistemici (Aderka, 1996). Per quanto riguarda la regolazione di TACE, essa si attua a livelli diversi. In primo luogo questa proteasi subisce una modulazione trascrizionale, ed esempio viene sovra regolata in seguito ad una risposta infiammatoria, ed inoltre è espressa differenzialmente in diversi tessuti e nei vari stadi di sviluppo. TACE 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 maniera diversa questa proteasi. Inoltre TACE è attivata a livello post-traduzionale attraverso la rimozione del suo pro-dominio ad opera di pro-proteine convertasi.

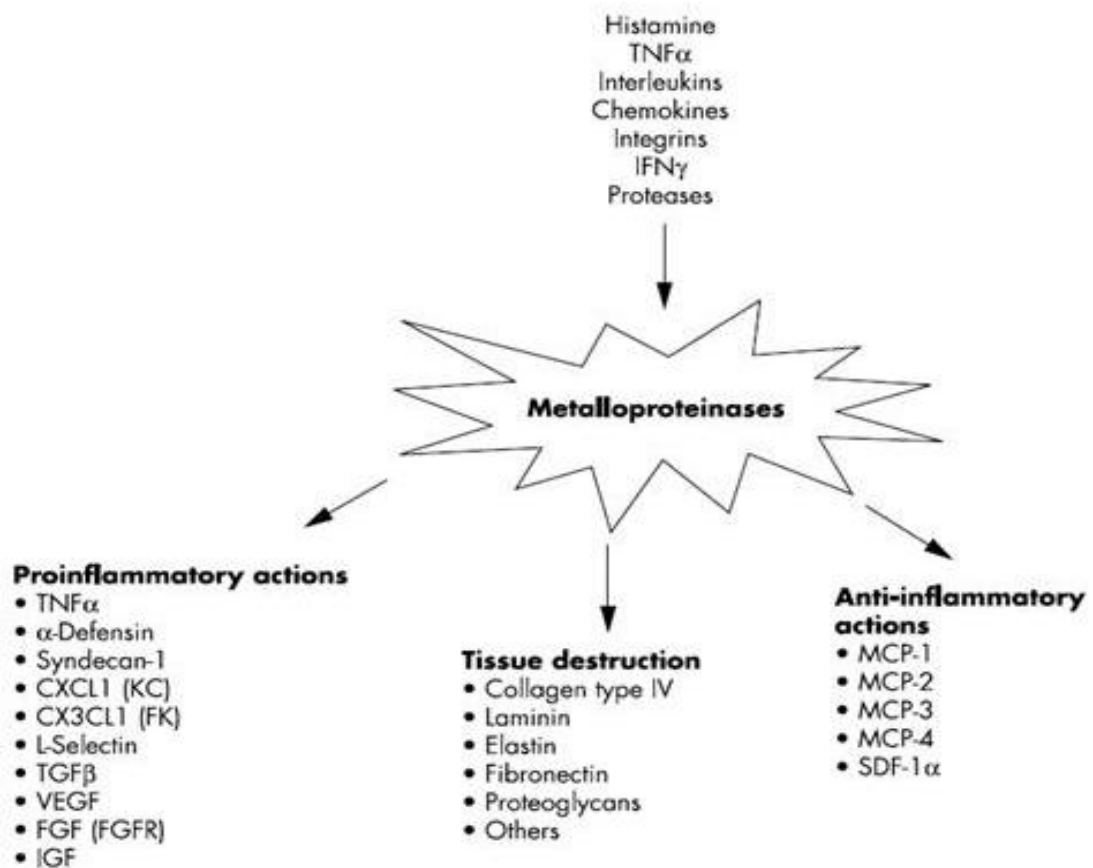
Anche la stabilità di tale proteina può essere modulata, infatti sebbene il PMA in tempi brevi ne stimoli l'attività (fig. 17), successivamente ne provoca l'internalizzazione e degradazione. Sembrerebbe che la produzione di ROS sia coinvolta nell'attivazione di *shedding* indotta da PMA e più in generale sia le specie di ossigeno reattive che l'ossido nitrico (oltre agli induttori menzionati nella fig. 17) sembrano avere un ruolo nell'attivazione di TACE. Infine tale enzima è regolato dall'inibitore tissutale di metalloproteasi 3 (Timp-3), che ne rappresenta l'unico inibitore fisiologico (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 questi processi si attuano all'interno del citoplasma, probabilmente in maniera dipendente dal contesto cellulare e dal tipo 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'infiammazione, 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 di alcuni substrati di TACE come TNF $\alpha$ , sTNFR1 e sIL6R. Inoltre nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che l'aploinsufficienza di TACE



conferisce una parziale protezione nei confronti dell'insulino-resistenza e dell'infiammazione indotta da una dieta ricca di grassi, in parte come conseguenza di un effetto positivo sulla plasticità del tessuto adiposo ed in parte attraverso la modulazione di diversi fattori come l'adiponectina, UCP-1 (*uncoupling protein1*), GLUT4 e AMPK (*AMP kinase*) (Serino *et al.*, 2007).

### **2.3. Metalloproteasi di matrice (MMP)**

Come abbiamo detto prima, le metalloproteasi di matrice appartengono, insieme alle proteine ADAM, alla stessa superfamiglia di metalloendopeptidasi zinco-dipendenti, caratterizzata dalla struttura del loro dominio catalitico (fig. 18). Altro elemento in comune tra le due famiglie è 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 vengono indotte 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 matrice extracellulare, hanno un ruolo attivo nella modulazione del sistema immune (fig. 19) (Parks *et al.*, 2004; Santos-Martinez *et al.*, 2007).

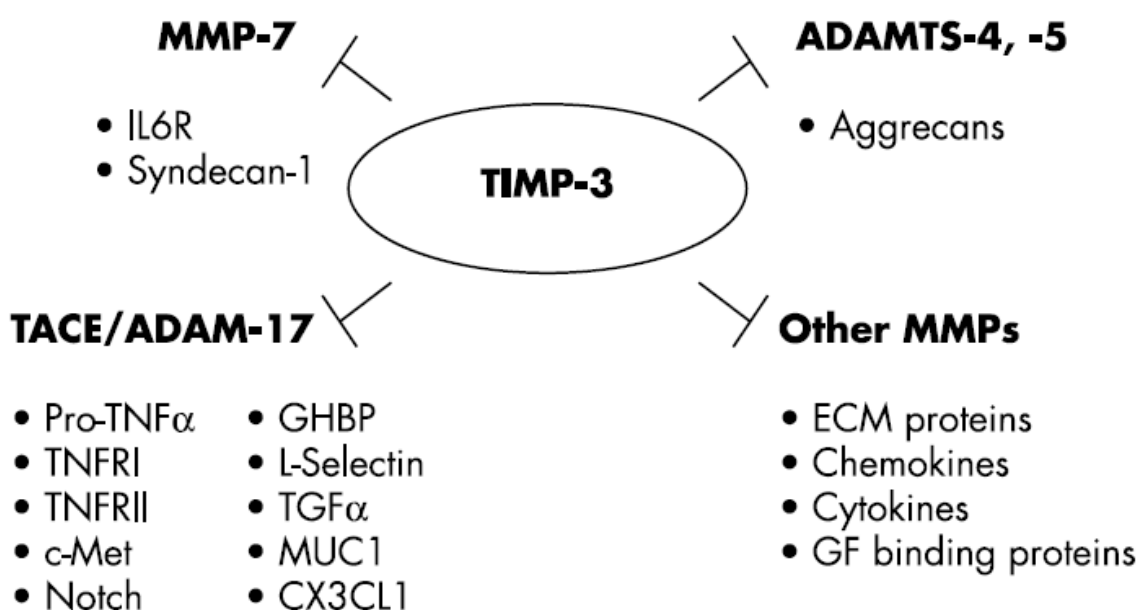


**Figura 19. Attività delle metalloproteinasi.** Le MMP possono svolgere la loro funzione tramite lo *shedding* di vari substrati. Molecole pro-infiammatorie possono attivare le MMP, comportando la modulazione della risposta immune, oltre che il rimodellamento dell'ECM (tratto da Mohammed *et al.*, 2003).

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'infiammazione (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).

## 2.4. 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.



**Figura 20. Substrati di Timp-3.** Timp-3 ha un ruolo peculiare all'interno della famiglia degli inibitori Timp, in quanto può inibire famiglie diverse di proteasi. Queste metalloproteasi catalizzano il taglio proteolitico di molti fattori coinvolti nella normale risposta infiammatoria e nelle patologie ad essa associate (tratto da Mohammed *et al.*, 2003).

A differenza delle altre Timp, che sono proteine solubili, Timp-3 è una proteina secreta e legata alla matrice extracellulare; inoltre, come accennato prima, tale molecola è l'unico inibitore fisiologico di TACE, ma ha un ampio spettro di azione, inibendo anche alcune MMP ed ADAMTS (fig. 20) (Mohammed *et al.*, 2003). Timp-3 è attivato da molecole coinvolte nell'infiammazione, come il TGF- $\beta$  e il PMA, e a sua volta, controllando lo



diabetici rispetto a topi  $\text{Insr}^{+/-}$  normoglicemici (Federici *et al.*, 2005). Partendo da questo presupposto è stato successivamente provato che in topi  $\text{Insr}^{+/-}$   $\text{Timp-3}^{-/-}$  sottoposti a dieta grassa, la deficienza di Timp-3 potenzia gli effetti indotti dall'aploinsufficienza del recettore insulinico e dalla dieta, quali insulino-resistenza, infiammazione e steatosi epatica (Federici *et al.*, 2005; Menghini *et al.*, 2008).

## SCOPO DELLA TESI

Risale al 1993 la scoperta del primo legame molecolare tra l'obesità e l'infiammazione, il TNF $\alpha$ . 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 metallo proteinasi 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. Di recente abbiamo dimostrato che la deficienza di Timp-3 nei topi potenzia l'insulinoresistenza 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, al contrario, l'aploinsufficienza di tale enzima conferisce una parziale protezione nei confronti dell'insulino-resistenza e dell'infiammazione indotta da HFD (Serino *et al.*, 2007).

Lo scopo di questa tesi è quello di valutare il ruolo di TACE nel metabolismo glicolipidico, in particolare a livello epatico, e di evidenziare i meccanismi molecolari coinvolti nell'induzione di steatosi epatica mediata da una iperattivazione di TACE e da una dieta ad alto contenuto di grassi.

# MATERIALI E METODI

## 1. COLTURE CELLULARI

Sono stati utilizzati 3 modelli cellulari differenti: pre-adipociti (3T3-F442A), mioblasti (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) e pre-epatociti immortalizzati con un mutante termo-sensibile del virus SV40 (Rother *et al.*, 1998). Tutte le linee cellulari sono state differenziate prima di essere sottoposte ai trattamenti metabolici. I pre-adipociti sono stati mantenuti in coltura a 37°C in DMEM (*Dulbecco Modified Essential Medium*) supplementato con 1mM L-glutamina e 10% NCS (*newborn calf serum*); per il differenziamento, le cellule sono state mantenute nello stesso terreno supplementato con 10% FCS (*foetal calf serum*) e 5 µg/ml insulina per 10 giorni. Gli epatociti sono stati cresciuti in α-MEM supplementato con 1 mM L-glutamina, 4% FBS e 200 nM desametazone a 33°C. Per il differenziamento, le cellule sono state trasferite a 42°C per 5 ore. I mioblasti sono stati mantenuti in coltura in DMEM supplementato con 1 mM L-glutamina e 10% FBS, e poi differenziati in miociti con DMEM supplementato con 4% HS (*horse serum*) per 7 giorni.

Alla fine del periodo di differenziamento, tutte le cellule sono state tenute per una notte nell'appropriato terreno privo di siero e fattori di crescita e supplementato solo con 0,5% BSA, e poi sottoposte ai vari trattamenti metabolici.

### 1.1 Infezione con adenovirus

Per l'infezione degli epatociti sono stati utilizzati due adenovirus, uno codificante solo la GFP (*green fluorescent protein*) come controllo e l'altro

codificante GFP e TACE (Vector Biolabs, Philadelphia, PA). Le cellule sono state infettate con 500 pfu/cellula in  $\alpha$ -MEM supplementato con 0,5% BSA per 6 ore a 33°C. Alla fine di questo periodo il terreno contenente il virus è stato rimosso, le cellule sono state lavate con PBS e poi mantenute nel terreno di coltura completo per 24 ore, prima di essere differenziate.

## 1.2 Trattamenti metabolici

L'acido palmitico è stato dissolto in metanolo a 75°C e poi coniugato con la BSA (per favorirne il trasporto all'interno della cellula) mediante sonicazione e successiva incubazione *overnight* a 37°C (Solinas *et al.*, 2006). La soluzione risultante conteneva 5 mM acido palmitico in 5% BSA, ed è stata diluita 10 volte nel terreno appropriato prima dell'uso. Il lipopolisaccaride (serotipo 0111:B4, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) è stato sciolto in acqua distillata sterile alla concentrazione di 1 mg/ml. Per il trattamento con glucosio (Sigma Aldrich), le cellule sono state mantenute in terreno a basso contenuto di glucosio (5 mM, C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> ed epatociti) o deprivate del glucosio per 4 ore prima del trattamento (F442A)

## 2. MODELLI ANIMALI

I topi Timp-3<sup>-/-</sup> utilizzati sono stati precedentemente descritti (Leco *et al.*, 2001). Gli animali sono stati alimentati con una dieta *ad libitum*, con libero accesso all'acqua, mantenuti ad un ciclo di 12 ore luce/buio e in ambiente asettico. Per effettuare gli esperimenti metabolici, i topi sono stati nutriti con una dieta ad alto contenuto lipidico (HFD) o con una dieta normale (ND) (Research Diet, New Brunswick, NJ) per 20 settimane dopo lo svezzamento.



I tenori analitici delle diete utilizzate sono i seguenti: 16% proteine, 63% carboidrati, 2.5% grassi, (ND, 5% delle calorie totali derivate dai grassi); 21% proteine, 38.5% carboidrati, 23% grassi (HFD, 60% delle calorie totali derivate dai grassi).

### **3. ANALISI METABOLICHE *IN VIVO***

#### **3.1 Misurazione del peso e della glicemia**

Le operazioni di peso e controllo della glicemia, sia a digiuno che in condizioni 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.

#### **3.2 Determinazione dei livelli insulinici**

La valutazione quantitativa dell'insulina è stata effettuata utilizzando il kit *Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA* (Merckodia). Cinque  $\mu$ l 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 il primo anticorpo legato al pozzetto e con il secondo coniugato con la perossidasi. I lavaggi rimuovono l'anticorpo marcato in eccesso, mentre la quantità di insulina presente in ogni pozzetto è determinata tramite reazione con *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*. La reazione

colorimetrica è stata bloccata con aggiunta di acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e poi misurata spettrofotometricamente a 450 nm.

### **3.3 Curve glicemiche**

Le curve glicemiche sono state eseguite su animali sottoposti a 20 settimane di dieta. Dopo un digiuno notturno, è stato effettuato un test di tolleranza al glucosio (IPGTT, *intraperitoneal glucose tolerance test*) iniettando 2g/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.

## **4. ANALISI ISTOLOGICA**

Il tessuto epatico è stato lavato in PBS (*phosphate buffered saline*: 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 10.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 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 70% etanolo (EtOH) per 45 min, una volta in 95% EtOH per 45 min, due volte in 100% EtOH 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 5 µm 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'inflammatione, alla presenza di degenerazione cellulare o necrosi e in base al livello di fibrosi. Il grado di inflammatione è stato valutato da 0 a 3: 0, inflammatione assente; 1, leggera; 2, moderata; 3, severa.

## 5. ANALISI PROTEOMICA

### 5.1 Preparazione del campione

Dopo 20 settimane di dieta grassa i topi WT e Timp-3<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup>) è stato posto in tubi 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 & Kunkel) e incubati 1h a 37°C. Al fine di rimuovere il materiale insolubile, i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 30 minuti a temperatura ambiente (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. Quaranta µg di proteine di ciascun genotipo sono stati precipitati a -20°C una intera notte in una soluzione contenente 50%

etanolo, 25% metanolo, 25% acetone 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, 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. Le proteine sono state ridotte e poi alchilate aggiungendo prima 10 mM DTT e incubando 1h a 37°C e poi 50 mM iodoacetammide per 1h a RT. I campioni sono stati digeriti con tripsina in rapporto 1:50 a 37°C *overnight*. Il giorno successivo la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 5 µl di 1% TFA. Per l'analisi nLC-ESI-MS/MS sono stati utilizzati 1.3 µg di digesto totale diluito in acido formico, addizionato con 100 fmol di standard interno (digesto di Enolase di *Saccharomyces cerevisiae*, Waters).

## 5.2 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-ESIQuadrupole 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 NanoEaseTM* 75 µm X 25 cm *nanoscale LC column*, diametro particelle 1,7 µm, Waters), con un gradiente di H<sub>2</sub>O/ACN (acetonitrile) 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/  $\mu$ l, Sigma) a 250 nl/min. Dopo l'eluizione dalla colonna, i peptidi sono stati analizzati in spettrometria di massa tandem, con lo spettrometro configurato con acquisizione in MSe. 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, 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 *highthroughput* 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*, carbamidometilazione della cisteine e ossidazione della metionine come modificazioni possibili. Per l'analisi quantitativa le proteine identificate sono state normalizzate utilizzando come riferimento lo standard interno (Enolase di *Saccharomyces cerevisiae*).

## 6. ANALISI BIOINFORMATICA

Le relazioni tra le proteine espresse differenzialmente negli estratti di fegato provenienti da topi WT e *Timp-3*<sup>-/-</sup> sono state valutate tramite il programma bioinformatico, accessibile on-line, *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA 5.0; *Ingenuity® Systems, Mountain View, CA*; [www.ingenuity.com](http://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, abbiamo potuto visualizzare delle interazioni biologiche, basate sia su vie di trasduzione canoniche che su modelli probabilistici d'interazioni biologiche. Inoltre questo programma 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 *pathways* canonici. Tali informazioni sono integrate con altri importanti *databases* 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 interazioni (*network*) dei geni. Queste interazioni sono visualizzate graficamente come dei nodi (che rappresentano geni o prodotti genici) e delle linee che li uniscono (che rappresentano la relazione biologica tra i nodi). Ad ogni interazione è associato un punteggio (*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.

## 7. ANALISI BIOCHIMICHE

### 7.1 *Western blot*

I tessuti ancora congelati (circa 60 mg) o gli epatociti infettati sono stati omogenizzati in tampone di lisi (137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,6, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM EDTA, 1% Triton, 10% glicerolo, 2mM PMSF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, cocktail di inibitori Complete) e incubati in ghiaccio per 30 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 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*). Cinquanta µg di ciascun estratto di fegato sono stati bolliti per 5 minuti a 95°C in *Laemmli sample buffer* (2X: 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% Blu di Bromofenolo, 20% glicerolo). La separazione elettroforetica è stata condotta in TGS (25mM Tris, 250 mM Glicina, 0.1% SDS), ad un voltaggio costante di 120 V. Le proteine 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 (25mM Tris, 250 mM Glicina, 0,1% SDS, 20% alcol

metilico). Le membrane sono state lavate brevemente in acqua bi-distillata, colorate con rosso Ponceau S (Sigma Aldrich) per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine e successivamente lavate con T/TBS (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20). Sono state poi saturate in *blocking solution* (5% *non-fat dry milk*, NFDM, Bio-Rad sciolto in T/TBS) e incubate tutta la notte a 4°C in agitazione lenta con l'appropriato anticorpo primario diluito nella stessa soluzione di saturazione. Il giorno dopo sono stati eseguiti tre lavaggi da 10 minuti prima di incubare le membrane con gli adeguati anticorpi secondari coniugati con HPR (*HorseRadish Peroxidase*, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), per 1h a temperatura ambiente diluiti in *blocking solution*. Sono stati effettuati altri tre lavaggi, poi 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. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata mediante Versadoc (Bio-Rad).

### **7.1.1 Anticorpi**

Gli anticorpi primari utilizzati sono: TACE (C-15):sc-6416; TIMP-3 (C-20):sc-6836; GFP (B-2):sc-9996; ACTINA (C-11):sc-1615; ADK (D-21):sc-23360; MAT I/III (V-15):sc-28029; GNMT (H-225):sc-68871; L-FABP (H-120):sc-50380, tutti della Santa Cruz Biotechnology, Inc. Gli anticorpi anti pSer473-Akt (cat. 9271), Akt (cat. 9272), pSer256-FOXO1 (cat. 9461), FOXO1 (cat. 9462), pThr183/Tyr185-JNK (cat. 9251), JNK (cat. 9252 ), pSer9/21-GSK3 $\alpha/\beta$  (cat. 9331 ), GSK3 $\beta$  (cat. 9315) sono stati acquistati dalla Cell Signaling (Beverly, MA), mentre gli



anticorpi anti p-InsR $\beta$  (cat. 07-841) e Insr $\beta$  (cat. 07-724) dalla Millipore (Billerica, MA).

## 7.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

L'RNA totale è stato estratto dagli epatociti o dai tessuti di topi WT e Timp-3<sup>-/-</sup> utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) e seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Due microgrammi di RNA totale sono stati utilizzati nella reazione di trascrizione inversa eseguita secondo il protocollo dell' *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystem, Foster City, CA), che permette di ottenere il cDNA complementare partendo dall'RNA totale. Le reazioni di PCR quantitativa sono state effettuate utilizzando 50 ng di cDNA, 12,5  $\mu$ l di *TaqMan Universal PCR Master Mix* (contenente la Taq polimerasi, il tampone di reazione ed i nucleotidi) e 1,25  $\mu$ l di *TaqMan Gene Expression Assay* (contenente la sonda fluorescente relativa al gene in esame ed i *primers* per la PCR), utilizzando lo strumento ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Per tutti i geni analizzati le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 50°C per 2 min; 95°C per 10 min; 95°C per 10 sec e 60°C per 1 min, per un totale di 40 cicli.

Ciascuna reazione è stata eseguita in triplicato. L'analisi dei risultati è stata effettuata utilizzando il metodo di comparazione del ciclo soglia ( $C_t$ , *cycle threshold*): il numero di copie del campione, e quindi il suo livello d'espressione, è stato determinato comparandolo con il numero di copie del gene di riferimento, la  $\beta$ -actina (*delta-delta cycle threshold*,  $ddC_t$ ).

I primer utilizzati (Applied Biosystems, Foster City, CA) sono elencati nella tabella 4.

<b>ADAM17</b> Mm 00456428_m1	<b>TIMP3</b> Mm 00441826_m1	<b>Actina</b> Mm 00607939_s1
<b>PPAR<math>\alpha</math></b> Mm 00440939_m1	<b>PPAR<math>\gamma</math></b> Mm 00440945_m1	<b>PPAR<math>\delta</math></b> Mm 00803186_g1
<b>LXR<math>\alpha</math></b> Mm 00443454_m1	<b>LXR<math>\beta</math></b> Mm 00437262_m1	<b>Srebp-1c</b> Mm 00550338_m1
<b>ChREBP</b> Mm 00498811_m1	<b>FOXO1</b> Mm 00490672_m1	<b>FOXA2</b> Mm 00839704_m1
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b> Mm 00447183_m1	<b>Nurr77</b> Mm 00439358_m1	<b>FAS</b> Mm 00662319_m1
<b>SCD-1</b> Mm 00772290_m1	<b>MAT1A</b> Mm00522563_m1	<b>MAT2A</b> Mm00728688_s1
<b>GNMT</b> Mm00494689_m1	<b>ADK</b> Mm00612772_m1	<b>FABP-1</b> Mm00444340_m1
<b>CBS</b> Mm00460654_m1	<b>MTHFR</b> Mm00487784_m1.	

**Tabella 2. Lista dei primers utilizzati negli esperimenti di PCR quantitativa (Applied Biosystem, Foster City, CA)**

### **7.3 Misurazione dell'attività di TACE**

L'attività di TACE è stata misurata utilizzando il kit "*Sensolyte<sup>TM</sup> 520 TACE ( $\alpha$ -secretase) Activity Assay Kit Fluorimetric*" (ANASPEC, San Josè, CA), seguendo il protocollo fornito dal produttore. Per ogni saggio sono stati usati 30  $\mu$ g di proteine estratte da tessuto o 20  $\mu$ g di proteine cellulari. La reazione è stata iniziata aggiungendo ai lisati 40  $\mu$ M di substrato di TACE (QXL<sup>TM</sup>520/5-FAM FRET), un peptide contenente la sequenza che costituisce il sito di taglio di TACE

nel pro-TNF- $\alpha$  (LAQAVRSSSR) e coniugato con un fluoroforo (5-FAM) ad una estremità ed un *quencher* (QXL™520) all'altra. L'enzima TACE attivato taglia questo substrato in due frammenti separati, e ciò risulta in un aumento della fluorescenza di 5-FAM che può essere monitorata con un fluorimetro (FLx800, BIO-TEK Instrument, Winooski, VT) ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 490 nm ed una di emissione pari a 520 nm.

## 8. MISURAZIONE DEI LIVELLI DI SAM E SAH

Per determinare i livelli di S-adenosilmetionina ed S-adenosilomocisteina nel fegato e negli epatociti in coltura è stato seguito il metodo utilizzato da Wang *et al* (Wang *et al.*,2001). Circa 100 mg of tessuto epatico sono stati omogenizzati in 200  $\mu$ l di tampone 0,4 M HClO<sub>4</sub>. Per gli epatociti, circa  $3 \times 10^6$  cellule sono state risospese in 50  $\mu$ l di 0,4 M HClO<sub>4</sub> e poi sonicate in un bagnetto ad ultrasuoni con per 5 min. I campioni sono stati poi centrifugati a 10 000 *g* per 5 min a 4°C, ed un'aliquota di 20  $\mu$ l dell'estratto acido è stata applicata direttamente su una colonna di HPLC (Dionex Ultima 3000). La separazione è stata effettuata su una colonna analitica a fase inversa Dionex Acclaim C18 (150 mm x 4,6 mm I.D., 5  $\mu$ m diametro delle particelle). Per la fase mobile ed il gradiente di separazione sono stati usati: solvente A, 8 mM acido octanosulfonico e 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> portato a pH 3.0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, e solvente B, 100% metanolo.

Per determinare i livelli di metionina e omocisteina nel siero, 400  $\mu$ l di acetonitrile contenenti 0,1% acido trifluoroacetico e 10  $\mu$ l di uno standard interno (norvalina) sono stati aggiunti a 50  $\mu$ l di siero. Questa soluzione è stata poi centrifugata per 5 min a 10000 *g* e la fase liquida è stata liofilizzata. Il

liofilizzato è stato poi sciolto in 50 µl di piridina/BSTFA 1:1 e tenuto a 70° C per 30 min. La miscela derivatizzata è stata analizzata in gas-cromatografia; la separazione è stata effettuata su una colonna TR-5ms SCQ, 30m x 0,25mm ID x 0,25µm (Thermo Electron Corporation). Sono stati selezionati 2 ioni per ogni molecola da individuare: norvalina m/z 144 e 218, omocisteina m/z 128 e 234 metionina m/z 128 e 176.

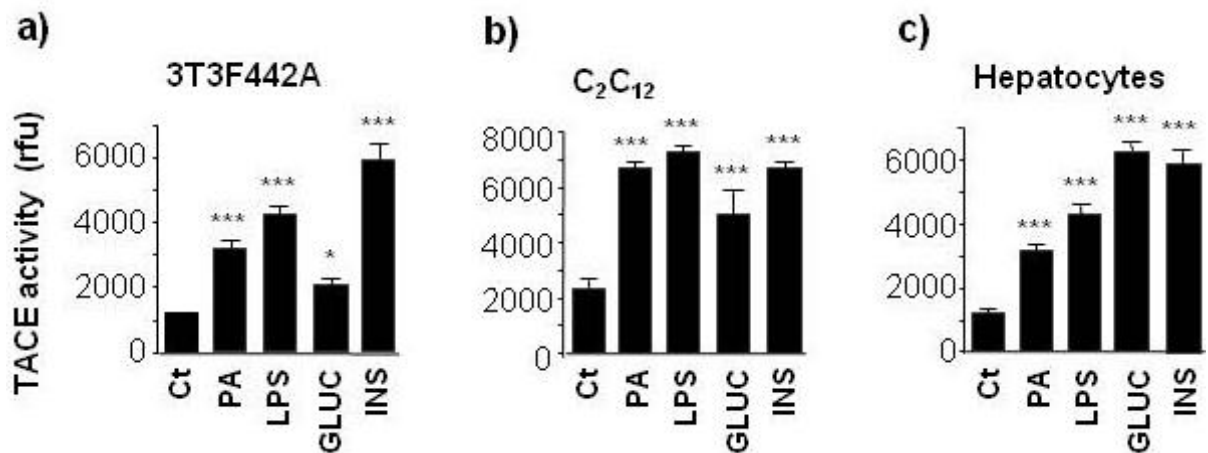
## 9. ANALISI STATISTICA

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. I risultati sono stati sottoposti ad analisi statistica, utilizzando lo *student's T test*, ANOVA ad una via o a due vie come opportuno, ed espressi come media dei valori relativi ad ogni esperimento +/- la deviazione standard (SD), come indicato nelle figure. I valori di p minori di 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

# RISULTATI

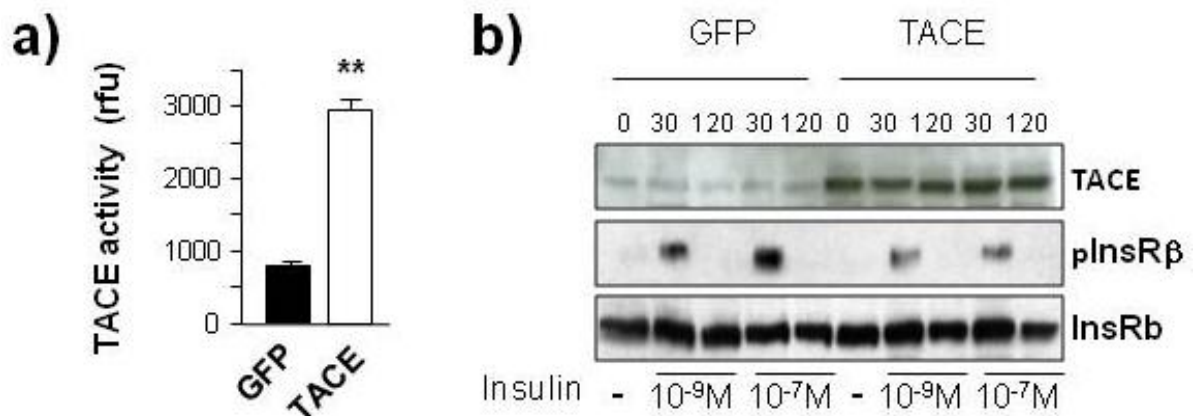
## **1. L'attività di TACE è indotta da stimoli metabolici ed inibisce la trasduzione del segnale insulinico *in vitro*.**

Nel nostro laboratorio è stato recentemente dimostrato che topi con un solo allele (eterozigoti) per TACE ( $TACE^{+/-}$ ) sono più insulino-sensibili dei loro fratelli wild type quando entrambi vengono sottoposti ad un regime di dieta grassa, e risultano pertanto protetti dagli effetti deleteri glucotossici e lipotossici che normalmente accompagnano l'aumento di introito calorico prolungato nel tempo (Serino M. et al., 2007). E' stato inoltre dimostrato che TACE, attraverso la regolazione dello *shedding* del  $TNF\alpha$ , gioca anche un ruolo importante nell'accelerare i processi fisiopatologici che portano alla steatosi epatica in un modello murino di insulino-resistenza (topi  $Insr^{+/-}$ ) (Menghini R. et al., 2008). Partendo da queste evidenze *in vivo*, abbiamo deciso di utilizzare dei sistemi cellulari per studiare i meccanismi che legano l'attivazione di TACE all'alterazione del metabolismo glucidico e lipidico. In particolare, sono state utilizzate 3 linee cellulari che rappresentano i 3 tessuti metabolicamente attivi, e cioè una linea di adipociti (3T3-F442A), una di miociti ( $C_2C_{12}$ ) e una di epatociti (SV40-transformed hepatocytes). In tutti e tre i sistemi analizzati, l'attività di TACE viene aumentata in maniera significativa dal trattamento con acido palmitico (PA), l'acido grasso più comune in circolo, con lipopolisaccaride (LPS), l'endotossina prodotta da batteri Gram-negativi, da alte concentrazioni di glucosio (15 mM) e da alte concentrazioni di insulina ( $10^{-7}$  M) (fig. 22). Tali trattamenti mimano un eccessivo stress metabolico, come si riscontra nelle dislipidemie, nell'insulino-resistenza e nel diabete di tipo 2.



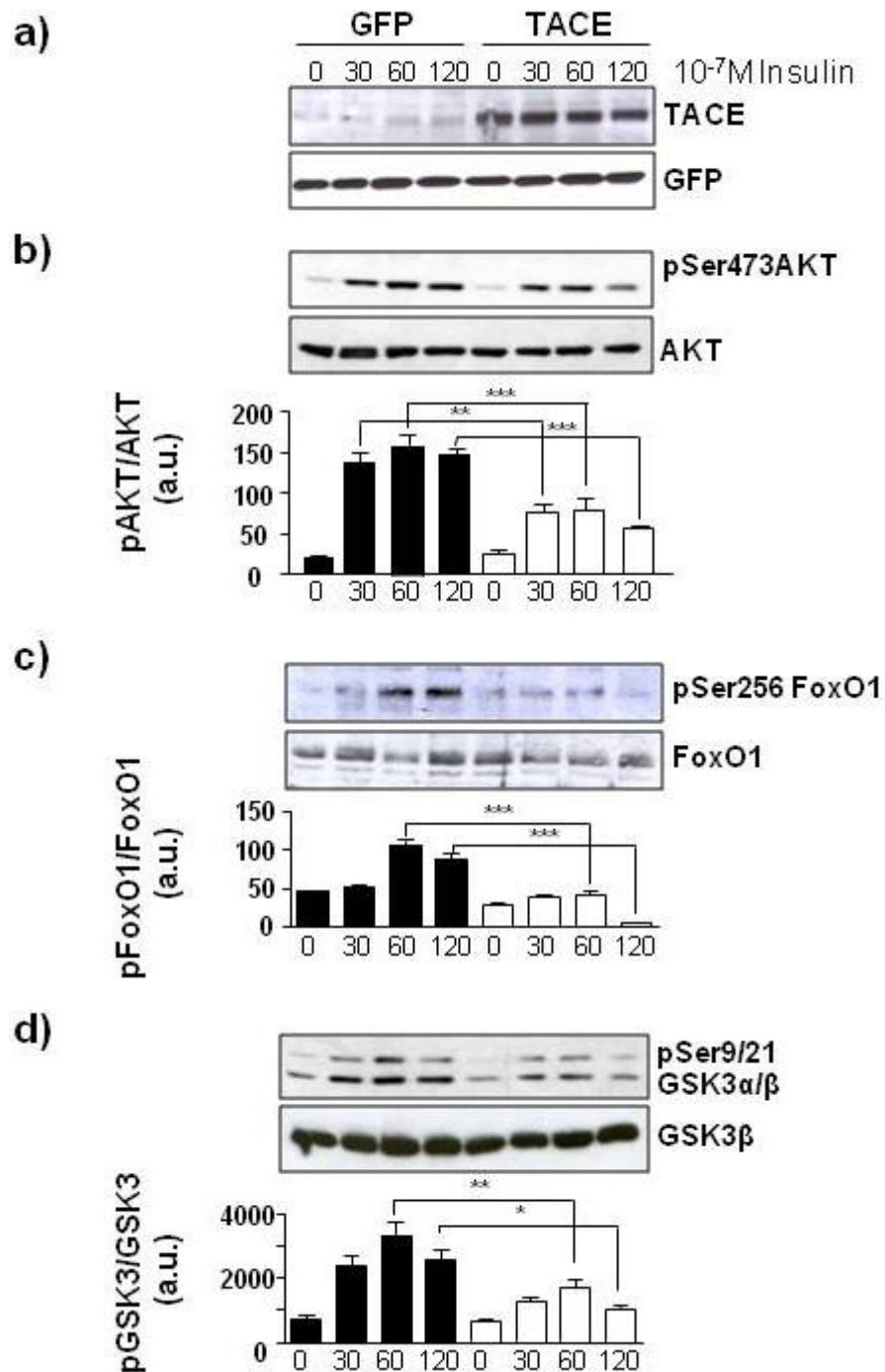
**Figura 22.** L'attività di TACE è indotta da stimoli metabolici *in vitro*. Gli adipociti 3T3F442A (a), i miotubi C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (b) e gli epatociti (c) sono stati trattati con 0,5 mM acido palmitico, 200 ng/ml lipopolisaccaride, 15 mM glucosio o 10<sup>-7</sup> M insulina per 2 ore e poi raccolti. Gli estratti proteici sono stati utilizzati per determinare l'attività di TACE. n = 3, \*\*\* = p < 0,001, \* = p < 0,05.

Per analizzare se l'attivazione di TACE medi la glico- e lipotossicità interferendo con il segnale insulinico, gli epatociti sono stati infettati con un adenovirus che sovra-esprime l'enzima insieme alla GFP, o con un adenovirus che esprime solo la GFP come controllo, e mediante un saggio specifico che misura il taglio da parte di TACE di un substrato fluorescente abbiamo potuto evidenziare che la sovra espressione è di per sé sufficiente a determinare l'attivazione dell'enzima (fig. 23a). In questo contesto è stato anche possibile vedere che ciò determina un'attenuazione del segnale insulinico, come dimostrato da una diminuzione nella fosforilazione del recettore IR in seguito a trattamento degli epatociti infettati con insulina (fig.23b).



**Figura 22. L'attività di TACE altera la fosforilazione del recettore insulinico.** a) Gli epatociti sono stati infettati con un adenovirus codificante solo la GFP (*green fluorescent protein*) o GFP e TACE, e i relativi estratti proteici sono stati utilizzati per determinare l'attività di TACE. n = 3, \*\* = p < 0,005; b) Gli epatociti infettati come descritto in a) sono stati trattati con insulina a diverse concentrazioni e per diversi periodi di tempo e gli estratti proteici sono stati analizzati mediante western blot per rivelare TACE, IRβ totale e la sua porzione fosforilata.

In seguito nelle stesse cellule sono stati analizzati anche elementi più a valle nella via di trasduzione del segnale insulinico, che sono responsabili della regolazione del metabolismo glucidico e lipidico, ed anche in questo caso è stato possibile evidenziare una diminuzione della fosforilazione di Akt sulla serina 473, di FoxO1 sulla serina 256 e di GSK3α/β sulle serine 9/21 in presenza di TACE sovra espresso (fig. 24).

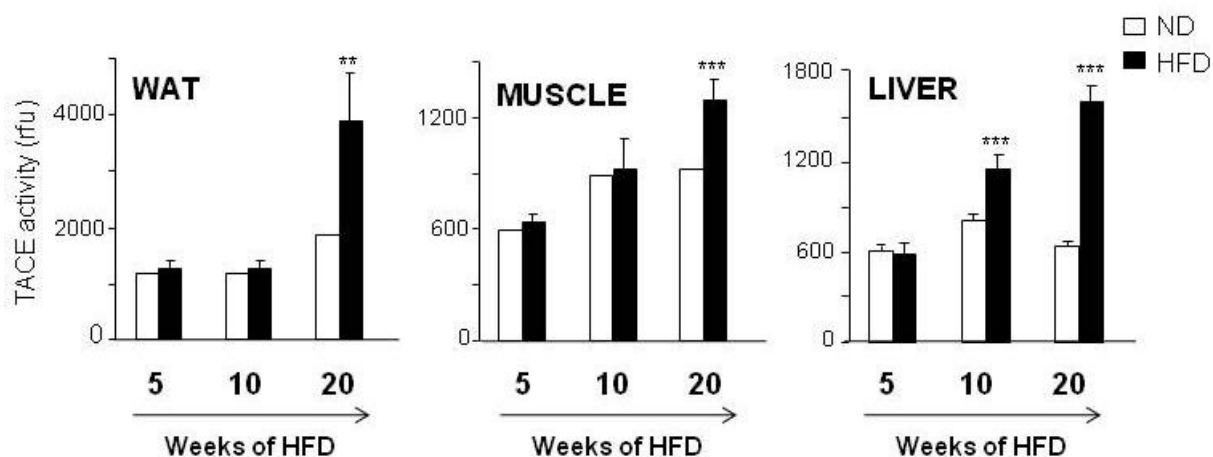


**Figura 24. L'attività di TACE altera la trasduzione del segnale insulinico.** a) Gli epatociti sono stati infettati con un adenovirus codificante solo la GFP (*green fluorescent protein*) o GFP e TACE, stimolati con insulina, e i relativi estratti proteici sono stati utilizzati per determinare i livelli di fosforilazione di b) Akt, c) FoxO1 e d) GSK3. n = 3, \*\*\* = p < 0,001, \*\* = p < 0,005, \* = p < 0,05.



## 2. L'espressione e l'attività di TACE sono modulate da una dieta ricca in grassi

Al fine di identificare i tessuti in cui l'attività di TACE è in grado di modulare il metabolismo lipidico e glucidico abbiamo analizzato l'attivazione dell'enzima nel tessuto adiposo, nel muscolo e nel fegato di topi C57/BL6 sottoposti a dieta grassa per 5, 10 e 20 settimane o nutriti con una dieta normale per gli stessi periodi di tempo. Come mostrato nella fig. 25, il fegato è l'organo in cui TACE viene attivato prima, già dopo 10 settimane di HFD, e tale attivazione persiste ed aumenta fino a 20 settimane, rispetto ai topi di controllo. Anche il muscolo e il tessuto adiposo mostrano un aumento significativo dell'attività di TACE, ma solo dopo 20 settimane di dieta grassa.

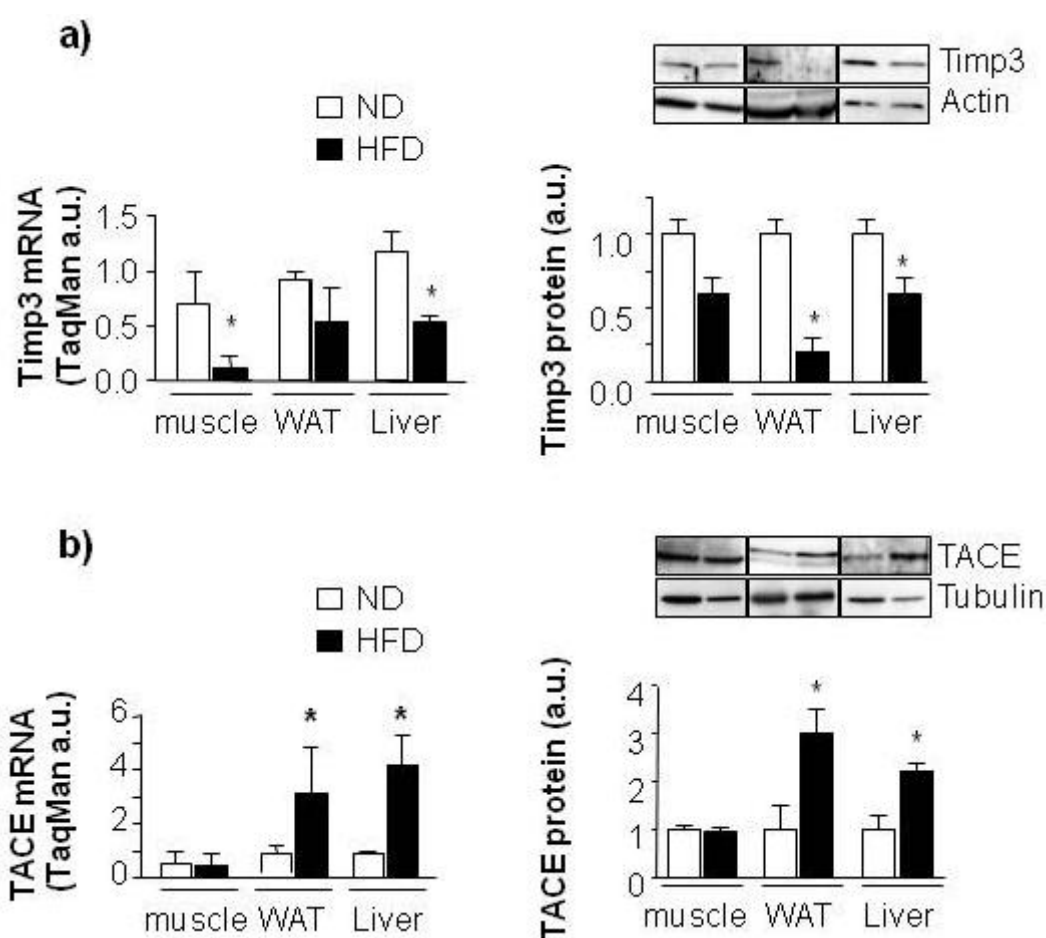


**Figura 25. L'attività di TACE è modulata durante una dieta grassa.** Topi C57/BL6 sono stati nutriti con una dieta grassa (HFD) o con una dieta normale (ND) per 5, 10 o 20 settimane; alla fine di ciascun periodo è stata analizzata l'attività di TACE nei lisati di tessuto adiposo (a sinistra), di muscolo (al centro) e di fegato (a destra).  $n = 3$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,005$ .

Sono stati poi analizzati i livelli di espressione di TACE e del suo inibitore Timp-3 negli stessi tessuti, ed è stato evidenziato che, all'aumento della attività di

TACE mediato da dieta grassa corrisponde solo un debole incremento dell'espressione dell'mRNA e della proteina nel fegato e nel tessuto adiposo, mentre l'espressione di TIMP-3 risulta significativamente ridotta in tutti i tessuti analizzati (fig.26).

Questi risultati suggeriscono che uno stress metabolico prolungato è associato con l'aumento dell'attività di TACE e una diminuzione dell'espressione del suo inibitore TIMP-3.

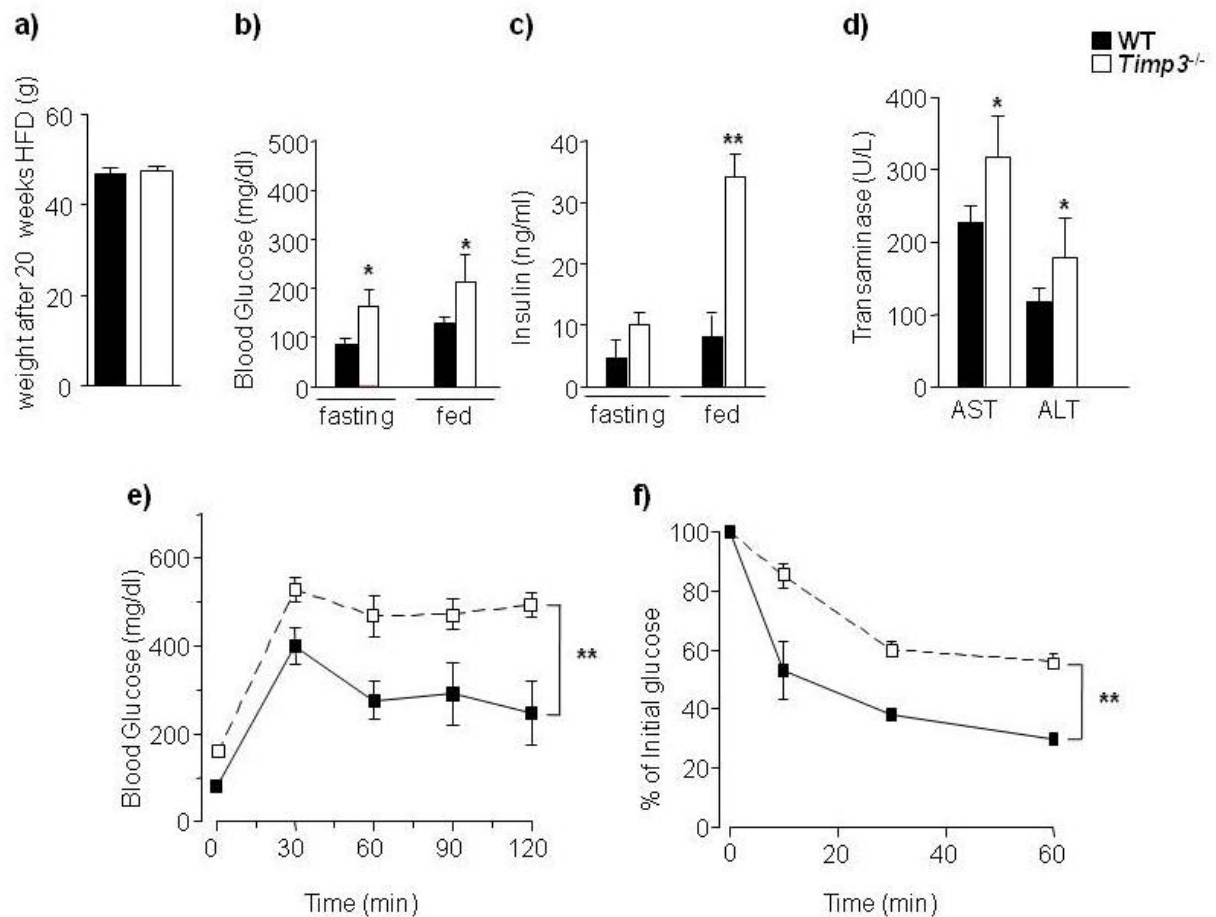


**Figura 26. L'espressione di Timp-3 e TACE è regolata durante una dieta grassa.** Topi C57/BL6 sono stati nutriti con una dieta grassa (HFD) o con una dieta normale (ND) per 20 settimane; alla fine di tale periodo sono stati preparati estratti proteici o RNA dal muscolo, dal tessuto adiposo e dal fegato di questi animali per analizzare l'espressione di Timp-3 (a) e TACE (b) sia come mRNA (a sinistra) che come proteina (a destra). n = 3; \* = p < 0,05.

### **3. La deficienza di Timp-3 potenzia l'insulino-resistenza e la steatosi epatica indotta dalla dieta grassa.**

Studi condotti in altri laboratori su topi *knockout* per il gene di Timp-3 (Timp-3<sup>-/-</sup>) hanno dimostrato che questi animali mostrano un'aumentata attività di TACE, e quindi una maggior produzione di TNF $\alpha$ , soprattutto nel fegato (Mohammed *et al.*, 2004). Tuttavia, nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che l'omeostasi metabolica dei topi Timp-3<sup>-/-</sup> non si differenzia da quella dei topi di controllo *wild type*, quando entrambi i genotipi vengono nutriti con una dieta normale (Federici *et al.*, 2005). Questa caratteristica rende i topi Timp-3<sup>-/-</sup> un modello adatto a studiare l'interazione tra l'aumentata attività di TACE e lo stress metabolico prolungato causato da una dieta ricca in lipidi.

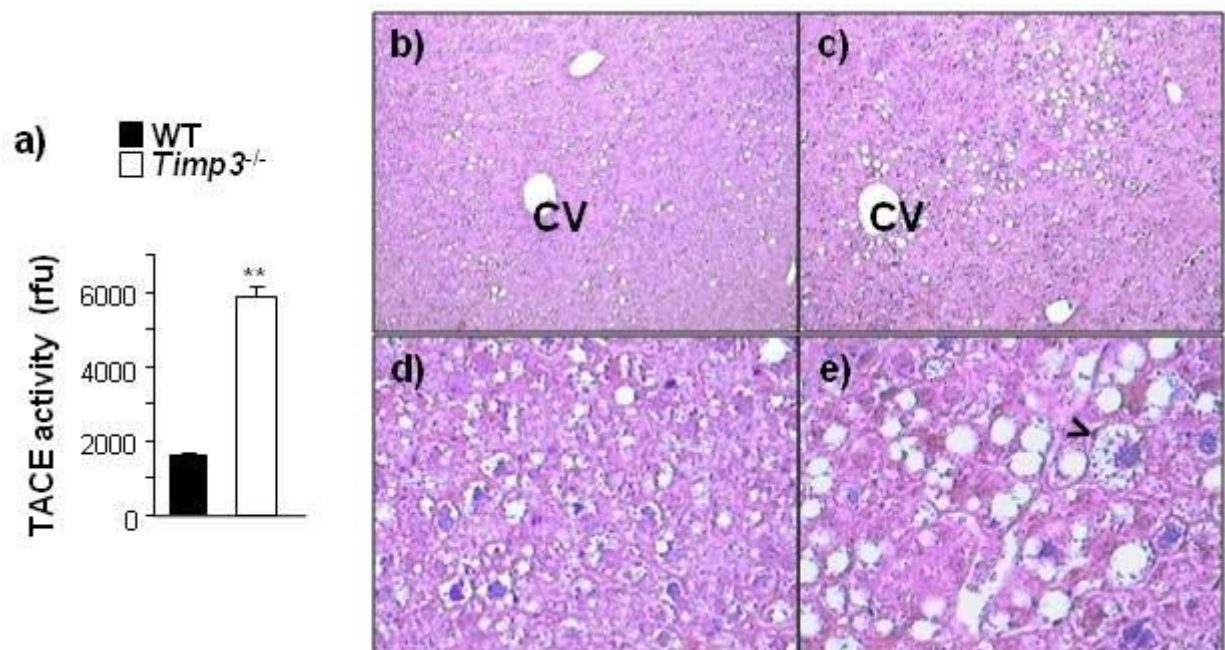
A tale scopo topi Timp-3<sup>-/-</sup> e *wild type* sono stati mantenuti a dieta grassa per 20 settimane e poi utilizzati per la valutazione di alcuni parametri metabolici. La prima caratteristica evidenziata è che entrambi i genotipi ingrassano, come atteso, e che gli animali Timp-3<sup>-/-</sup> non presentano quindi una particolare predisposizione all'aumento di peso (fig. 27a). Tuttavia, i topi Timp-3<sup>-/-</sup> sono caratterizzati da livelli di glucosio ed insulina circolanti più elevati rispetto ai controlli, sia a digiuno che dopo un pasto (fig. 27 b-c); inoltre, se sottoposti a test di tolleranza al glucosio e all'insulina, risultano più intolleranti al glucosio e più insulino-resistenti rispetto ai topi di controllo (fig. 27 e-f), e presentano anche livelli più elevati di transaminasi epatiche (fig. 27 d).



**Figura 27. Profilo metabolico dei topi *Timp3*<sup>-/-</sup> sottoposti a dieta grassa.** Topi WT e *Timp3*<sup>-/-</sup> sono stati nutriti con una dieta grassa per 20 settimane. Alla fine di tale periodo ne è stato misurato il peso (a), i livelli ematici di glucosio (b) ed insulina (c) sia a digiuno che dopo un pasto e le transaminasi epatiche (d). Gli stessi topi sono anche stati sottoposti ad una curva da carico di glucosio (e) e ad un test di tolleranza all'insulina (f). n = 6, \*\* = p < 0,005, \* = p < 0,05.

L'analisi istologica e funzionale del fegato dei topi *Timp3*<sup>-/-</sup> ha evidenziato, come atteso, un aumento dell'attività di TACE (fig. 28a), ma anche un peggioramento del profilo steatosico; infatti, mentre i topi *wild type* mostrano solo steatosi microvescicolare, corrispondente a NAFLD di primo grado, negli animali *Timp3*<sup>-/-</sup> prevale una steatosi mista, micro- e macrovescicolare, estesa fra il 20% ed il 30% del parenchima, con segni di infiammazione lobulare (qualche neutrofilo lobulare nelle zone di maggiore sofferenza epatica) e rari

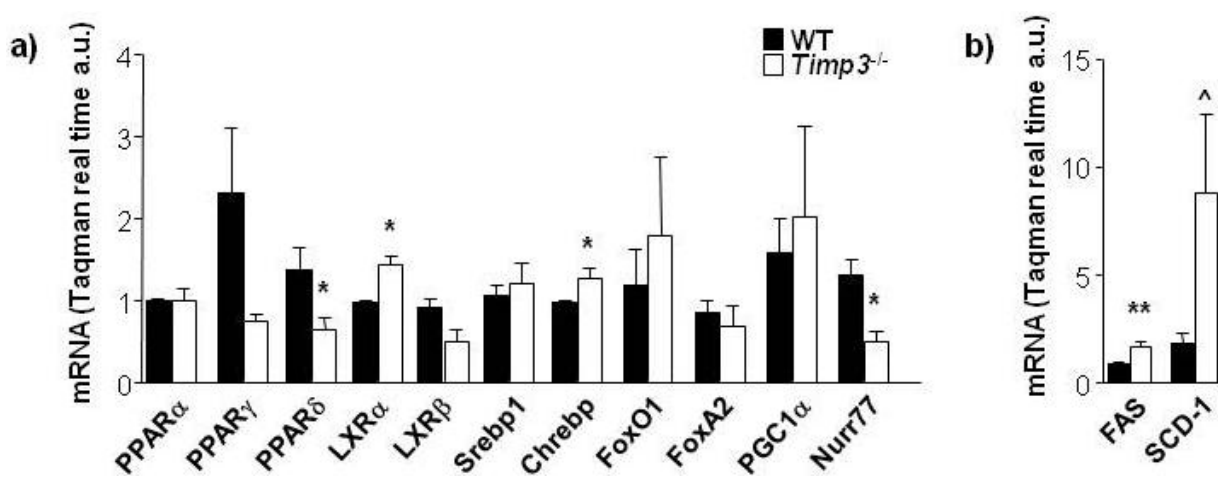
segni di sofferenza cellulare (degenerazione balloniforme), reminiscente di NAFLD di secondo grado (fig.28 b-e)



**Figura 27. Steatosi epatica nel fegato di topi  $Timp3^{-/-}$ .** L'attività di TACE è stata misurata nel fegato di topi  $Timp3^{-/-}$  e WT sottoposti a dieta grassa per 20 settimane (a).  $n = 3$ ,  $** = p < 0,005$ . I fegati sono anche stati fissati in formalina e tagliati in sezioni di 5  $\mu m$  di spessore. Tali sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina ed analizzate al microscopio ottico con ingrandimento 10x (b,c) e 40x (d,e). Nell'ingrandimento ottico 40X del topo  $Timp3^{-/-}$  è messa in evidenza, con il simbolo >, una degenerazione balloniforme. CV, vena centrolobulare.

Per capire meglio i meccanismi alla base dell'aumentato danno epatico riscontrato nei topi  $Timp3^{-/-}$  sottoposti a stress metabolico prolungato, è stata analizzata nel fegato di questi animali l'espressione di alcuni fattori di trascrizione che regolano il metabolismo glucidico e lipidico (fig. 29). I topi  $Timp3^{-/-}$  mostrano livelli di espressione più alti di  $LXR\alpha$  (*Liver X Receptor alpha*) e  $Chrebp1$  (*Carbohydrate response element binding protein 1*), che regolano rispettivamente enzimi coinvolti nella sintesi degli acidi grassi e nella glicolisi; inoltre risulta diminuita l'espressione di  $PPAR\delta$  (*peroxisome proliferator activated receptor delta*), che svolge un ruolo nella  $\beta$ -ossidazione degli acidi

grassi (Seedorf & Aberle, 2007) e serve anche come sensore della concentrazione ematica di acidi grassi liberi (Sanderson *et al.*, 2009) e Nurr77, anch'esso coinvolto nella regolazione della lipogenesi epatica (Pols *et al.*, 2008). Ad ulteriore conferma dell'alterazione del metabolismo lipidico e glucidico nel fegato dei topi *Timp3<sup>-/-</sup>*, anche i livelli di espressione di geni regolati a livello trascrizionale da  $LXR\alpha$ , come FAS (*Fatty Acids Synthase*) e SCD-1 (*stearoyl-coenzyme A desaturase*) sono risultati conseguentemente aumentati nei topi KO rispetto ai topi *wild type* (fig. 29b).



**Figura 28. Livelli di espressione di geni coinvolti nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico.** L'espressione di fattori di trascrizione ed enzimi importanti nel metabolismo di carboidrati e lipidi è stata misurata tramite PCR quantitativa (Real Time PCR) effettuata su RNA estratto da fegato di topi WT e *Timp3<sup>-/-</sup>*. n = 3, \* < 0,05, ^ = 0,06.

#### 4. Analisi del proteoma epatico di topi *Timp3<sup>-/-</sup>* e *wild type* sottoposti a dieta grassa.

Poiché i risultati illustrati sopra hanno dimostrato che l'attivazione di TACE gioca un ruolo importante nella patogenesi della steatosi epatica, abbiamo deciso di utilizzare alcune metodiche di proteomica per identificare *targets* di TACE che potessero essere coinvolti nella regolazione del metabolismo epatico

di lipidi e carboidrati in un contesto di obesità indotta da dieta grassa. A tale scopo è stata effettuata un'analisi di proteomica *shotgun* (nLCESI-MSE) su campioni di fegato omogeneizzati e digeriti con tripsina, secondo i protocolli descritti nella sezione "Materiali e Metodi". I risultati 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 espresse a livelli differenti nel fegato dei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* rispetto a quello dei WT, entrambi sottoposti ad un regime di dieta grassa, che è riportata nella tabella 3. Nel fegato dei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* è stata riscontrata una significativa riduzione nell'espressione di 35 proteine. Tra queste risultano particolarmente interessanti nel nostro contesto sperimentale 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), 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 elevati nei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* rispetto ai WT, c'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).

Accession SwissProt	Description (Symbol)	Score PLGS	WT:TIMP-3 <sup>-/-</sup> ratio
<b><u>WT &gt; TIMP-3<sup>-/-</sup></u></b>			
Q91X72	Hemopexin precursor (HPX)	218.67	>5
P97351	40S ribosomal protein S3a (RPS3A)	158.65	>5
P62082	40S ribosomal protein S7 (RPS7)	135.62	>5
P62908	40S ribosomal protein S3 (RPS3)	155.18	>5
<b>P55264</b>	<b><u>Adenosine kinase (ADK)</u></b>	<b>193.93</b>	<b>&gt;5</b>
Q61646	Haptoglobin precursor (HPR)	170.37	>5
Q99PG0	Arylacetamide deacetylase (AADAC)	138.27	>5
P48962	ADP/ATP translocase 1 (SLC25A4)	246.33	>5
P68040	Receptor of activated protein kinase C 1 (GNB2L1)	144.83	>5
Q91VS7	Microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1)	142.31	>5
Q99LB7	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial precursor (SARD)	326.9	>5
P19157	Glutathione S-transferase P 1 (GSTP1)	350.31	2.03
<b>Q9QXF8</b>	<b><u>Glycine N-methyltransferase (GNMT)</u></b>	<b>299.32</b>	<b>1.73</b>
Q8R0Y6	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (ALDH1L1)	562.33	1.67
P11725	Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial precursor (OTC)	304.39	1.55
P16460	Argininosuccinate synthase (Citrulline-aspartate ligase) (ASS1)	904.66	1.51
Q61176	Arginase-1 (Liver-type arginase) (ARG1)	582.61	1.51
P15105	Glutamine synthetase (GLUL)	259.51	1.48
P20029	78 kDa glucose-regulated protein precursor (HSPA5)	426.35	1.46
Q8C196	Carbamoyl-phosphate synthase (CPS1)	2003.6	1.43



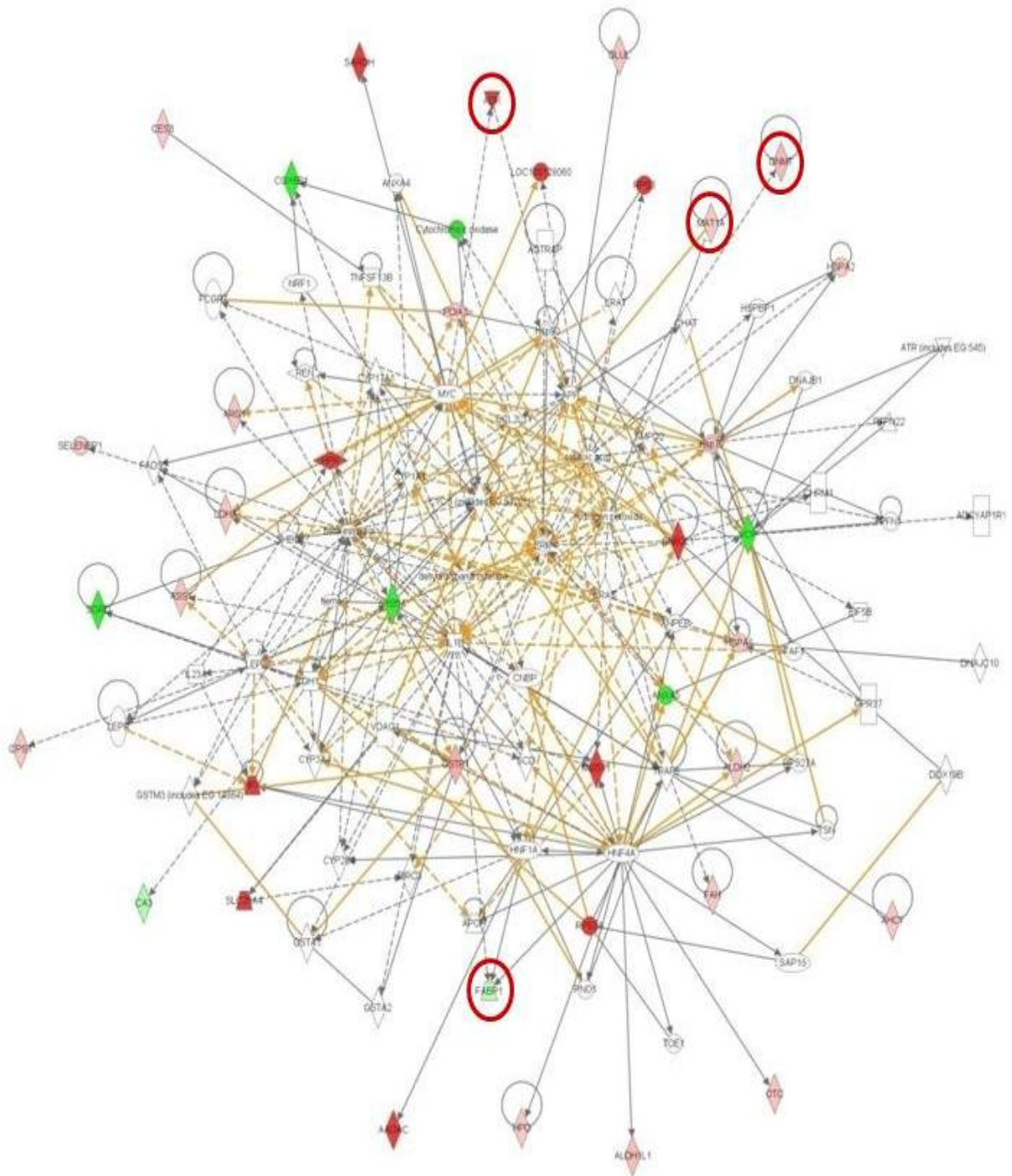
Q63836	Selenium-binding protein 2 (SELENBP1)	337.87	1.42
P35505	Fumarylacetoacetase (FAH)	291.02	1.4
P62806	Histone H4	283.78	1.39
P50247	Adenosylhomocysteinase (AHCY)	334.52	1.38
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain (LDHA)	343.91	1.38
<b>Q91X83</b>	<b><u>S-adenosylmethionine synthetase isoform type-1 (AdoMet synthetase 1) (MAT1A)</u></b>	<b>362.33</b>	<b>1.38</b>
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2 (HSPA2)	284.56	1.34
Q63880	Liver carboxylesterase 31 precursor (Esterase- 31) (CES3)	325.06	1.34
P49429	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD)	325.2	1.34
P47738	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor (ALDH2)	599.59	1.31
P27773	Protein disulfide-isomerase A3 precursor (PDIA3)	218.04	1.31
			<b><u>WT &lt; TIMP-3<sup>-/-</sup></u></b>
Q64442	Sorbitol dehydrogenase (SORD)	348.14	<0.2
P48036	Annexin A5 (ANXA5)	132.75	<0.2
P56395	Cytochrome b5 (CYB5A)	156.26	<0.2
P56391	Cytochrome c oxidase subunit VIb isoform 1 (COX6B1)	88.26	<0.2
Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP)	267.36	<0.2
<b>P12710</b>	<b><u>Fatty acid-binding protein, liver (FABP1)</u></b>	<b>330.68</b>	<b>0.64</b>
P16015	Carbonic anhydrase 3 (CA3)	570.14	0.53

**Tabella 3** Lista delle proteine espresse a livelli differenti nel fegato di topi WT e Timp-3<sup>-/-</sup> sottoposti a dieta grassa. L'espressione delle proteine evidenziate in grassetto è stata anche analizzata tramite PCR quantitativa e *western blot*.

## 5. Analisi bioinformatica: associazioni funzionali tra le proteine identificate

Le relazioni tra le proteine espresse a livelli differenti nel fegato di topi WT e Timp-3<sup>-/-</sup> mantenuti a dieta grassa per 20 settimane sono state valutate tramite il programma di bioinformatica *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). Nel programma è stato inserito l'elenco delle proteine identificate insieme con 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 (tab. 4). In particolare, questa analisi ha associato molte delle proteine espresse a livelli differenti nei topi Timp-3<sup>-/-</sup> rispetto ai WT con patologie epatiche quali la fibrosi ( $p = 3,31E^{-0.3} - 3,13E^{-0.3}$ ), l'infiammazione ( $p = 3,79E^{-0.3} - 3,79E^{-0.2}$ ), la colestasi ( $p = 1,46E^{-0.2} - 2,50E^{-0.2}$ ), l'iperbilirubinemia ( $p = 1,83E^{-0.2} - 1,83E^{-0.1}$ ) e la steatosi ( $p = 9.19E^{-0.3} - 1.38E^{-0.1}$ )

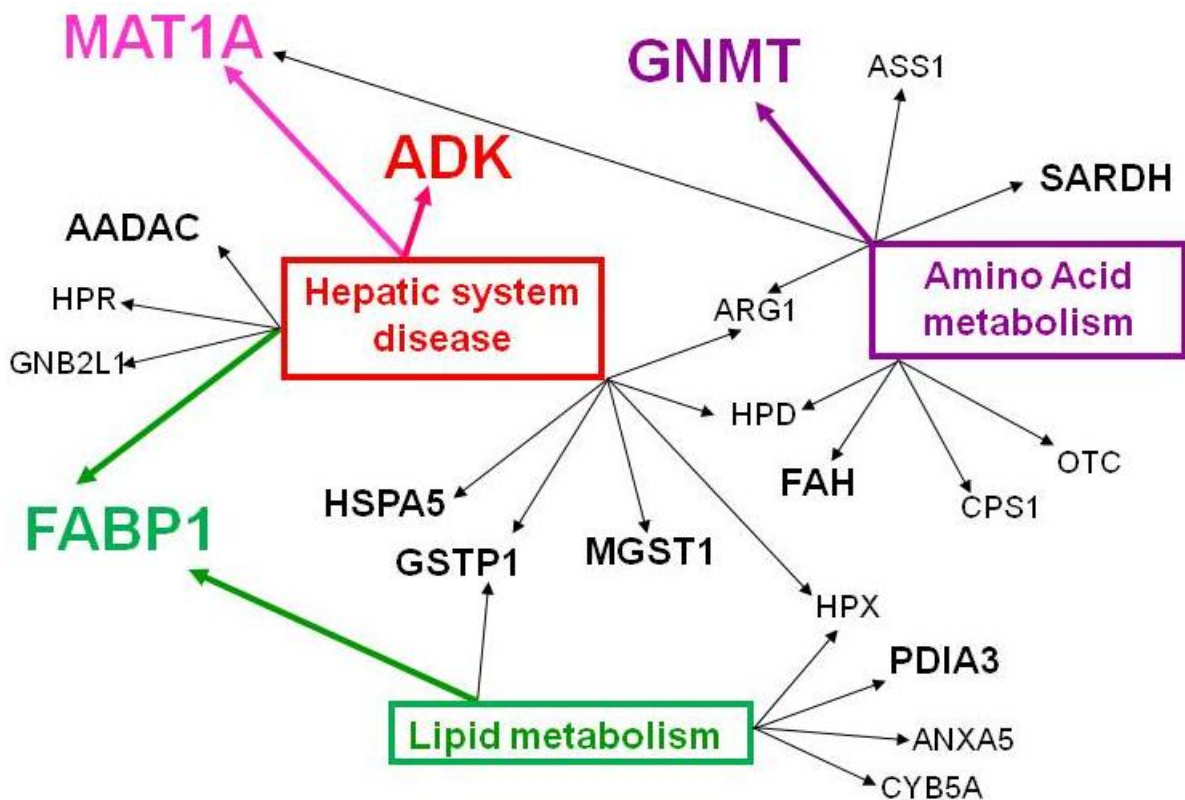


**Figura 30. Immagine esemplificativa del *network* interattivo ottenuto da IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). Le proteine sono rappresentate come nodi e l'associazione biologica fra due nodi è rappresentata da una linea. In verde sono evidenziate le proteine significativamente sovra-regolate nei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>*, in rosso quelle la cui espressione è invece ridotta. Le linee intere rappresentano le interazioni dirette, quelle tratteggiate le interazioni indirette. Le proteine prese in analisi sono cerchiato in rosso.**

	Disease Process	-Log(P value) Threshold for significance > 1.3
1	Liver Fibrosis	2.68
2	Liver Inflammation	2.57
3	Liver Steatosis	2.23
4	Liver Steatohepatitis	1.92
5	Liver Cholestasis	1.86
6	Liver Hyperbilirubinemia	1.63

**Tabella 4. Patologie correlate alla deficienza di Timp-3<sup>-/-</sup>.** Il software IPA (*Ingenuity pathways analysis*) ha identificato le patologie più significativamente correlate a livello statistico con il nostro *dataset*, a cui sono stati associati i corrispondenti valori *p* indicativi della confidenza dell'associazione.

Infine sono state utilizzate le annotazioni fornite da IPA per effettuare un'analisi di *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 ( $p = 2,51E^{-0.8} - 4,22E^{-0.2}$ ), patologie del sistema epatico ( $p = 9,20E^{-0.6} - 2,50E^{-0.2}$ ) e metabolismo lipidico ( $p = 3,07E^{-0.3} - 4,51E^{-0.2}$ ). Sempre tramite IPA sono state individuate le altre proteine correlate a tali funzioni e sulla base dei dati ottenuti è stato disegnato un *network*, al fine di evidenziare altre molecole che potrebbero avere un certo rilievo nel nostro contesto sperimentale. Come mostrato nella figura 31, molte delle proteine individuate possono essere messe in relazione, oltre che con disfunzioni epatiche, anche con il metabolismo degli amminoacidi e dei lipidi.



**Figura 31.** Processi biologici che coinvolgono le proteine espresse a livelli diversi nei fegati di topi WT e *Timp-3*<sup>-/-</sup> a dieta grassa. Le proteine rappresentate in colore sono quelle la cui modulazione è stata confermata tramite *Western blot*. 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*.

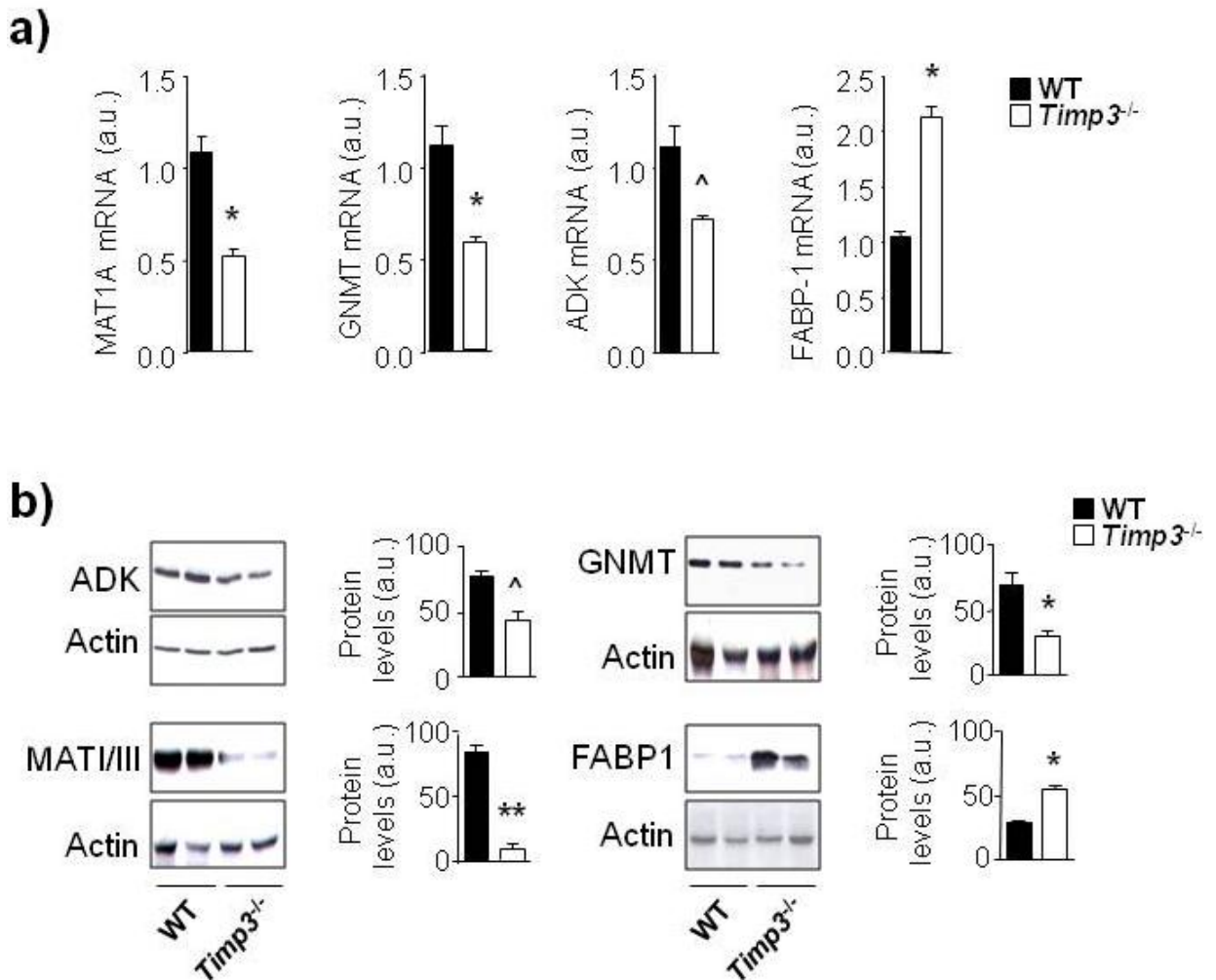
## 6. La diade TACE/Timp-3 è coinvolta nella regolazione del metabolismo epatico.

I risultati dell'analisi bioinformatica hanno messo in evidenza che molte delle proteine espresse a livelli differenti nei topi *Timp-3*<sup>-/-</sup> sottoposti a dieta grassa rispetto ai topi di controllo possono essere associate con patologie a carico del fegato, ed in particolare sono coinvolte nel metabolismo epatico della metionina. Poiché le analisi istologiche degli stessi fegati avevano evidenziato

un grado di steatosi più severo nei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* rispetto ai WT, negli esperimenti successivi sono state analizzate in particolare alcune proteine che sono note svolgere un ruolo nel metabolismo epatico della metionina e la cui alterazione porta alla comparsa di steatosi in modelli animali. Tali proteine sono ADK (*adenosine kinase*), GNMT (*glycine N-methyl transferase*) e MATI/III (*methionine adenosyltransferase I/III*), la cui espressione risulta diminuita nei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* rispetto ai WT, e FABP-1 (*fatty acid-binding protein 1*), la cui espressione è invece aumentata nei topi *TIMP-3<sup>-/-</sup>* rispetto agli animali di controllo.

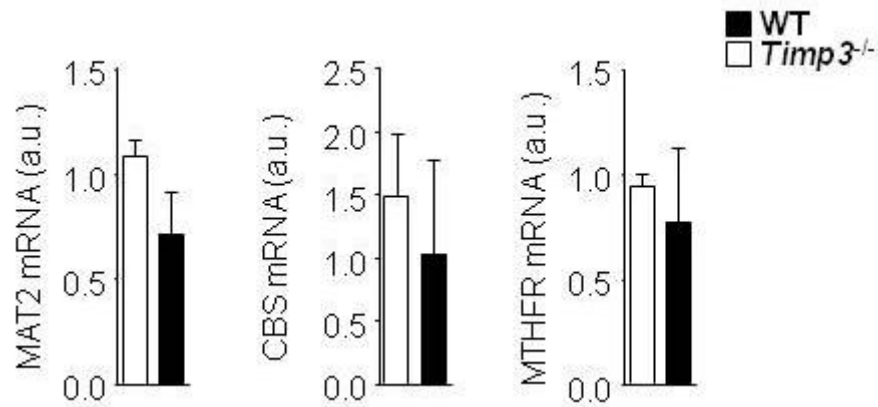
Dati di letteratura indicano infatti che i topi KO per il gene *adk* sviluppano steatosi epatica già nei primi giorni dopo la nascita a causa di un difetto nel metabolismo dell'adenosina; la mancanza di MATI/III causa nei topi steatosi di secondo grado e un aumento nei livelli di metionina con corrispondente diminuzione dei livelli di S-adenosilmetionina (SAM), mentre nei topi *gnmt* KO risultano aumentati sia i livelli di metionina sia quelli di SAM, e queste alterazioni portano comunque allo sviluppo di steatosi epatica ed epatocarcinoma. Al contrario, i topi KO per il gene *fabp1* risultano protetti dalla steatosi epatica indotta da dieta grassa.

Per confermare i risultati ottenuti tramite analisi proteomica, dai fegati di topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* e WT sono stati estratti l'RNA e le proteine che sono stati utilizzati per valutare l'espressione dei 4 geni in analisi rispettivamente tramite PCR quantitativa (*real time PCR*) e *western blot*. Come illustrato nella figura 32, l'espressione di ADK, GNMT e MATI/III risulta effettivamente diminuita nel fegato dei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* rispetto ai WT, sia a livello di RNA messaggero (fig. 32a) che a livello di proteina (fig. 32b); anche nel caso di FABP-1, i risultati dell'analisi biochimica hanno confermato i dati di proteomica, evidenziando un aumento dell'espressione proteica e del messaggero.



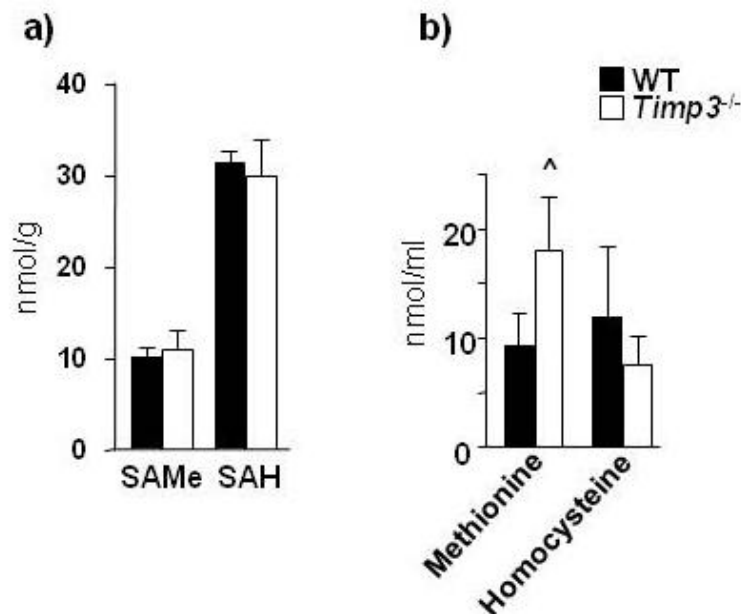
**Figura 32. Modulazione dell'espressione delle proteine individuate mediante analisi proteomica.** Dai fegati di topi WT e *Timp3*<sup>-/-</sup> a dieta grassa sono stati estratti RNA e proteine, e l'espressione di ADK, MATI/III, GNMT e FABP-1 è stata analizzata mediante PCR quantitativa (a) e *western blot* (b). n = 3, \*\* = p < 0,005, \* = p < 0,05, ^ = p = 0,06

Inoltre sono stati presi in analisi anche altri geni che svolgono ruoli importanti nel metabolismo della metionina, ma che non sono stati messi in evidenza dall'analisi proteomica, come MATII (methionine adenosyltransferase II), CBS (cystathionine- $\beta$ -synthase) e MTHFR (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase) (fig.14). Effettivamente, l'espressione di tali geni non risulta variata tra i topi *Timp3*<sup>-/-</sup> e i WT, a dimostrazione del fatto che la modulazione osservata per le altre proteine possa essere direttamente dipendente dalla mancanza di Timp-3 e dalla conseguente attivazione costitutiva di TACE (fig. 33).



**Figura 33. Analisi di altri geni coinvolti nel metabolismo della metionina in topi *Timp3*<sup>-/-</sup>.** L'espressione dei geni *mat2a*, *cbs* e *mthfr* è stata misurata tramite PCR quantitativa nei fegati di topi WT e *Timp3*<sup>-/-</sup> a dieta grassa. n = 3.

Sono state infine misurate anche le quantità di S-adenosilmetionina (SAM) ed S-adenosilomocisteina (SAH) nel fegato dei due gruppi di animali, insieme ai livelli sierici di metionina ed omocisteina (fig. 34): sebbene i livelli di SAM e SAH risultino pressochè invariati, è stato possibile apprezzare un aumento nei livelli di metionina nel sangue dei topi *Timp3*<sup>-/-</sup> rispetto ai WT, a conferma di un'alterazione del metabolismo di questo aminoacido negli animali *knock out*.



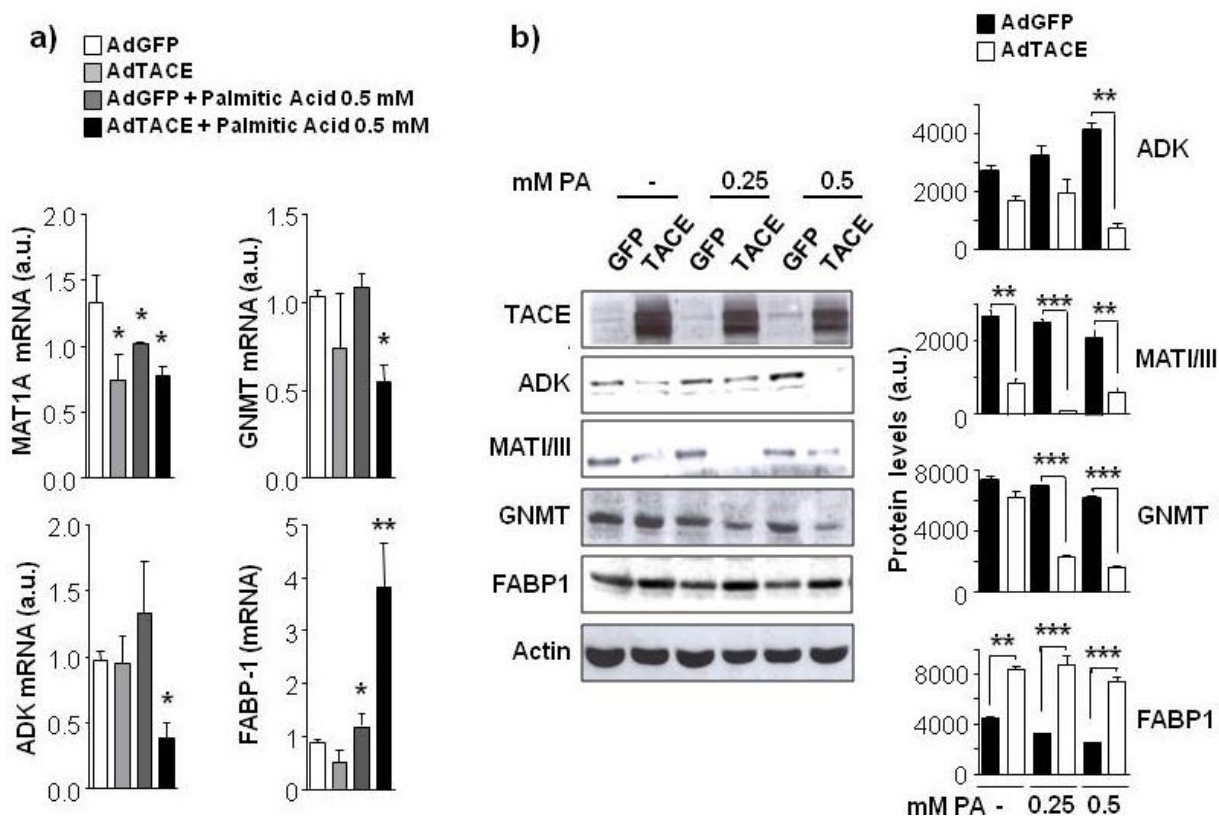
**Figura 34. Livelli di S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilomocisteina (SAH), metionina ed omocisteina in topi *Timp3*<sup>-/-</sup> a dieta grassa.** I livelli di SAM e SAH sono stati misurati in estratti proteici di fegato di topi WT e *Timp3*<sup>-/-</sup>, mentre le quantità di metionina ed omocisteina sono state valutate nel sangue degli stessi topi. n = 3, <sup>^</sup> p = 0,06.



## 7. L'attività di TACE è responsabile dei difetti metabolici osservati nei topi Timp-3<sup>-/-</sup>.

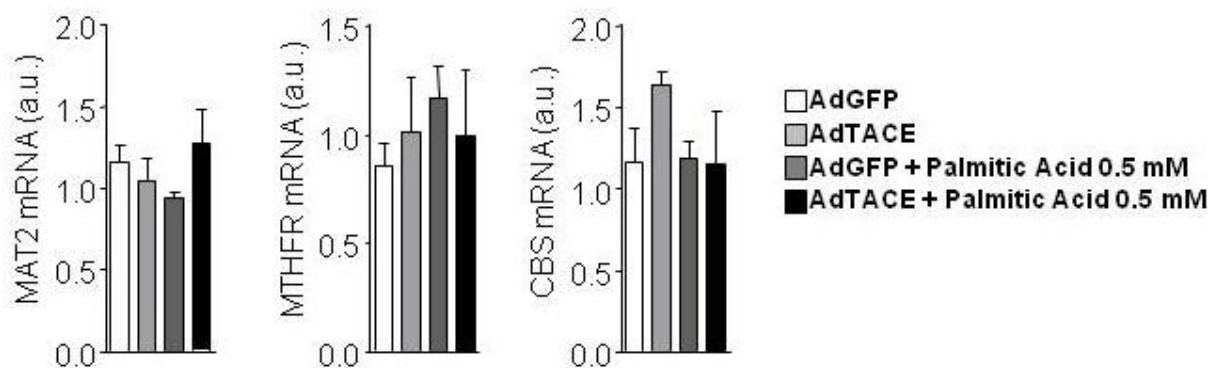
Poiché Timp-3 è in grado di inibire l'attività di taglio di diverse famiglie di proteasi di membrana, abbiamo voluto verificare che il fenotipo steatosico dei topi Timp-3<sup>-/-</sup> sottoposti a dieta grassa e la modulazione delle proteine appena descritta fossero effettivamente e specificamente dovuti ad una iperattivazione di TACE in assenza del suo inibitore fisiologico Timp-3. A tale scopo abbiamo ricreato in un sistema *in vitro* di colture cellulari le stesse condizioni che si riscontrano *in vivo* negli animali a dieta grassa. Epatociti murini sono stati infettati con un adenovirus contenente il cDNA di TACE (adeno-TACE) in modo da ottenere una sovra espressione della proteina, sovra espressione che, come abbiamo già evidenziato (fig. 22a), risulta nella attivazione costitutiva dell'enzima. In tal modo abbiamo ricostituito il fenotipo dei topi Timp-3<sup>-/-</sup> che sono caratterizzati da una attività proteolitica di TACE non più regolata. Inoltre gli epatociti sono stati trattati con quantità crescenti di acido palmitico (0,25mM e 0,5mM) per tutta la notte, per mimare il carico di acidi grassi a cui è sottoposto il fegato in seguito ad una dieta ricca in lipidi. Come controlli sono stati utilizzati sia epatociti infettati con adeno-TACE ma non trattati, sia cellule infettate con un virus codificante per la GFP (*green fluorescent protein*) e trattate. L' RNA messaggero e le proteine estratti sono state analizzate rispettivamente tramite PCR quantitativa e *western blot* per verificare i livelli di espressione delle proteine identificate dagli studi di proteomica. Come illustrato nella figura 35, la sola sovra espressione di TACE è già sufficiente a far diminuire l'espressione di ADK e MATI/III, mentre la sinergia tra la sovra espressione di TACE ed il trattamento con acido palmitico determina una diminuzione dell'espressione di GNMT, sia a livello di RNA che di proteina, confermando i dati ottenuti sui topi Timp-3<sup>-/-</sup>. Anche per quanto riguarda

FABP1 i dati ottenuti *in vitro* risultano sovrapponibili a quelli *in vivo*, in quanto evidenziano un aumento dell'espressione di questa proteina in presenza di TACE e di acido palmitico.



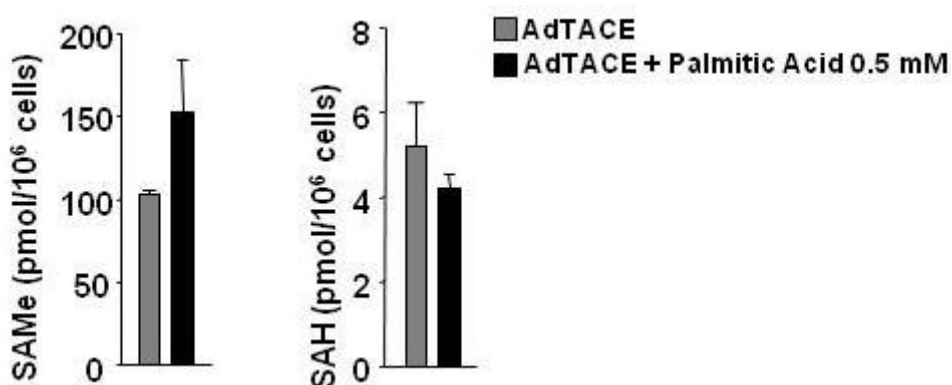
**Figura 35. Effetto dell'attività di TACE sull'espressione dei geni identificati mediante l'analisi proteomica.** Gli epatociti sono stati infettati con un adenovirus codificante per TACE e GFP e, come controllo, con un adenovirus contenente solo la GFP. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di acido palmitico (0,25 e 0,5 mM) *overnight*, e poi è stato preparato l'RNA e le proteine per analizzare l'espressione di ADK, MATI/III, GNMT e FABP1 sia a livello di RNA messaggero (a) che di proteina (b). n = 3, \*\*\* = p < 0,001, \*\* = p < 0,005, \* = p < 0,05.

Inoltre, la specificità dell'azione di TACE è dimostrata dal fatto che altre proteine che giocano ruoli importanti nel metabolismo della metionina come CBS, MTHFR E MATII non vengono modulate dalla presenza dell'enzima attivato (fig. 36).



**Figura 36. Analisi di altri geni coinvolti nel metabolismo della metionina in epatociti.** L'espressione dei geni *mat2a*, *cbs* e *mthfr* è stata misurata tramite PCR quantitativa in epatociti infettati con adeno-GFP e adeno-TACE e trattati con acido palmitico *overnight*. n = 3.

L'analisi dei livelli di SAM e SAH negli estratti cellulari indica anche in questo caso solo una tendenza all'aumento dei livelli di S-adenosilmetionina in presenza di TACE e in seguito al trattamento con acido palmitico, suggerendo che l'effetto di TACE sul metabolismo della metionina potrebbe essere indiretto e mediato probabilmente dalla lipotossicità (fig 37).



**Figura 37. Livelli di S-adenosilmetionina (SAM) ed S-adenosilomocisteina (SAH), in epatociti.** I livelli di SAMe e SAH sono stati misurati in estratti proteici di epatociti infettati con adeno-GFP e adeno-TACE e trattati con acido palmitico *overnight*.

# DISCUSSIONE

Il sistema metabolico e quello immune hanno una origine evolutiva comune e sono tuttora interdipendenti sia dal punto di vista strutturale che funzionale; questo fa sì che la risposta immunitaria e la regolazione del metabolismo siano strettamente integrate e che le loro singole funzioni risultino dipendenti l'una dall'altra. Insieme costituiscono un sistema centrale di omeostasi, e qualunque alterazione a carico di tale sistema porta allo sviluppo di disordini metabolici cronici, come obesità, diabete di tipo 2 ed aterosclerosi. Tutte queste patologie sono strettamente associate con uno stato di infiammazione cronica di basso grado (Wellen & Hotamisligil, 2005; Hotamisligil *et al.*, 2006) e nel loro insieme costituiscono la cosiddetta "sindrome metabolica". Recentemente è stato dimostrato che la steatosi epatica (NAFLD, *non alcoholic fatty liver disease*) è anch'essa associata ad obesità ed insulino-resistenza, e viene oggi considerata come la manifestazione epatica della sindrome metabolica.

Considerando questa stretta correlazione, nel nostro laboratorio ci siamo interessati al ruolo della diade TACE/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 TACE. Quest'ultima è una proteina in grado di modulare l'attività di una vasta gamma di substrati, attraverso il taglio proteolitico della loro porzione extracellulare, in un processo denominato *shedding*; in particolare, TACE è il principale enzima responsabile del taglio del TNF $\alpha$ . Questa citochina svolge un ruolo importante nella patogenesi della NAFLD grazie alla sua capacità di attivare diverse vie di trasduzione del segnale

coinvolte in processi infiammatori, come quella regolata dal fattore di trascrizione Nf- $\kappa$ b, ed influenza anche gli effetti dell'insulina attraverso l'attivazione delle chinasi IKK $\beta$  e JNK (Tilg & Moschen, 2008).

Recentemente nel nostro laboratorio è stato dimostrato che in topi *Insr*<sup>+/-</sup> *Timp-3*<sup>-/-</sup> sottoposti a dieta grassa, 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 steatosi epatica (Federici *et al.*, 2005; Menghini *et al.*, 2008). Nell'ambito di questo progetto di ricerca, nel presente lavoro è stato analizzato il contributo 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, ipotizzando che il ruolo di *Timp-3* nella modulazione dell'insulino-resistenza fosse associato, almeno in parte, alla sua funzione di inibitore di TACE.

I nostri studi hanno dimostrato che l'attivazione di TACE gioca un ruolo importante nello sviluppo della steatosi epatica e nella degenerazione tissutale che ne consegue. Il fegato è infatti risultato essere il primo tessuto in cui l'attività dell'enzima aumenta in seguito allo stress metabolico causato da una dieta ricca in grassi. L'attivazione di TACE è dovuta sia a segnali intracellulari mediati dalla protein chinasi C e da ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), sia ad una riduzione dell'espressione dell'inibitore fisiologico dell'enzima, *Timp-3*, che è stata riscontrata in vari tessuti di topi mantenuti a dieta grassa per 20 settimane. Studi *in vitro* su colture di epatociti hanno inoltre messo in evidenza che TACE può essere attivato da diversi stimoli metabolici come l'acido palmitico, il lipopolisaccaride e da alte concentrazioni di glucosio o di insulina; tali trattamenti ricapitolano le alterazioni metaboliche che si producono nell'organismo durante un regime prolungato di dieta grassa. L'attivazione di TACE *in vitro* è in grado di interferire con il segnale di trasduzione attivato

dall'insulina, determinandone un'attenuazione, come dimostrato dalla diminuita fosforilazione di Akt, FoxO1 e GSK3, i principali regolatori della gluconeogenesi e della lipogenesi, in seguito a stimolo insulinico in epatociti che sovra esprimono TACE. Sebbene l'aumentata produzione di TNF $\alpha$  possa spiegare questo effetto sul segnale insulinico e ricondurre quindi alla steatosi epatica, è possibile che anche altri substrati tagliati da TACE possano svolgere un ruolo.

Per studiare *in vivo* gli effetti dell'attivazione di TACE sul metabolismo epatico, abbiamo utilizzato come modello animale i topi Timp-3<sup>-/-</sup> che sono caratterizzati da una aumentata attività di TACE nel fegato. Poiché i nostri dati *in vitro* avevano indicato che stimoli metabolici sono in grado di indurre l'attivazione dell'enzima, abbiamo sottoposto i topi Timp-3<sup>-/-</sup> a stress metabolico prolungato (cioè una dieta ricca in grassi per 20 settimane); i risultati ottenuti hanno dimostrato che l'attivazione continua e non più regolata di TACE contribuisce alla degenerazione epatica. Le istologie epatiche dei topi Timp-3<sup>-/-</sup> 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. Questi risultati possono essere spiegati almeno in parte dall'aumentata espressione nei topi Timp-3<sup>-/-</sup> di alcuni fattori di trascrizione coinvolti nella lipogenesi, come LXR $\alpha$  e Chrebp1, e dal conseguente incremento nell'espressione di alcuni dei geni regolati da questi fattori di trascrizione come FAS e SCID-1.

Poiché TACE regola diversi fattori potenzialmente implicati nell'infiammazione, nell'omeostasi metabolica, nella fibrosi e nella regolazione del ciclo cellulare, abbiamo ritenuto che l'approccio più adeguato per

identificare le molecole potenzialmente responsabili del fenotipo steatosico dei topi  $Timp-3^{-/-}$  in un contesto di obesità indotta da dieta grassa fosse quello della proteomica *shotgun*. Questa tecnica permette infatti di effettuare uno *screening* quantitativo su larga scala di tutte le proteine espresse in un determinato contesto sperimentale. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che l'approccio proteomico, unito ad un'accurata analisi bioinformatica, costituisce uno strumento utile per l'identificazione di nuove proteine coinvolte nella patogenesi della NAFLD (Calvert et al., 2007; Diamond et al., 2006).

L'analisi in nLC-ESI-MSe di estratti proteici derivanti da fegati di topi WT e  $Timp-3^{-/-}$ , entrambi sottoposti ad un regime di dieta grassa, ha permesso l'identificazione delle proteine espresse in maniera differenziale nei due genotipi. 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, rispetto ai controlli WT.

Abbiamo quindi utilizzato il programma di bioinformatica *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) per identificare le patologie statisticamente correlate con le proteine identificate; tale programma ha associato alcune di queste proteine con diverse patologie epatiche, come la fibrosi, l'infiammazione, la steatosi, la colestasi e l'iperbilirubinemia, confermando quindi la validità delle nostre osservazioni. Per confermare le evidenze fornite dall'analisi proteomica, abbiamo concentrato la nostra attenzione su quelle molecole che, oltre ad essere state messe in evidenza dall'analisi bioinformatica, fossero riconducibili a patologie epatiche, ed in particolare la steatosi, anche da dati di letteratura. Sebbene non sia possibile escludere che anche altre proteine, fra quelle espresse in maniera differenziale nei fegati di topi WT e  $Timp-3^{-/-}$  contribuiscano al conferimento del fenotipo steatosico negli animali *knock out*, è stato possibile riconoscere un gruppo di proteine, la cui espressione risulta

diminuita nei topi  $Timp-3^{-/-}$ , coinvolte nel metabolismo della metionina. Anomalie nei meccanismi di trans-sulfurazione e trans-metilazione nel fegato sono state associate a NAFLD in modelli animali (Kharbanda, 2007): in particolare, tra le proteine la cui espressione risulta diminuita in maniera significativa nel fegato di topi  $Timp-3^{-/-}$  rispetto ai WT c'è ADK (*adenosine kinase*), il principale enzima responsabile della rimozione dell'adenosina (Ado) nel fegato, che dati di letteratura descrivono implicata nella protezione da steatosi epatica proprio attraverso la regolazione dei livelli epatici di adenosina (Boison, 2002). Inoltre, l'espressione di altre due proteine coinvolte nel ciclo della metionina, MAT1/III e GNMT, è significativamente diminuita nei topi  $Timp-3^{-/-}$ . Anche in questo caso, dati di letteratura sui topi *knock out* per questi enzimi supportano la nostra ipotesi. Infatti la mancanza di MAT1/III porta a steatosi macrovescicolare con una diminuzione nei livelli di S-adenosilmetionina (SAM) ed un aumento in quelli di metionina (Lu, 2001). Anche la mancanza di GNMT determina steatosi e epatocarcinoma e comporta un aumento di SAM e di metionina (Martinez-Chantar, 2008).

Tra le proteine che risultano più espresse nel fegato dei topi  $Timp-3^{-/-}$  rispetto ai WT è stata evidenziata FABP-1; i topi *knock out* per questa proteina risultano protetti dalla steatosi epatica indotta da una dieta ricca in grassi (Newberry, 2006), e questo fenotipo è in accordo con la nostra ipotesi secondo la quale un aumento nei livelli di FABP-1, come riscontrato nei topi  $Timp-3^{-/-}$ , contribuisce al contrario a predisporre gli animali alla steatosi.



## CONCLUSIONI

Nell'ambito di questo progetto di ricerca sono state effettuate analisi metaboliche e istologiche su topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* 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' stato inoltre condotto 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 messo in evidenza soprattutto la modulazione di proteine coinvolte nel metabolismo della metionina e nel metabolismo lipidico, che potrebbero cooperare nell'induzione della steatosi epatica riscontrata.

E' stato inoltre evidenziato che il fenotipo dei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* è in buona parte dovuto all'attivazione costitutiva dell'enzima TACE che si realizza in assenza del suo inibitore fisiologico. Tale condizione può giustificare il peggioramento della condizione d'insulino-resistenza riscontrata nei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* ad HFD rispetto ai WT, a causa dell'aumento nello shedding del  $TNF\alpha$  con conseguente attivazione delle chinasi JNK e  $IKK-\beta$  che inibiscono il segnale insulinico.

La definizione del ruolo di TACE e Timp-3 nella regolazione del metabolismo della metionina richiederà ulteriori studi, sebbene l'osservazione dell'aumento dei livelli di metionina nei topi *Timp-3<sup>-/-</sup>* a dieta grassa accomuna questi animali ai topi *mat1a<sup>-/-</sup>* e *gnmt<sup>-/-</sup>*, suggerendo quindi che questi geni possano giocare un ruolo nel fenotipo osservato.

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che TACE possa essere un nuovo regolatore del metabolismo epatico che viene attivato quando si realizzano condizioni di tossicità metabolica, dovute ad esempio ad un regime prolungato di dieta grassa, e contribuisce allo sviluppo della NAFLD attraverso meccanismi multipli.

## BIBLIOGRAFIA

- Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 231-240, 1996.
- 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* 296: E581-591, 2009.
- 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
- Calvert VS, Collantes R, Elariny H, Afendy A, Baranova A, Mendoza M, Goodman Z, Liotta LA, Petricoin EF, Younossi ZM. A system biology approach to the pathogenesis of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease using reverse phase protein microarrays for multiplexed cell signaling analysis. *Hepatology* 46: 166-172, 2007
- Calvisi DF, Simile MM, Ladu S, Pellegrino R, De Murtas V, Pinna F, Tomasi ML, Frau M, Virdis 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, Peiretti 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.

- Demozay D, Rocchi S, Mas JC, Grillo S, Pirola L, Chavey C, Van Obberghen E. Fatty aldehyde dehydrogenase: potential role in oxidative stress and regulation of its gene expression by insulin. *J Biol Chem* 279: 6261-6270, 2004
- Diamond DL, Proll SC, Jacobs JM, Chan EY, Camp DJ, Smith RD, Katze MG. HepatoProteomics: applying proteomic technologies to the study of liver function and disease. *Hepatology* 44: 299-308, 2006
- Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Esparis-Ogando A, Yuste L, Pandiella A. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor  $\alpha$ -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- $\alpha$  converting enzyme. *J Biol Chem* 275: 14598-14607, 2000.
- 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- $\alpha$ . *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.
- 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.
- 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, Shargill NS and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91, 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.

- 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 nonalcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 23: S16-S24, 2008.
- 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 desorbition of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Proc* 78: 53-68, 1987.
- 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.
- 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.
- Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, Mato JM. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 5560-5565, 2001.
- Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J. Mol. Med.* 87:679-695, 2009
- 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.
- 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* 136: 663-672, 2009.
- Mezyk R, Bzowska M, Bereta J. Structure and function of tumor necrosis factor- $\alpha$  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<sup>-/-</sup> 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  $\alpha$  convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2 $\beta$ . *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, Xie Y, Kennedy SM, Luo J, Davidson NO. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* 44:1191-1205, 2006.
- 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 JJ, Zalevsky J, Dahiyat B, Chi N, Olefsky JM. JNK and tumor necrosis factor- $\alpha$

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, 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.
- Parech S and Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implication for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 132: 2191-2207, 2007.
- 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, Nalbhone 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.
- Pols TWH, Ottenhoff R, Vos M, Levels JHM, Quax PHA, Meijers JCM, Pannekoek H, Groen AK, de Vries CJM. Nur77 modulates hepatic lipid metabolism through suppression of SREBP1c activity. *Biochem Biophys Res Commun* 366:910-916, 2008

- 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 $\alpha$  interaction. *Nature* 423: 550-55, 2003.
- Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 21: 1443-1455, 2007.
- Qui JH, Ebrahem 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.
- Rother KI, Imai Y, Caruso M, Beguinot F, Formisano P, Accili D. Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *J Biol Chem* 273: 17491-17497, 1998.
- Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *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.
- Sanderson LM, Degenhardt T, Koppen A, Kalkhoven E, Desvergne B, Muller M, Kersten S. PPAR $\beta/\delta$  but not PPAR $\alpha$  serves as plasma free fatty acids sensor in liver. *Mol Cell Biol*.doi:10.1128/MCB.00370-09, 2009
- 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.
- Seedorf U, Aberle J. Emerging role of PPAR $\delta$  in metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1771: 1125-1131, 2007
- 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- $\alpha$  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.

- 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.
- Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee MS, Karin M. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK mediated phosphorylation of insulin receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16454-16459, 2006.
- Soond SM, Everson B, Riches DW, Murphy G. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF $\alpha$ -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.
- 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.
- 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.

- Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 19: 371-379, 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.
- Uysal, KT, Wiesbrock, SM, Marino, MW, Hotamisligil, GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* 389, 610–614 (1997).
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2: 827-839, 2003.
- Wang W, Kramer PM, Yang S, Pereira MA, Tao L. Reverse-phase high performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl* 762:59-65, 2001.
- 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- $\alpha$ -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.
- Wortham M, He L, Gyamfi M, Copple BL, Wan JY. The transition from fatty liver to NASH associates with SAMA depletion in db/db mice fed a methionine cholinedeficient 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.
- Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, Del Giacco L, Schlauch K, Born TL, Elariny H, Gorreta F, VanMeter A, Younoszai A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 42: 665-674, 2005.
- 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, 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*, 15:303-305, 2001.
- Zheng Y, Schlondorff J, Blobel CP. Evidence for regulation of the tumor necrosis factor  $\alpha$ -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

Vorrei ringraziare innanzitutto il professor Massimo Federici per avermi accolto nel suo laboratorio ed avermi dato l'opportunità di sviluppare questa tesi, e per avermi supportato con suggerimenti e discussioni sempre proficue.

Ringrazio inoltre Valeria Marzano, Maurizio Ronci ed il professor Andrea Urbani del laboratorio di proteomica all'EBRI per aver contribuito con le loro conoscenze specifiche alla realizzazione di questo lavoro.

Sono anche grata a tutti i membri del laboratorio di Medicina Molecolare per il tempo (tanto!) trascorso insieme, e a tutti i colleghi del piano con cui ho chiacchierato di scienza e non solo.

Infine il mio pensiero va a mio marito e alla mia bimba, che sono e saranno sempre la mia ancora di salvataggio nel mare purtroppo burrascoso della ricerca scientifica italiana, e ai miei genitori e i miei fratelli che, pur pensando che un giorno dovrei cominciare a fare qualcosa di serio, hanno sempre assecondato la mia passione per questo lavoro.