

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

DOTTORATO DI RICERCA
in
“Metodologia Clinica ed Endocrinologia”
XX Ciclo

**"OBESITÀ, INSULINO RESISTENZA E NUOVE
MOLECOLE SEGNALE:
STUDI NELL'UOMO E IN MODELLI
ANIMALI"**

Direttore: *Ch.mo Prof. S. Todesco*
Supervisore: *Ch.mo Prof. R. Vettor*

Dottoranda: *Francesca Favaretto*

31 gennaio 2008

INDICE

RIASSUNTO	p. 1
SUMMARY	p. 3
INTRODUZIONE	p. 5
SCOPO	p. 17
MATERIALI E METODI	p. 18
INTRODUZIONE (I)	p. 32
RISULTATI (I)	p. 37
DISCUSSIONE (I)	p. 41
INTRODUZIONE (II)	p. 45
RISULTATI (II)	p. 48
DISCUSSIONE (II)	p. 53
BIBLIOGRAFIA	p. 60

APPENDICE 1 *figure*

APPENDICE 2 *kegg pathways*

APPENDICE 3 *tabelle*

RIASSUNTO

INTRODUZIONE (I):

E' oggi noto che i nucleotidi presenti a livello dello spazio extracellulare, primo tra tutti l'ATP, possano funzionare come mediatori di comunicazione e il loro estensivo studio ha portato all'identificazione di una classe di recettori cellulari: i recettori purinergici P2. Nucleotidi liberati nell'ambiente extracellulare sono stati correlati all'innesco e alla regolazione dei processi infiammatori. Il tessuto adiposo costituisce un vero e proprio organo endocrino in grado di secernere molti fattori tra cui citochine anti e pro infiammatorie. Negli ultimi anni l'obesità è stata definita come stato infiammatorio cronico di basso grado ed associato alla presenza di un infiltrato flogistico.

A causa della stretta relazione che intercorre tra il sistema infiammatorio/macrofagico e il tessuto adiposo è possibile ipotizzare esista un sistema di comunicazione mediato dalla classe recettoriale P2, tra cellule infiammatorie e adipociti, coinvolto nel complesso meccanismo che determina e mantiene l'infiammazione.

SCOPO E METODI(I):

Caratterizzazione molecolare nel tessuto adiposo (TA sottocutaneo e viscerale, in preadipociti e adipociti) dei diversi sottotipi recettoriali P2 mediante RT-PCR e qPCR e sequenziamento. Valutazione della funzionalità recettoriale in adipociti umani con sonde fluorescenti sensibili alla concentrazione di calcio intracellulare. Dosaggio immunoenzimatico della secrezione di citochine pro-infiammatorie (IL6) stimolata da agonisti di recettori purinergici (ATP) in colture primarie di adipociti. Valutazione della presenza di ATP in colture primarie di adipociti.

RISULTATI E DISCUSSIONE(I):

L'analisi di espressione ha dimostrato la presenza dei diversi recettori P2 nei campioni di tessuto adiposo analizzati. Due tipi recettoriali (P2Y6 e P2Y12) mostrano avere livelli di espressione diversi tra frazione vasculo-stromale e adipocita maturo, dato osservabile sia nell'isolamento diretto delle due componenti che nelle colture primarie.

Lo stimolo di cellule adipose differenziate in vitro con ATP ha permesso di evidenziare un incremento dose dipendente della secrezione basale di IL-6.

La misurazione di dei livelli di ATP ci ha consentito di osservare la sua presenza nel medium di colture primarie di adipociti.

Partendo da queste evidenze, possiamo ipotizzare un coinvolgimento del sistema recettoriale purinergico in meccanismi correlati alle caratteristiche infiammatorie dell'obesità.

INTRODUZIONE (II):

La sindrome di Alström è una malattia genetica rara a trasmissione autosomica recessiva, causata da mutazioni nel gene *ALMS1*. Le manifestazioni cliniche includono diversi quadri sintomatologici che dimostrano il coinvolgimento di vari organi e sistemi, determinando una diversità di espressione fenotipica comprendendo anche lo sviluppo di obesità, insulino-resistenza con propensione all'evoluzione verso il diabete di tipo 2.

SCOPO e METODI(II):

Valutazione del profilo di espressione genica in fibroblasti derivanti da soggetti affetti dalla sindrome Alström mediante un esperimento di DNA microarray. Valutazione della sensibilità insulinica in colture primarie di fibroblasti con saggi di incorporazione del glucosio.

Realizzazione di un nuovo modello murino per la sindrome di Alström mediante inserzione di una cassetta gene trap a livello dell'introne 7 del gene. Caratterizzazione genotipica mediante PCR e fenotipica attraverso la valutazione di peso, livelli plasmatici di glucosio e insulina.

RISULTATI E DISCUSSIONE(II):

La valutazione del profilo di espressione genica in pazienti ALMS ci ha consentito di osservare la modulazione di geni coinvolti nel ciclo cellulare, nella organizzazione della matrice extracellulare, nella motilità cellulare, nel pathway insulinico.

La valutazione della sensibilità insulinica, mediante misurazione della captazione di 2-desossi-glucosio triziato ci ha consentito di osservare che i fibroblasti dei pazienti ALMS mostrano una risposta dose dipendente dallo stimolo insulinico, non divergente da quello dei controlli.

La caratterizzazione di un nuovo modello murino per la sindrome di Alström ha messo in evidenza che l'interruzione nell'introne 7 del gene determina la letalità embrionale. La caratterizzazione di alcuni parametri metabolici nel topo eterozigote ha evidenziato l'assenza di differenze rispetto all'animale wild type. La valutazione svolta durante l'embriogenesi non ci ha consentito di identificare alcun omozigote per la mutazione fino al 7.5 giorno post concepimento. Questo studio è stato da me condotto presso il Jackson Laboratory (Bar Harbor, MN, U.S.A.).

Questi risultati suggeriscono che il gene *Alms1* potrebbe svolgere importanti funzioni per meccanismi di particolare rilievo per lo svolgimento delle normali attività cellulari. Di particolare interesse risulta essere la letalità embrionale in quanto suggerisce che il gene potrebbe svolgere un'attività fondamentale durante l'embriogenesi.

SUMMARY

BACKGROUND (I):

It is known that purine and pyrimidine nucleotides, especially ATP, are located in the extracellular space, and they exert roles in cell communication. Extensive studies in this field allowed the identification of a novel receptor class: the P2 purinergic receptors.

Recent findings related extracellular nucleotides with triggering and regulation of inflammatory events. It is now recognized that adipose tissue is an endocrine organ and it is able to release several kind of pro- and anti-inflammatory cytokines. Recently, obesity appears a chronic low grade inflammation and macrophages are identified surrounding adipocytes.

Because of the close relationship between immune system and adipose tissue we assume a communication among adipocytes and inflammatory cells, mediated by P2 purinergic receptors.

AIM and METHODS(I):

Molecular characterization of P2 receptors in several adipose tissue depots (subcutaneous, visceral, preadipocytes/stromal vascular fraction and adipocytes) by RT-PCR, qPCR and sequencing. Receptor activity evaluation in human adipocytes using a fluorescent dye Ca^{2+} sensitive. Measurement in primary adipocyte cultures of ATP stimulated IL6 release by immunoenzymatic assay. Evaluation of ATP levels in primary adipocyte cultures by luminometric assay.

RESULTS(I):

Expression analysis showed that P2 receptor mRNAs are transcribed in adipose tissue samples we analyzed. Interestingly P2Y6 and P2Y12 are differentially expressed among stromal vascular fraction and mature adipocytes gene expression, both *in vitro* that *ex vivo*. These receptors are also functionally active in adipose cells because they are able to induce a cytosolic Ca^{2+} mobilization.

Adipocytes from human primary cultures stimulated with ATP highlighted an IL6 secretion, which increased in a dose dependent manner.

We used a luminescent assay to evaluate if adipocytes are able to release ATP, we observed that ATP is present in the culture media from an *in vitro* adipose differentiation.

These evidences highlighted P2 receptor and nucleotide roles in adipose tissue and suggest an involvement in the mechanism related with low grade inflammation in obesity.

BACKGROUND(II):

Alström syndrome is a rare recessive disease caused by disruption of *ALMS1* gene. ALMS protein localized within the centrosomes. Clinical features include numerous symptoms involving different tissues and organs showing an high phenotypic variability. Features include obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes.

AIM AND METHODS(II):

We evaluated global gene expression in ALMS dermal fibroblasts using DNA microarrays. We also evaluated ALMS fibroblast's insulin-sensitivity using a glucose uptake assay.

We realized and analyzed a new gene trap *Alms* mouse model, producing *Alms1* disruption in the intron 7. Genomic characterization was assessed by PCR and phenotypic features are evaluated measuring body weight, plasmatic glucose and insulin levels.

RESULTS(II):

Gene expression analysis revealed a modification in genes coding proteins cell cycle related, extracellular matrix, cellular movement and insulin pathway. ALMS fibroblasts displayed an insulin-sensitivity dose dependent and as fibroblasts from control subjects.

The mutation in intron 7 caused embryonic lethality in a new Alström mouse model. The heterozygous mice showed normal body weight, glucose and insulin levels compared to wild type mice. We weren't able to identify any mutants until 7.5 days embryos, suggesting an earlier lethality. This study was carried out at The Jackson Laboratory (Bar Harbor, MN, U.S.A.). These results suggest a very important role for *Alms1* gene, implying a possible involvement in basic cellular functions. Significantly, embryonic lethality reveals that *Alms1* can exert a central role during embryogenesis.

INTRODUZIONE

Il tessuto adiposo: Cenni su funzioni e caratteristiche

Il tessuto adiposo è stato ignorato a lungo da fisiologi e anatomisti perché considerato unicamente come sede di riserva energetica. Negli ultimi vent'anni però c'è stato un aumento di interesse, dovuto all'aumento dell'incidenza dell'obesità e delle complicanze ad essa associate.

Questo ha consentito di riconoscere che il tessuto adiposo prende parte al mantenimento dell'omeostasi di numerosi processi biologici.

Esso è infatti coinvolto sia nella regolazione della massa grassa e nell'omeostasi dei nutrienti che nella risposta immunitaria, nel controllo della pressione sanguigna, nell'emostasi, nel controllo delle funzioni tiroidee e del sistema riproduttivo. Questi processi sono coordinati principalmente attraverso la sintesi e il rilascio di ormoni da parte degli adipociti stessi. (Ahima and Flier, 2000; Carey et al., 1996; Kershaw and Flier, 2004).

L'equilibrio tra accumulo e mobilizzazione dei trigliceridi nel tessuto adiposo è prevalentemente sotto il controllo del flusso sanguigno, dell'innervazione tissutale e di numerosi ormoni.

La lipolisi dipende principalmente dall'azione della lipasi ormono-sensibile (HSL, Hormone-Sensitive Lipase), enzima che idrolizza i trigliceridi liberando FFA (free fatty acid) e glicerolo (Jaworski k 2007). Gli acidi grassi vengono utilizzati dalla maggior parte dei tessuti quando il glucosio non è presente in concentrazione sufficiente. L'attività dell'enzima è determinata dalla sua fosforilazione e gli ormoni che influenzano la lipolisi agiscono proprio regolando questo stato. Il principale meccanismo di regolazione avviene attraverso l'attivazione della protein-chinasi A (PKA, Protein Kinase A) cAMP dipendente, che diventa funzionale in seguito all'aumento dei livelli di cAMP intracellulare derivanti dalla stimolazione dell'adenilato ciclasi. Tuttavia esistono altre protein chinasi che mediano la fosforilazione di HSL, come MAPK (mitogen-activated protein kinase) e AMPK (AMP-activated protein kinase).

L'azione di HSL è facilitata anche dalla proteina perilipina che si trova in stretta associazione con le vescicole lipidiche degli adipociti. Questa dovrebbe svolgere la sua azione attraverso la promozione della traslocazione dell'enzima dal citoplasma verso i vacuoli lipidici (Miyoshi H 2206). Tra gli stimoli lipolitici sono compresi le catecolamine, il glucagone, il GH (Growth Hormone), il cortisolo e il TSH (Thyroid-Stimulating Hormone). L'ormone anti-lipolitico più importante è l'insulina, la cui azione regola negativamente lo stato fosforilato di HSL. Un'azione antilipolitica locale viene svolta da molecole direttamente prodotte dagli adipociti, tra cui adenosina e prostaglandine.

Il processo di lipogenesi è regolato dall'azione della lipoprotein-lipasi (LPL), enzima sintetizzato e secreto dagli adipociti, che viene trasportato all'endotelio dove agisce idrolizzando i trigliceridi che costituiscono le lipoproteine e liberando così gli FFA e il monoacilglicerolo. La glicosilazione della LPL costituisce un passaggio di regolazione importante sia per la sua secrezione che per la sua attività enzimatica. L'attività dell'LPL aumenta dopo i pasti, probabilmente grazie

alla stimolazione da parte dell'insulina stessa, permettendo la clearance dei lipidi dal circolo ematico e il loro immagazzinamento nel tessuto adiposo. Altri fattori che influenzano l'azione dell'LPL sono l'adenosina, che la stimola, e il cortisolo, che agisce favorendo l'azione dell'insulina; l'attività dell'LPL risulta pertanto ridotta in assenza di insulina. Tra gli ormoni che inibiscono l'azione dell'LPL ricordiamo le catecolamine.

Il metabolismo del glucosio è essenziale all'interno dell'adipocita: fornisce energia ma e permette di mantenere un normale grado di esterificazione degli FFA; durante la glicolisi si forma l'a-glicerofosfato con il quale vengono esterificati gli FFA per formare i trigliceridi. (Herman MA, Kahn BB. 2006 desk

La maggior parte dei mammiferi, uccelli, pesci e rettili possiedono siti definiti per l'accumulo di grassi che però mostrano differenze nella localizzazione anatomica. Alcuni di questi depositi hanno prevalentemente una funzione di supporto strutturale, contribuendo solo in minima parte al mantenimento dell'omeostasi energetica, come nel caso del tessuto sotto ai polpastrelli o il tessuto adiposo retrorbitale.

Il tessuto adiposo che viene a trovarsi a stretto contatto con la pelle prende il nome di sottocutaneo, mentre quello che si trova all'interno delle cavità corporee e che circonda il cuore ed altri organi è prende il nome di viscerale. Quest'ultimo drena direttamente nella circolazione portale ed è stato correlato a numerose morbidità associate con l'obesità, il diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari.

Un'ulteriore distinzione va fatta tra adipociti di tipo bruno e bianco, il primo si osserva solo in mammiferi e si distingue dal più diffuso tessuto bianco per l'espressione della proteina UCP-1 (uncoupling protein 1) che è in grado di disperdere il gradiente protonico generato nella catena di trasporto elettronico all'interno del mitocondrio a livello della sua membrana interna, generando la produzione di calore al posto di ATP.

Morfologicamente gli adipociti di tipo bruno risultano essere multiloculari, con vacuoli lipidici di dimensioni minori e un numero maggiore di mitocondri rispetto agli adipociti bianchi che sono invece uniloculari. Nei roditori il tessuto bruno è piuttosto diffuso e i molteplici pannicoli adiposi si collegano a livello interscapolare. Nell'uomo, invece, circonda il cuore e alcuni grandi vasi durante l'infanzia, riducendosi però notevolmente con il passare del tempo, fino a trovare solo alcune cellule all'interno di depositi di tessuto adiposo bianco.

Il tessuto adiposo: principali avvenimenti differenziativi

Il tessuto adiposo è costituito da due componenti principali distinte: una è quella degli adipociti, cellule completamente differenziate, l'altra viene chiamata collettivamente frazione vasculo-stromale e comprende preadipociti, cellule endoteliali, macrofagi e fibroblasti.

La biologia del tessuto adiposo e il controllo trascrizionale delle cellule che lo compongono sono stati estensivamente studiati, soprattutto grazie alla generazione di alcune linee cellulari (come ad esempio le 3T3-L1 e 3T3F442A Green et al) (Bachmeier and Loffler, 1995; Calvo et al., 1991; Guest et al., 1990; Lai et al., 1982) che hanno consentito di produrre dei modelli sia per quanto riguarda la comprensione degli eventi che consentono la trasformazione da

preadipociti ad adipociti maturi, sia per i meccanismi che guidano le principali funzioni metaboliche della cellula come lipolisi, incorporazione di glucosio insulino mediato e lipogenesi.

Il tessuto adiposo è considerato di origine mesodermica, anche se non è chiaro con precisione quale delle sue componenti lo generi.

Cellule staminali mesenchimali (MSC) sono in grado di dare origine ad adipociti, osteoblasti, condrociti, mioblasti e tessuto connettivo. Non è ancora ben conosciuto quali siano gli esatti stati intermedi che sono compresi tra il mesoderma/cellule staminali mesenchimali e la formazione di adipociti maturi. Tuttavia, si crede che il precursore staminale mesenchimale dia origine ad un precursore comune (adipoblasto), che prende poi la via di tessuto adiposo bianco o bruno. Vista la condivisione di numerosi marcatori di differenziamento inoltre, non è chiaro se questo precursore possa realmente essere comune alle diverse tipologie di tessuto (bianco e bruno) e alle diverse localizzazioni (sottocutaneo e viscerale).

L'uso delle linee cellulari sopradescritte hanno permesso di identificare diversi passaggi coinvolti nella transizione da preadipociti ad adipociti: blocco della crescita, espansione clonale, differenziamento precoce, differenziamento tardivo.

Questi stadi sono principalmente regolati dall'attivazione di una cascata trascrizionale che coinvolge il recettore nucleare PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptors) e alcuni membri della famiglia C/EBP (CAAT/enhancer binding protein).

PPAR γ svolge un importante ruolo nell'adipogenesi, è stato dimostrato che è necessario e sufficiente per la differenziazione cellulare, la realizzazione di dominanti negativi per il gene ha mostrato che svolge anche un ruolo anche nel mantenimento dello stato differenziativo, in quanto la sua soppressione determina la perdita della capacità di accumulo lipidico e il decremento di marcatori adipogenetici.

Esistono due forme di PPAR γ (PPAR γ 1 e PPAR γ 2), originate da uno splicing alternativo, entrambe risultano essere espresse a livello del tessuto adiposo, ma solo la forma 2 costituisce un marcatore specifico del tessuto adiposo. Oltre alle capacità differenziative PPAR γ riveste un ruolo nel conferimento dell'insulino-sensibilità cellulare.

La famiglia dei C/EBP comprende 5 membri: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP γ e CHOP. Essi vengono espressi in maniera differenziale durante il differenziamento: i più precoci risultano essere la forma b e d che, in concerto, promuovono l'espressione di C/EBP α e PPAR γ . Modelli murini con soppressione di C/EBP β e C/EBP δ (singolarmente o associata) mostrano mantenere la capacità di generare tessuto adiposo, anche se l'efficienza con cui il fenomeno si verifica risulta essere ridotta. Al contrario, C/EBP α è richiesto per il verificarsi di una normale adipogenesi. Topi con delezione di questo gene mostrano l'assenza di tessuto adiposo sottocutaneo, perirenale, ed epididimale, ma mostrano un normale sviluppo del tessuto adiposo a livello mammario, con ipertrofia del tessuto adiposo bruno.

Nonostante PPAR γ e C/EBP α risultino entrambi necessari per la formazione del tessuto adiposo, il primo sembra rivestire un ruolo dominante: il knocking down di C/EBP α in fibroblasti embrionici murini può essere ripristinato dalla sovra-espressione di PPAR γ , ma non si osserva invece l'evento in senso opposto.

Altro gene coinvolto nella regolazione dell'adipogenesi risulta essere SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein-1c), esso infatti partecipa all'attivazione di geni che regolano il metabolismo degli acidi grassi e del colesterolo, il suo ruolo è pro-adipogenetico in quanto la sua l'espressione ectopica promuove l'accumulo di lipidi, promuovendone la captazione e la biosintesi. Inoltre SREBP-1c controlla l'espressione di alcuni geni come FAS (fatty acid synthase), LPL (lipoprotein lipase) e acetil coenzima A carbossilasi.

Il solo marcatore universalmente accettato per identificare i preadipociti risulta essere Pref-1 (preadipocyte factor 1), questo è identificato ad alti livelli sia in preadipociti bianchi che bruni e la sua espressione viene enormemente ridotta con l'induzione del differenziamento.

Pref-1 deriva dalla famiglia Notch/Delta/Serrate, viene sintetizzato inizialmente come proteina transmembrana e viene successivamente clivato producendo una proteina solubile che agisce inibendo l'adipogenesi. L'over-espressione della proteina in animali da esperimento ha mostrato una riduzione dell'adipogenesi, mentre la sua soppressione ha dimostrato un accumulo di tessuto adiposo.

Altri possibili candidati come marcatori preadipocitari sono risultati essere COL6A2 (collagen alpha 2 chain) e FRP2/SFRP2 (secreted frizzled related protein 2), in quanto studi hanno evidenziato la loro alta espressione in preadipociti.

L'adipogenesi risulta possedere anche una regolazione negativa, mediata principalmente da alcuni componenti della famiglia di Wnt (wingless-type MMTV integration site family), questi legano i loro recettori di tipo Frizzled determinando la mobilizzazione di b-catenina nel nucleo. Quest'ultima interagisce con fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia di TCF/LEF che inibiscono l'adipogenesi prevenendo l'induzione di PPAR γ e C/EBP α . Uno dei meccanismi ipotizzati prevede che l'attivazione di questa via porti all'espressione della ciclina D1 che è in grado di interagire direttamente con PPAR γ e di bloccarne l'attività ref. L'esposizione di preadipociti a Wnt e l'attivazione costitutiva di b-catenina in questi ha mostrato l'inibizione del processo adipogenetico, mentre l'espressione di forme dominanti negative per TCF causa il differenziamento spontaneo dei preadipociti. Ref

Utilizzando gli stessi sistemi (creazione di mutanti dominanti negativi ed espressione ectopica) si è portato ad evidenziare l'esistenza di ulteriori fattori che bloccano l'adipogenesi, molti di questi sembrano agire a livello di C/EBP β , antagonizzandone l'attività. Tra questi sono stati identificati ad esempio GATA2/3 (GATA binding protein), ETO/MTG8 (runt-related transcription factor), CHOP10 (DNA-damage-inducible transcript 3) ref.

Una volta indotto lo stimolo differenziativo le cellule sono sottoposte a profondi cambiamenti, sia a livello trascrizionale che morfologico. La struttura di queste viene modificata attraverso riarrangiamenti a livello citoscheletrico e della matrice extracellulare, si verifica l'accumulo di trigliceridi all'interno di esse, l'acquisizione della sensibilità insulinica e la produzione di proteine che li caratterizzano come adipociti maturi. La capacità di induzione di marcatori adipogenetici tardivi è prevalentemente regolata da PPAR γ e C/EBP α .

Viene aumentata la produzione di proteine coinvolte nel metabolismo dei trigliceridi come ad esempio enzima malico, acetil CoA carbossilasi, stearoil CoA desaturasi, la sintasi degli acidi grassi, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi e fosfoenolpiruvato carbossichinasi si osserva l'incremento della sensibilità insulinica attraverso l'aumentata sintesi del suo recettore e del trasportatore per il glucosio insulino dipendente GLUT4. Durante l'adipogenesi si osserva anche una trascrizione elevata dei geni che codificano per aP2/FABP4 (fatty acid binding protein), una proteina in grado di legare acidi grassi, per FAT/CD36 che codifica per un trasportatore per acidi grassi, di una proteina associata ai vacuoli lipidici vista in precedenza, la perilipina.

Il raggiungimento del fenotipo maturo è correlato anche all'acquisizione della capacità endocrina del tessuto adiposo, vengono infatti prodotte e secrete numerose molecole ad azione sia autocrina che paracrina, che partecipano sia alla regolazione del metabolismo che modulando alcune caratteristiche del sistema immunitario.

Leptina è in grado di raggiungere il sistema nervoso centrale e, a livello dell'ipotalamo, di regolare l'introito calorico e il dispendio energetico. Nel sistema immunitario è coinvolta nella fagocitosi batterica mediata da neutrofili e stimola la proliferazione delle cellule T naive.

Adiponectina ha dimostrato di ridurre il contenuto di trigliceridi a livello del muscolo, mostra inoltre di promuovere l'espressione dei geni target di PPAR γ , stimolandone l'attività. In entrambi i casi determina un miglioramento della sensibilità insulinica (Kadowaki T, Yamauchi T. 2005). Adiponectina svolge anche un effetto anti-aterogenico sopprimendo l'attivazione di NF-kB (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) indotta da TNF α (tumor necrosis factor alpha).

Gli adipociti sono inoltre in grado di produrre IL6 (interleukin 6), i cui livelli circolanti sono stati correlati con l'indice di massa corporea (BMI, body mass index); modelli murini deleti per IL6 mostrano l'insorgenza di obesità e mostrano un decremento della sensibilità al glucosio. A livello del sistema immunitario IL6 è coinvolta nello sviluppo dei linfociti B e nella produzione di anticorpi.

TNF α (tumor necrosis factor alpha) agisce sul tessuto adiposo aumentando la lipolisi, sembra essere coinvolto nella promozione dell'anoressia e della perdita di peso attraverso l'inibizione dell'adipogenesi e lo stimolo apoptotico esercitato sia a livello di preadipociti che di adipociti. TNF α è implicato sia nella risposta infiammatoria di tipo acuto e di tipo cronico, stimola l'attivazione macrofagica e promuove l'apoptosi cellulare.

Tessuto adiposo e bilancio energetico

Il bilancio energetico mantenuto da un organismo può essere riassunto in maniera semplice dalla seguente equazione:

$$\text{introito energetico} = \text{energia consumata} + \text{energia conservata}$$

L'accumulo lipidico rappresenta un eccesso di energia introdotta rispetto a quella consumata, e altera il semplice sistema che è stato introdotto in precedenza.

Inoltre non è sempre così facile valutare la spesa energetica, in quanto non esistono precisi parametri per valutare alcuni sistemi, come ad esempio l'efficienza di assorbimento delle calorie a livello dello stomaco. L'organismo inoltre non risponde in maniera statica alla variazione del dispendio energetico o dell'introito calorico. Per cui risulta evidente che il bilancio energetico è regolato da diversi fattori, inclusi ormoni e impulsi neuronali, nonché fattori psicologici e culturali.

In generale la cellula del tessuto adiposo bianco riveste un ruolo preponderante nel mantenimento di questo bilancio, essa riesce infatti ad integrare numerosi tipi di segnali, di origine endocrina e non.

insulino-sensibilità ed insulino resistenza

L'insulino-sensibilità di una cellula, di un tessuto o di un organismo definisce la capacità di promuovere l'assorbimento cellulare di glucosio mediata dall'insulina, di conseguenza l'insulino-resistenza fa riferimento ad una ridotta capacità dell'insulina nella promozione di questo evento. Uno stato di ridotta sensibilità all'insulina è spesso associata a stati patologici quali la sindrome metabolica, l'obesità e il diabete mellito di tipo 2 (T2D).

cenni sulla struttura e le azioni dell'insulina

L'insulina è un polipeptide costituito da due catene amminoacidiche, legate da ponti disolfuro. È sintetizzata nel reticolo endoplasmatico delle cellule β delle isole pancreatiche di Langerhans e poi trasportata all'apparato di Golgi, dove viene immagazzinata in granuli.

Dopo stimolazione i granuli secretori raggiungono la parete della cellula e la loro membrana si fonde con quella cellulare e così l'insulina, dopo aver attraversato la lamina basale delle cellule β , quella del capillare e l'endotelio fenestrato del capillare stesso, entra nella circolazione portale.

L'insulina regola l'omeostasi del glucosio riducendo la produzione endogena di glucosio epatico attraverso l'inibizione della gluconeogenesi e della glicogenolisi e aumentando la captazione del glucosio da parte dei tessuti periferici, soprattutto a livello del tessuto muscolare e del tessuto adiposo. L'insulina svolge un ruolo anche nel controllo del metabolismo lipidico: aumenta la sintesi di lipidi nel fegato e nelle cellule adipose e diminuisce il rilascio di acidi grassi presenti a livello del tessuto adiposo e muscolare. Tale ormone stimola, infatti, la sintesi degli acidi grassi, l'utilizzo di quella lunga catena, la sintesi dei trigliceridi (lipogenesi) e l'attività della lipoprotein-lipasi.

Gli effetti metabolici dell'insulina sono mediati dall'attivazione dei membri della famiglia dei recettori tirosinici per l'insulina (IRa e IRb) e del recettore dell'IGF-1 (IGF1R). Il recettore insulinico è costituito da una glicoproteina eterotetrameric [α2β2] di peso molecolare 300-400 kDa, costituita da due subunità α (135 kDa) e due subunità β (95 kDa), unite mediante ponti disolfuro. L'insulina lega la subunità α extracellulare e attiva il dominio intracellulare della subunità β che avvia l'autofosforilazione dei propri residui tirosinici. Quest'evento guida a cascata la fosforilazione di diversi substrati tra cui le proteine IRS (Insulin Receptor Substrate) che fungono da ponte tra il recettore insulinico e le proteine

effettrici a valle. I siti fosforilati delle proteine IRS legano specificamente i domini SH2 (Src homology 2) delle diverse molecole segnale distali tra cui troviamo fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K), la proteina legante il recettore del fattore di crescita (Grb-2, growth factor receptor bound-2 protein) e la fosfotirosin fosfatasi SHP2. L'esito dell'azione insulinica sulla cellula dipende dall'espressione e dal reclutamento preferenziale di un particolare effettore rispetto ad un altro. Nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo l'attivazione della via della PI3K è considerata un evento necessario ma non sufficiente per aumentare l'espressione e la traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT4. Inoltre la via di segnalazione in cui è coinvolta la PI3K favorisce il deposito di glucosio sotto forma di glicogeno (nel muscolo) e di trigliceridi (nel tessuto adiposo).

A valle di PI3K vengono reclutate la protein chinasi B (PKB o Akt) e isoforme della protein chinasi C (PKC); determinando, a seconda della concentrazione dell'ormone lo stimolo del trasporto del glucosio rispetto o l'inibizione della lipolisi. L'insulina è in grado, attraverso la proteina Grb-2, di attivare la cascata della protein chinasi mitogeno-attivata (MAPK, mitogen-activated protein kinase), mediando quindi effetti mitogeni.

trasporto intracellulare del glucosio

Il glucosio è la principale fonte di energia utilizzata nel regno animale e nel tempo si sono evoluti molteplici meccanismi che ne regolano il metabolismo, la sintesi e il suo immagazzinamento. Il livello di glucosio plasmatico viene finemente regolato per consentire alle cellule l'accesso costante al nutrimento e per evitarne la tossicità: questo mantiene nell'uomo i suoi livelli compresi tra 4 e 7 mM,.

Nei mammiferi il glucosio viene trasportato nelle cellule secondo gradiente di concentrazione da trasportatori denominati GLUTs (glucose transporters), che comprendono una famiglia di proteine contenenti 12 domini transmembrana.

La famiglia di trasportatori di esosi, i GLUTs, che comprende 13 membri, può essere a sua volta suddivisa in 3 principali classi, in base alle caratteristiche strutturali. La classe I include i GLUTs 1-4, i trasportatori della famiglia meglio caratterizzati. La classe II comprende il GLUT 5 (un trasportatore specifico per il fruttosio) ed i GLUTs 7, 9 ed 11 che sono stati poco studiati. La classe III, infine, comprende i GLUTs 8, 10, 12 e HMIT1 (proton-myoinositol symporter H⁺-myo-inositol- cotransporter), tutti poco caratterizzati.

Normalmente i differenti tipi di trasportatori hanno localizzazioni definite: il GLUT1 risulta essere pressochè ubiquitario, il GLUT2 è identificabile in fegato, intestino, rene e β -cellule pancreatiche, in particolare a questo livello, funge da sensore del glucosio. GLUT3 è espresso principalmente nei neuroni, il trasportatore GLUT4 è espresso soprattutto nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo e in condizioni basali è sequestrato all'interno della cellula in compartimenti specializzati. E' l'isoforma dei GLUTs maggiormente responsiva all'insulina ed è stata ampiamente studiata in relazione al diabete. L'insulina induce, infatti, ne induce la mobilitazione dal compartimento intracellulare a quello plasmatico (Watson et al., 2004).

Cenni sul trasporto di glucosio mediato da GLUT4

Dopo l'autofosforilazione del recettore insulinico vengono sostanzialmente attivate due vie che guidano il movimento del recettore GLUT4 dai depositi intracellulari alla fusione con la membrana plasmatica, una è mediata da PI3K, mentre l'altra è indipendente da essa. (A. H. Khan and J. E. Pessin 2002)

Nel primo caso la fosforilazione di IRS fornisce dei siti di docking per la subunità regolatoria di PI3K. L'enzima si trova nel citosol cellulare e esiste come dimero di due subunità, una regolatoria p85 ed una catalitica p110. Il reclutamento della subunità regolatoria determina il movimento di quella catalitica verso la membrana dove catalizza reazioni di fosforilazione determinando la produzione di PI(3,4,5)-trifosfato da PI(4,5)-bisfosfato e PI(3,4)-bisfosfato da PI(4)-fosfato. Questo evento recluta proteine dotate di un dominio omologo a plekstrina come PDK-1 (3' phosphoinositide-dependent kinase-1) che successivamente attiva protein chinasi B (PKB/Akt) e la protein chinasi C atipica (PKC). L'attivazione di questa via di segnalazione potrebbe essere necessaria e sufficiente alla traslocazione del trasportatore GLUT4 alla membrana citoplasmatica, ma mancano evidenze che ne confermino con certezza il ruolo.

L'altro meccanismo responsabile della traslocazione del trasportatore si svolge in prossimità di zone che prendono il nome di caveole, comparti dotati di una composizione lipidica molto particolare. Un ruolo fondamentale è svolto dalla proteina CAP (Cbl-associated protein) che media l'interazione con flottilina, proteina presente a livello delle caveole, e da una ad essa associata, APS (associated protein substrate). La fosforilazione in Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) mediata da IR fornisce un sito di contatto per il complesso CrkII/C3G.

CrkII è una proteina adattatrice che lega Cbl a C3G (guanine nucleotide-releasing factor) quest'ultima fornisce un nucleotide guaninico ad una proteina legante il GTP, TC10 (ras-like protein TC10). TC10 sembra determinare profondi cambiamenti a livello dello scheletro actinico promuovendo la traslocazione di GLUT4.

Obesità: alterazione del bilancio energetico

L'incidenza dell'obesità e dei disordini ad essa associati è aumentata notevolmente a livello mondiale. L'obesità si sviluppa quando la quantità di energia immessa nell'organismo supera la spesa energetica, con un conseguente ed eccessivo accumulo nell'organismo.

Questo si verifica attraverso l'aumento della sintesi di trigliceridi che vengono immagazzinati inizialmente a livello del tessuto adiposo, che di conseguenza aumenta la sua massa. Questo può verificarsi seguendo due meccanismi: si può osservare iperplasia cellulare oppure si riscontra ipertrofia degli adipociti, e, in alcuni casi questi due fenomeni coesistono.

L'indice più utilizzato per la misura dell'obesità è il BMI (body mass index) e si ricava dal rapporto $\text{peso}/(\text{altezza})^2$. Un soggetto normopeso ha un BMI compreso tra 18 e 25 kg/m^2 , un individuo sovrappeso invece si colloca nell'intervallo

compreso tra 25 e 30 kg/m², l'obesità si osserva invece quando il BMI supera i 30 kg/m².

Lo stato di obesità predispone all'aumento del rischio per alcune patologie come aterosclerosi e complicanze cardiovascolari, dislipidemia, diabete mellito di tipo 2 e steatoepatite non alcolica.

La distribuzione della massa grassa può essere stimata sulla base del rapporto vita-fianchi (WHR, waist to hip ratio), individui con un basso valore di WHR (distribuzione principale a livello gluteo femorale) possiedono un basso rischio di complicanze metaboliche e cardiovascolari, al contrario individui con un alto WHR (distribuzione dell'adipe a livello distretti superiori, principalmente a livello viscerale) mostrano un'aumentata mortalità ed un rischio superiore per le morbidità associate all'obesità.

Tuttavia, informazioni più accurate sulla distribuzione della massa adiposa possono essere ottenute utilizzando tecniche più sofisticate come la risonanza magnetica (MRI) e la DEXA (Dual-Energy X-Ray Absorptiometry).

L'obesità può essere definita come una patologia multifattoriale in quanto alla sua definizione contribuiscono fattori sia genetici che ambientali. Studi effettuati hanno dimostrato che nella genesi dell'obesità sono valutabili diversi contributi: la predisposizione genetica può contribuire per circa 1/3 e l'ereditarietà di questi caratteri solitamente non segue un andamento di tipo mendeliano. La trasmissione familiare non genetica, legata alla condivisione dell'ambiente, influenza per un altro terzo, il restante contributo spetta a fattori di tipo ambientale. Anche i fattori culturali sono importanti, essi possono influire sulla composizione della dieta e sullo svolgimento dell'attività fisica.

Recentemente è stata focalizzata l'attenzione su un modello dell'equilibrio nutrizionale, che risulterebbe essere controllato da 4 elementi principali: 1) il cervello, che funge da regolatore, 2) un sistema che comprende l'introito energetico, la digestione, l'assorbimento, l'accumulo ed il metabolismo degli alimenti, 3) segnali di feed-back di informazione al cervello sullo stato del sistema, 4) meccanismi di controllo che provvedono alla modulazione dell'introito alimentare e della spesa energetica. Alterazioni in uno o più di questi elementi contribuiscono all'insorgenza dell'obesità.

La Sindrome Metabolica

La sindrome metabolica, secondo le linee guida del terzo National Cholesterol Education Programme (NCEP), Adult Treatment Panel III (2002), si definisce in base alla presenza di 3 o più delle seguenti anomalie:

- Iperglicemia a digiuno (glicemia basale \geq 110 mg/dl)
- Obesità centrale (circonferenza vita $>$ 102 cm (uomo) o $>$ 88 cm (donna))
- Trigliceridi \geq 1.7 mmol/l (150 mg/dl)
- HDL $<$ 40 mg/dl nell'uomo e di 50 mg/dl nella donna.
- Ipertensione arteriosa ($>$ 130/85 mmHg)

Attualmente nei paesi occidentali l'obesità e la sindrome metabolica hanno raggiunto proporzioni epidemiche e i soggetti che ne sono affetti sono esposti ad un crescente rischio di mortalità per patologie cardiovascolari. La prevalenza di

questa sindrome aumenta con l'età e circa il 50% dei soggetti con età compresa tra 60-69 anni ne è colpito (Ford et al., 2002).

In seguito alla diminuzione di captazione di glucosio insulino-mediata, si instaura una risposta fisiologica che porta a un aumento della secrezione insulinica. Finché la cellula β -pancreatica può mantenere uno stato iperinsulinemico compensatorio, non si evidenziano segni di intolleranza al glucosio. Quando il pancreas endocrino non è più in grado di sostenere questo meccanismo, si verifica un'importante alterazione nell'omeostasi glucidica e un aumento degli FFA plasmatici che portano ad un incremento della produzione epatica di glucosio. La combinazione di insulino resistenza e iperinsulinemia compensatoria predispongono allo sviluppo di alcune alterazioni quali un aumento della concentrazione dei trigliceridi plasmatici e una diminuzione della concentrazione delle HDL (High Density Lipoproteins), ipertensione, iperuricemia e un aumento dei livelli di PAI-1. Lo stato di insulino-resistenza che si osserva nell'obesità si instaura principalmente a livello del fegato e del muscolo scheletrico.

La riduzione della sensibilità all'azione dell'ormone insulinico sembrerebbe inoltre determinata anche dalla differente distribuzione del tessuto adiposo (Carey et al., 1996). L'accumulo di tessuto adiposo viscerale comporta l'aumento di FFA a livello della circolazione portale, cui farebbe seguito una riduzione della clearance epatica dell'insulina con secondario aggravamento dello stato di iperinsulinemia. Gli FFA determinano inoltre l'aumento della neoglucogenesi, della sintesi epatica di TG ed entrano in competizione con il glucosio per la sua utilizzazione periferica.

Di recente anche l'aumento del tessuto adiposo sottocutaneo è stato correlato con il generarsi di uno stato di insulino-resistenza. Per cui è chiaro che la genesi dell'insulino-resistenza distretto sottocutaneo che quello viscerale.

La presenza di queste disfunzioni del metabolismo glucidico e lipidico che ruotano attorno ad una risposta alterata all'azione insulinica prendono il nome di sindrome metabolica. La progressiva conoscenza dei meccanismi di integrazione tra il centro e la periferia nel controllo del bilancio energetico e l'approfondimento della conoscenza della biologia del tessuto adiposo hanno consentito di formulare nuove ipotesi sulla patogenesi della resistenza insulinica. Una prima ipotesi ha preso in considerazione l'accumulo di lipidi nei tessuti differenti dall'organo adiposo come la chiave di volta dell'alterazione della sensibilità insulinica. Un'altra corrente di pensiero invece ha messo al centro dell'intero sistema l'organo adiposo come ghiandola endocrina. Attualmente si conoscono almeno 17 peptidi che vengono prodotti e secreti dalla cellula adiposa o dai suoi precursori, i preadipociti, in grado di espletare effetti autocrini/paracrini o endocrini su altri organi bersaglio dell'organismo.

Tessuto adiposo e infiammazione: L'obesità e lo stato infiammatorio di basso grado

Come già affermato in precedenza, sono oramai note le capacità endocrine del tessuto adiposo bianco che è in grado di produrre diverse molecole ad azione ormonale, molte delle quali sono caratterizzate da attività anti- e pro-infiammatoria ^{21, 22}. Negli ultimi dieci anni si è cominciato ad investigare sulle sempre più evidenti caratteristiche condivise tra il sistema immunitario e il

metabolismo, dando sempre maggior prova di essere strettamente correlati e interdipendenti.

Tra cellule del sistema immunitario, preadipociti e adipociti esistono molti punti di sovrapposizione²³⁻²⁵. Vengono condivise vie produzione e secrezione di citochine e chemochine. Inoltre queste cellule condividono l'espressione di alcuni geni che codificano per fattori di trascrizione (RXR retinoic acid receptor, PPAR γ), citochine infiammatorie (TNF α , IL6), trasportatori di acidi grassi (FABP, fatty acid binding protein), scavenger receptor²⁶. Esperimenti *in vitro* hanno mostrato che precursori adipocitari hanno la possibilità di transdifferenziare, sotto opportuni stimoli, in cellule simili a macrofagi con capacità fagocitica^{27, 28}.

E' stato dimostrato anche che molecole note per rivestire un ruolo nel metabolismo, svolgono alcune funzioni anche nel sistema immunitario: leptina possiede alcune funzioni immunomodulatorie, sia a livello del sistema immunitario innato che sull'immunità di tipo adattativo. Leptina agisce durante l'infiammazione come proteina della fase acuta e partecipa alla fagocitosi da neutrofili polimorfomucleati. Stimola inoltre la proliferazione delle cellule T naive e la secrezione di citochine da parte di T helper 1.

L'insulina invece promuove l'attivazione linfocitaria e la responsività mediata da cellule T.

Sono state identificate anche delle citochine che svolgono un ruolo nel tessuto adiposo, IL1 (interleukin 1) ad esempio induce uno stato anoressizzante, inibisce la sintesi di acidi grassi e agisce come agente ipoglicemizzante.

Inoltre la proliferazione, la differenziazione e l'esecuzione della fase effettrice della risposta richiedono un rapido e sostenuto tasso metabolico, l'accesso ai nutrienti che si effettua attraverso l'aumento dei trasportatori del glucosio e l'attivazione della via glicolitica, sembra essere essenziale per lo svolgimento di queste funzioni.

L'obesità, l'insulino resistenza e il diabete di tipo 2 sono strettamente associati ad uno stato di infiammazione cronica caratterizzato da una alterata produzione di citochine, dall'aumento di marcatori di fase acuta e dall'attivazione di vie di segnale che mediano l'infiammazione.

Durante questo stato vengono alterati i livelli di citochine pro-infiammatorie come TNF α , IL6, TGF-beta (transforming growth factor beta), PCR (proteina C reattiva), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) e adipocitochine che possono svolgere sia una modulazione a livello metabolico che a livello immunologico.

Recentemente è stata evidenziata la presenza di macrofagi residenti nel tessuto adiposo²⁹, il cui numero è correlato con il grado di obesità, dato confermato sia in modelli animali che nell'uomo. L'uso della microscopia ottica ed elettronica in particolare ha messo in evidenza che queste cellule infiammatorie non assumono una distribuzione casuale ma si accumulano ed inglobano l'adipocita in fase di degenerazione, eliminandone i residui di acidi grassi rilasciati, formando strutture peculiari chiamate CRS (crown-like structure) ref. Nel tessuto adiposo di individui obesi inoltre è stata osservata la formazione di cellule giganti multinucleate, indice della presenza di un'infiammazione di tipo cronico³⁰. Il tentativo di chiarire come cellule del sistema immunitario potessero essere

reclutate in loco ha portato alla identificazione della secrezione da parte del tessuto adiposo di fattori come IL8 e MCP1. Questi possiedono la capacità di attivare cellule endoteliali, determinando l'aumento dell'esposizione di molecole di adesione, conducendo alla conclusione che i macrofagi vengono richiamati favorendo il sistema di diapedesi dei monociti circolanti ³¹.

In particolare, un lavoro molto recente, basato su un modello di obesità genetica, mostra che il tessuto adiposo di topi obesi, rispetto a quello di controlli magri, possiede un alterato microcircolo: in topi obesi il flusso all'interno di questo risulta essere largamente discontinuo, con parecchie zone che mostrano un'adesione alle pareti dei vasi da parte dei leucociti. La riduzione del flusso concorda con la teoria che nel tessuto adiposo di individui obesi si verifichi una situazione ipossica. Inoltre, l'analisi di molecole di adesione come ICAM e selectine a livello della frazione vasculo stromale, ne dimostra un forte aumento nei livelli di espressione, suggerendo che la localizzazione di leucociti all'interno del tessuto adiposo si verifichi in seguito alla migrazione di questi successivamente all'esposizione delle molecole di adesione. Gli studi effettuati mediante cell sorting dimostrano che l'incremento delle selectine, presenti solo in caso di infiammazione, si verifica soprattutto a livello di cellule endoteliali e di macrofagi. Altro dato interessante è la localizzazione dei siti di adesione dei leucociti nel circolo: essi sono molto spesso individuati nelle zone di CRS. ref

L'insieme di queste evidenze sperimentali ha condotto allo sviluppo del concetto di obesità come stato infiammatorio cronico di basso grado, sebbene tutt'ora rimanga ancora ignoto se e come questo stato infiammatorio sia l'evento principale per l'insorgenza delle complicanze connesse, come iperglicemia ed insulino resistenza, iperlipidemia e aterosclerosi ³²⁻³⁴.

Meccanismi infiammatori nel tessuto adiposo

L'associazione tra la presenza dell'obesità e l'aggravarsi della situazione di insulino resistenza durante questo stato ha portato allo studio dei possibili meccanismi coinvolti.

La terapia con sacilati, che ha determinato l'osservazione di un miglioramento nella situazione di insulino resistenza, ha permesso di individuare il coinvolgimento di IKKb (inhibitor of nuclear factor kB), NF-kB (nuclear factor kB) e PKC θ (protein kinase C, theta). IKKb e PKC svolgono entrambe un ruolo di protein-chinasi, e, una volta stimulate, determinano la fosforilazione a livello dei residui serinici o treoninici di IRS-1 (insulin receptor substrate 1), che conduce ad una riduzione dell'attività insulinica. IKKb, inoltre, è in grado di attivare il fattore trascrizionale kB che comporta l'aumento della trascrizione di numerosi fattori, tra i quali TNFa, IL6 e MCP1.

Altra via di segnalazione identificata è stata quella mediata dall'azione di JNK (JUN N-terminal kinase), questa proteina è compresa nella famiglia delle serin/treonin chinasi, conosciute per essere attivate da numerosi stimoli infiammatori. La sua attivazione conduce anch'essa all'aumento della fosforilazione di IRS-1, portando alle stesse conseguenze sopra descritte.

Durante lo stato di obesità, JNK è elevata non solo nel tessuto adiposo, ma lo è anche nel fegato e nel muscolo ed è stato dimostrato che la perdita della proteina

previene l'insulino resistenza e il diabete in modelli murini di obesità, genetici e non.

Gli stimoli individuati per queste diverse categorie di segnali sembrano essere comuni: sembra infatti che TLR (Toll-like receptor), il recettore per il TNF (Tumor necrosis factor) e il recettore per AGE (advanced glycation end products) possano essere responsabili della trasduzione del segnale, mediante l'interazione con lipidi, citochine e prodotti terminali di glicazione.

JNK e NF- κ B possono essere attivati anche in seguito alla presenza di una situazione di stress cellulare: specie reattive dell'ossigeno (ROS) e stress del reticolo endoplasmatico (ER) possono fungere da stimolo.

L'accumulo di lipidi può attivare NADPH ossidasi e determinare la produzione di ROS da parte del mitocondrio, verificandosi uno sbilancio della situazione ossidoriduttiva della cellula; una possibile alternativa è rappresentata dalla produzione di ROS mediata da uno stato iperglicemico.

E' stato recentemente proposto che la perturbazione del reticolo endoplasmatico possa contribuire a perpetuare lo stato infiammatorio degli adipociti: l'accumulo di proteine non correttamente ripiegate, uno stato ipossico, le fluttuazioni energetiche e di nutrienti sono alcune delle cause che possono alterare la funzionalità. Il ER si è quindi candidato come sensore di uno stress metabolico, avendo anche la capacità di tradurre questo segnale in uno di tipo infiammatorio.

Un ulteriore meccanismo di segnale che collega lo stato infiammatorio all'insulino resistenza potrebbe essere mediato dalle proteine SOCS (suppressor of citokine signaling). Queste proteine sono coinvolte nella regolazione del signaling stimolato da insulina, esse possono inibire della trasmissione del segnale attraverso tre meccanismi: inibizione della fosforilazione in tirosina di IRS causata dalla competizione a livello del sito di interazione con IR, induzione della degradazione di IRS mediata dal proteasoma, inibizione dell'attività chinasi svolta da IR.

Si ipotizza che TNF α e IL6 possano influenzare lo stato di fosforilazione del recettore insulinico, promuovendone la degradazione, di concerto essi sono stati coinvolti anche nel determinare l'up-regolazione di SOCS, con conseguente aumento del transito attraverso il proteasoma. Una riduzione del recettore insulinico e del suo substrato attraverso questo sistema sarebbero quindi alla base di un possibile meccanismo d'insulino resistenza mediata dall'infiammazione.

SCOPO

L'attività di ricerca svolta durante il mio dottorato e presentata in questa tesi riguarda due progetti di ricerca che hanno come comune denominatore il tessuto adiposo, la regolazione della sua funzione e le patologie ad esso relate, quali obesità e insulinoresistenza.

Per prima cosa mi sono occupata della caratterizzazione del sistema recettoriale costituito dai recettori di membrana P2 purinergici. L'obiettivo del lavoro è stato quello di analizzarne il pannello di espressione e la funzionalità a livello del tessuto adiposo.

La caratterizzazione molecolare è stata effettuata in campioni derivanti da tessuto adiposo sottocutaneo ed omentale di soggetti normopeso, in colture primarie di preadipociti ed adipociti differenziati *in vitro* e nella frazione vasculo-stromale e matura negli adipociti maturi isolati direttamente da tessuto adiposo.

La funzionalità recettoriale è stata analizzata in colture primarie di adipociti, valutando la capacità di mobilizzare ione calcio all'interno della cellula mediante l'utilizzo di sonde fluorescenti. E' stato inoltre studiato se l'attivazione dei recettori purinergici fosse in grado di modificare la funzionalità endocrina dell'adipocita maturo, misurando la secrezione di IL6.

Successivamente mi sono dedicata allo studio della sindrome di Alström. Questa rara malattia genetica è causata dalla mutazione del gene *ALMS1* la cui funzione a tutt'oggi non è completamente nota.

Abbiamo quindi voluto utilizzare un approccio volto ad ottenere il maggior numero di informazioni riguardo l'espressione genica, mediante la recente tecnologia del DNA microarray.

Sono state ottenute colture primarie di fibroblasti mediante biopsia cutanea di pazienti ALMS che sono stati confrontati con soggetti di controllo. L'analisi dei dati ha portato all'identificazione di geni differenzialmente regolati, la cui espressione è stata quantificata mediante real-time PCR, per validare i dati ottenuti con la tecnica considerata gold standard.

Inoltre ho avuto l'opportunità di svolgere l'ultimo anno di Dottorato presso il The Jackson Laboratory, dove i pazienti ALMS vengono seguiti da molti anni, e alcuni collaboratori hanno contribuito ad identificare il gene malattia e a creare un modello animale della sindrome. Ho potuto così collaborare allo studio di alcuni modelli murini per la sindrome di Alström, con particolare riguardo agli aspetti endocrino-metabolici, all'obesità e alle caratteristiche fenotipiche e funzionali del tessuto adiposo.

MATERIALI E METODI

SOGGETTI

Biopsie di tessuto adiposo omentale e sottocutaneo sono state ottenute da soggetti normopeso sono state raccolte da pazienti sottoposti a interventi chirurgici per patologie addominali (7 pazienti, M/F=3/4, età 46 ± 5 anni, BMI= 23.9 ± 1.1 kg/m²). Il tessuto è stato lavato in soluzione salina, congelato direttamente in azoto liquido e conservato a -80°C fino alle successive analisi o utilizzato per l'isolamento della frazione vasculo stromale (FVS) e della frazione di adipociti maturi che verrà descritta in seguito.

I pazienti ALMS analizzati nel presente studio sono 3 maschi e 1 femmina di età compresa tra i 24 e i 36 anni; i soggetti di controllo sono 2 femmine e 1 maschio di età compresa tra i 53 e 74 anni. Questi sono stati sottoposti ad una biopsia cutanea eseguita a livello dell'avambraccio ed ad un prelievo di sangue.

Nessuno dei pazienti presentava patologie maligne, disfunzioni epatiche o renali, diabete o patologie endocrino-metaboliche.

Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato e i protocolli di ricerca descritti nella presente tesi sono stati approvati dal comitato etico locale.

COLTURE CELLULARI

Colture primarie di fibroblasti umani

Colture primarie di fibroblasti sono state ottenute a partire da biopsie cutanee prelevate da pazienti ALMS e da controlli sani. La biopsia è stata effettuata a livello della superficie glabra dell'avambraccio, è stata ridotta in pezzi di piccole dimensioni che sono stati depositati in capsule Petri con la superficie del derma a contatto con la plastica.

Ogni frammento è stato ricoperto con una goccia di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK) contenente il 20% di siero bovino fetale (FBS) (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK); i fibroblasti escono spontaneamente dal derma sulla piastra di coltura, aderiscono alla plastica e si dividono fino a raggiungere la confluenza.

Successivamente le cellule vengono mantenute in coltura con DMEM 10% FBS, 150 U/ml streptomina, 200 U/ml penicillina, 2 mM glutamina, 1 mM HEPES (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK) e continuano a proliferare per almeno 30 passaggi.

Colture primarie di adipociti umani

Il tessuto adiposo sottocutaneo raccolto in sede operatoria viene frammentato sterilmente e sottoposto a digestione con collagenasi di tipo II (1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) a 37°C per 1h, a moderata agitazione. La separazione della FVS si ottiene mediante lisi dei globuli rossi e lavaggi in DMEM F12 10% FBS. Il pellet di cellule ottenuto viene risospeso in un adeguato volume di DMEM F12 10% FBS in modo da seminare 700.000 cellule per cm². Le cellule (per la maggior parte preadipociti) così ottenute vengono mantenute in incubatore a 37°C, in atmosfera di CO₂ al 5%. Dopo 24 ore il mezzo è sostituito con un terreno promuovente il differenziamento adipogenico (terreno adipogenico contenente pantotenato 17 µM, biotina 33 µM, transferrina 10 µg/ml, insulina 66 nM, desametasone 100 nM, T₃ 1 nM, in DMEM F12) addizionato con IBMX 0.25 mM e rosiglitazone 10 µM per le prime 72 h di differenziamento. Il terreno viene sostituito ogni tre giorni fino all'ottenimento di adipociti maturi, cosa che si realizza dopo circa 12-16 giorni.

Isolamento della frazione di adipociti maturi

Il tessuto adiposo sottocutaneo raccolto in sede operatoria viene frammentato e sottoposto a digestione con collagenasi di tipo II (1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) a 37°C per 30 min in una soluzione tampone Krebs Henseleit supplementata con 2% BSA (Sigma). Successivamente alla digestione il prodotto disgregato viene sottoposto a filtrazione per allontanare i residui fibrosi. Una centrifugazione a 100g permette di separare la frazione adipocitaria matura che per densità si stratificherà nella porzione superiore del tampone. Gli adipociti così isolati vengono rapidamente congelati a -80°C.

ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA

Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dalle biopsie e dagli adipociti maturi utilizzando il sistema RNeasy Lipid Tissue Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) secondo le istruzioni della casa produttrice. Questo metodo consente una lisi ottimale dei tessuti ricchi di lipidi e l'estrazione di RNA di buona qualità,

integrando la classica metodica che utilizza fenolo/guanidina con la più recente purificazione mediante colonnine con membrana di silice. I frammenti di tessuto vengono omogeneizzati con un Potter Dispergierstation T810 (IKA Labortechnik, Germany) in buffer QIAzol. Successivamente viene aggiunto un adeguato volume di cloroformio ed il lisato si centrifuga a 12.000xg per 15 minuti a 4°C (centrifuga ALC PK121R, Annita, USA) ottenendo una fase superiore acquosa contenente l'RNA e una fase inferiore in cui stratificano DNA e proteine. La fase superiore è stata quindi recuperata (circa 600µl) ed addizionata di un pari volume di etanolo al 70% in H₂O RNase-free. Questo consente l'attivazione della colonna e il legame dell'RNA alla matrice. Il campione viene così caricato in colonna e si eseguono vari lavaggi con tamponi a diverse forze ioniche che consentono di aumentare l'affinità dell'acido nucleico per la membrana permettendo di eliminare i contaminanti. Infine l'RNA viene eluito in 35 µl di H₂O RNase-free.

Le colture cellulari di interesse sono invece state lisate con buffer RLT e l'RNA totale è stato estratto con RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) secondo le istruzioni della casa produttrice, con una metodica simile alla precedente che utilizza un detergente caotropico per la fase di lisi (contenuto nel buffer RLT). Questo sistema di estrazione è efficiente per diversi tessuti e linee cellulari.

I campioni di RNA così ottenuti sono stati conservati a -80°C fino al successivo utilizzo.

Quantificazione dell'RNA totale

La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto sono state valutate misurando la densità ottica (OD) a 260 e 280 nm mediante spettrofotometro Nanodrop (Nanodrop Technologies Inc, Wilmington, USA).

Nanodrop è uno spettrofotometro UV-VIS che permette di rilevare l'intero spettro tra 220 e 750 nm. Il sistema consente di leggere il campione senza l'uso di cuvette, sfruttando la tensione superficiale dei liquidi che mantiene il campione sotto forma di goccia in sede di lettura. La lettura viene effettuata come segue: si deposita il campione al termine di una fibra ottica (fibra ricevente), una seconda fibra ottica (fibra sorgente) viene messa in contatto con il campione in modo che il liquido riempi lo spazio tra le due fibre ottiche. La distanza tra le due fibre ottiche è di 1 mm e costituisce il cammino ottico. La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo Xenon ed una camera CCD rileva la luce dopo il passaggio attraverso il campione.

La concentrazione dell'RNA viene calcolata utilizzando la legge di Lambert-Beer :

$$A = C \times l \times a$$

dove (A) è l'assorbanza della luce, (a) il coefficiente di estinzione molare che dipende dal mezzo, (l) il cammino ottico percorso dalla luce nel mezzo e (C) la

concentrazione della sostanza analizzata. Per l'RNA 1 OD corrisponde ad una concentrazione di 40 mg/mL di acido nucleico.

Il Nanodrop presenta alcuni vantaggi nella lettura degli acidi nucleici rispetto agli spettrofotometri più comuni. È possibile infatti leggere dei campioni non diluiti, poiché il range dinamico di lettura è più esteso (XX), consentendo così di ridurre gli errori che vengono commessi concentrazione operando le diluizioni dei campioni. Inoltre è possibile visualizzare uno spettro di assorbimento completo corrispondente alla lettura, fornendo maggiori informazioni sulle caratteristiche di purezza del campione. Da ultimo poiché il volume di campione necessario per la lettura è piuttosto esiguo, è possibile determinare la concentrazione anche di campioni presenti in quantità ridotta, senza perdita degli stessi (come spesso succede quando si lavora con biopsie ottenute da pazienti).

Valutazione della qualità dell'RNA estratto

La valutazione della qualità dell'RNA estratto è stata effettuata con il sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Il sistema consente un'analisi quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto, sia totale che messengero. La metodica sfrutta la tecnologia dei microfluidi, utilizzata per muovere piccoli volumi del composto da saggiare. Il campione da analizzare viene caricato su di un supporto all'interno del quale si trovano una serie di microcanali strettamente interconnessi, dove i frammenti di acidi nucleici possono migrare sotto l'azione di una differenza di potenziale ed essere separati in base al loro peso molecolare, seguendo un principio analogo a quello dell'elettroforesi su gel di agarosio. I microcanali sono riempiti con una matrice contenente un fluorocromo che legandosi alle molecole di acido nucleico le rende detectabili da un fluorimetro alla fine della corsa

Il vantaggio di questo tipo di analisi sta nella possibilità di valutare piccole quantità di campione (mRNA, 5-250 ng; RNA totale, 25-500 ng), in circa 30 minuti. Il risultato può essere visualizzato sia con un'immagine simile a quella di una corsa elettroforetica per RNA che con un elettroferogramma (figura 7). È quindi possibile valutare l'integrità dell'acido nucleico analizzando sia il numero di bande della corsa elettroforetica sia la distribuzione dei picchi nell'elettroferogramma.

Un RNA di buona qualità mostra uno spettro caratterizzato da due picchi intensi che corrispondono ai frammenti 28S e 18S dell'RNA ribosomale e l'assenza di smearing, indice di frammentazione.

Retrotrascrizione

L' RNA totale è stato sottoposto a trattamento con DNAsi per eliminare la contaminazione da parte di DNA genomico. Ciascun campione è stato incubato con l'enzima Dnase (Dnase Treatment & Removal Reagents, Ambion, Inc, Austin, TX, USA) a 37°C per 30'. Al termine la reazione è stata bloccata con l'aggiunta del 10% in volume di Inactivation Reagent; quest'ultimo dopo

centrifugazione a 8000xg per 2' (centrifuga Eppendorf, Hambur; Germany) si depositerà sul fondo della provetta, consentendo il recupero del surnatante contenente l'RNA.

L'RNA di ogni campione così trattato è stato quindi retrotrascritto in cDNA in un volume finale di 50µl utilizzando 200 unità dell'enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), 0.5 mM di dNTPs (desossinucleotidi trifosfati), 20 unità di RNAsin Ribonuclease Inhibitor (inibitore di Rnasi purificato da placenta umana), 100 ng di random primer (Promega Corporation, Madison, WI, USA) in un tampone di reazione contenente 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ e 10 mM DTT.

La reazione consiste in un'incubazione a 70°C per 5' e quindi a 37°C per 1h; segue infine l'inattivazione dell'enzima a 92°C per 5'.

Caratterizzazione dell'espressione dei recettori purinergici mediante RT-PCR

Sul cDNA ottenuto da campioni di tessuto adiposo è stata effettuata la caratterizzazione dell'espressione dei seguenti tipi recettoriali: P2X1, P2X2, P2X4, P2X5, P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12.

I primer specifici sono stati identificati in letteratura o disegnati utilizzando il software primer 3; le sequenze e le condizioni di reazione relative ad ogni recettore sono riportate in TAB 1A. Le condizioni di PCR sono state adattate ad ogni reazione, e condotte in un volume finale di 12.5 ul.

La presenza degli amplificati specifici è stata valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio e successivo sequenziamento, nel caso fossero presenti più bande per una singola PCR queste sono state purificate da gel utilizzando PureLink GelExtraction (Invitrogen), secondo le indicazioni della ditta produttrice.

Real time PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica utilizzata per amplificare in maniera selettiva una sequenza bersaglio contenuta in una miscela eterogenea di molecole di DNA o cDNA.

Lo sviluppo della PCR real-time ha reso possibile un'analisi quantitativa, utilizzando un sistema di rilevazione ottico per misurare, in corrispondenza ad ogni ciclo di amplificazione, il segnale emesso sotto forma di fluorescenza. La reazione quindi viene valutata istante per istante (real-time) anziché solo al suo termine come nella metodica tradizionale. Il segnale fluorescente può essere generato da sistemi di tipo diverso: con coloranti fluorescenti che si legano alla doppia elica del DNA (per esempio SYBR Green I) o con diverse tipologie di sonde fluorescenti (sonde Taqman, Molecular Beacons, Hybridization Probes).

Nelle reazioni in cui si utilizza il SYBR Green, il colorante è incorporato nella doppia elica durante la fase di elongazione e perciò la fluorescenza prodotta alla fine di ogni ciclo è proporzionale all'incremento dell'amplificato rispetto al ciclo precedente. Lo svantaggio di questo sistema è che un segnale fluorescente viene originato anche da dimeri di primer e da amplificati aspecifici. Tale problema può essere risolto usando templati di dimensioni ridotte (che favoriscono

l'appaiamento specifico) ed analizzando la curva di melting (fusione) degli amplificati.

La curva di melting, eseguita al termine dell'amplificazione, individua la temperatura di fusione (T_m) specifica per ogni amplificato esaminato, dato che dipende dalla lunghezza e dalla composizione in basi del frammento di DNA. I campioni che mostrano picchi aspecifici possono così essere esclusi dall'analisi.

La curva di una reazione di amplificazione è costituita da una prima fase nella quale non si genera alcuna fluorescenza specifica, poiché il numero di amplificati che si formano è troppo basso. La durata di tale fase dipende dal gene analizzato e dal suo livello di espressione nei campioni studiati. Segue una fase di crescita esponenziale in cui ad ogni ciclo si realizza la duplicazione delle copie dell'amplificato di interesse ed infine una fase di plateau in cui la pendenza della curva cala perché non tutte le molecole di DNA vengono duplicate. Infatti, da una parte l'accumulo di prodotto comporta una relativa carenza di reattivi e dall'altra la Taq polimerasi stessa diventa meno efficiente all'aumentare dei cicli di reazione.

Una quantificazione corretta del contenuto di mRNA di interesse deve pertanto essere effettuata durante la fase esponenziale della reazione, nella quale vi è una relazione proporzionale tra il numero di molecole presenti nel campione all'inizio della reazione ed il numero di molecole di amplificato che generano il segnale di fluorescenza.

L'analisi della reazione procede definendo una soglia di intensità di fluorescenza (determinata dalla media delle intensità rilevate durante la prima fase della reazione, che di solito è rappresentata dai primi 10 cicli) al di sopra della quale il segnale viene considerato positivo.

Ogni campione viene analizzato almeno in duplicato ed in ogni reazione si include un controllo negativo costituito da un campione nel quale non viene aggiunto alcun cDNA (NTC).

La quantificazione che si realizza per mezzo della real-time PCR, può essere di tipo assoluto se si dispone di uno standard a quantità nota di template del gene di interesse ed il dato ottenuto viene espresso come numero di copie del gene in esame, oppure di tipo relativo, quando si confrontano tutti i campioni contro uno utilizzato come standard ed il risultato viene espresso in unità arbitrarie (a.u.).

La pendenza della retta standard, che si ottiene graficando il logaritmo dell'intensità di fluorescenza contro il numero di cicli ai quali il segnale fluorescente interseca la soglia, detto appunto ciclo soglia (C_t), è indice dell'efficienza della reazione. Essa deve tendere a -0.3 che corrisponde all'efficienza teorica della PCR, che ad ogni ciclo duplica il numero di molecole di template ($\log_2 = 0.3$). Infine, riportando i valori di C_t dei campioni incogniti sulla retta standard si ricava la quantità relativa di mRNA di interesse corrispondente.

Quantificazione dell'espressione dei recettori P2 mediante real time RT-PCR

Un sistema di real time PCR è stato utilizzato per quantificare la presenza dei trascritti relativi ai recettori P2Y6 e P2Y12 in cinetiche di differenziamento di

culture primarie di adipociti umani. I campioni sono stati analizzati dopo 0, 1, 4, 6, 11, 15, 18 giorni di coltura in terreno adipogenico, in presenza o assenza di rosiglitazone, agonista farmacologico di PPAR γ .

La quantificazione effettuata è di tipo relativo, lo standard utilizzato corrisponde a diluizioni seriali di un campione utilizzato come controllo positivo. Le condizioni di reazione utilizzate sono le seguenti: mix SYBR Green 10 μ l, primer forward e reverse concentrazione finale 300 nM (TAB 1B) in un volume di 20 μ l, utilizzando 5 ng di cDNA di ciascun campione.

Analisi delle mutazioni mediante sequenziamento

I primers (TAB 2.) per amplificare l'intero trascritto *ALMS1* sono stati disegnati facendo riferimento alla sequenza dell'mRNA depositata all'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) (NM_015120.4), utilizzando i softwares PRIMER3 (http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi) OLIGOANALYZER

(<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>) disponibili gratuitamente *online*.

Frammenti di circa 1 Kb sono stati quindi amplificati mediante PCR tramite protocolli standard e i primers sopra descritti con HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) secondo le istruzioni del produttore, utilizzando il cDNA ottenuto dai fibroblasti dei pazienti ALMS. Una aliquota della reazione di PCR è stata valutata mediante elettroforesi in gel di agarosio (1.5 %) con tampone TBE 1X e visualizzata mediante colorazione con Bromuro di Etidio (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, U.S.A.).

Il prodotto di amplificazione è stato purificato utilizzando Exosap (USB, OH, U.S.A.), seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

Il prodotto purificato è stato quindi quantificato in un gel di agarosio utilizzando un marcatore di massa molecolare (DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche, Germany) e successivamente sequenziato.

PCR di sequenza

Le reazioni di sequenza è stata realizzata utilizzando ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems, CA, U.S.A.), con 3 ng ogni 100 bp di prodotto purificato insieme a 1.6 pmoli degli stessi primers utilizzati per l'amplificazione. Il prodotto della reazione è stato purificato utilizzando una colonna (MICROCON PCR, Millipore, MA, U.S.A.) e quindi denaturato a 95°C per 2 min in presenza di HD Formamide (Applied Biosystems,) e analizzato utilizzando ABI 3100 Sequencing Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze così ottenute sono state analizzate e confrontate con le sequenze depositate presso la Genbank NCBI.

Per il gene *ALMS*, tutte le mutazioni trovate sono state anche confermate a livello del DNA genomico (gDNA) estratto da sangue periferico.

DNA Microarray

La tecnologia dei microarray ha avuto un rapido sviluppo dalla sua introduzione per la capacità di consentire l'analisi simultanea di centinaia di sequenze di DNA diventando così un potente strumento per lo studio del *trascrittoma* cioè del profilo di espressione genica di un sistema biologico.

L'evoluzione dei chip a DNA è stata possibile in quanto si fonda sulla fusione di un concetto biologico e un sistema tecnologico: alla base stanno infatti la capacità di appaiamento di sequenze nucleotidiche a singolo filamento complementari e la possibilità di miniaturizzazione del sistema offerta dall'industria che consente di depositare o sintetizzare *in situ* un acido nucleico.

Il vantaggio che viene quindi offerto è quello di poter valutare rapidamente l'espressione genica in due diverse condizioni biologiche.

In commercio esistono due tipologie di piattaforme per ibridazione: ad oligonucleotidi e a cDNA. In entrambi i casi le sequenze nucleotidiche sono attaccate covalentemente alla superficie in vetro ma differiscono in lunghezza; negli arrays ad oligonucleotidi le sequenze di 20-70 mer vengono sintetizzate *in situ* o depositate con sistemi particolari (spotter), nei vetrini a cDNA invece le sequenze a singolo filamento (lunghezza compresa tra 1000 e 3000 nucleotidi) possono solamente essere depositate. Gli spot che vengono così creati costituiscono set ordinati a sequenza nota consentendo così, dopo l'ibridazione, una facile identificazione della sequenza genica corrispondente al segnale rilevato.

Abitualmente lo step limitante del metodo è la quantità di campione a disposizione: sono stati perciò messi punto dei sistemi in grado di aumentare il segnale rilevato o la quantità di campione utilizzabile. Poiché anche nel nostro caso l'RNA di partenza non era sufficiente abbiamo fatto ricorso al sistema di amplificazione dell'RNA. Questo si basa su un protocollo sviluppato da Eberwine e collaboratori (Van Gelder et al 1990) e prevede l'utilizzo di una DNA polimerasi RNA dipendente per la sintesi di un filamento di DNA complementare ai trascritti del campione, innescato da un primer oligo(dT) che contiene un promotore per la polimerasi del batteriofago T7. I primers utilizzati nella retrotrascrizione T7-OligodT sono composti da un promotore per la polimerasi del batteriofago T7, da una serie di residui di deossitimidina seguita da un nucleotide ancora che consente l'annealing di ciascun primer solo all'estremità 5' della coda di poly(A), aumentando così l'efficienza della sintesi di cDNA. La sequenza dell'ancora varia nella miscela consentendo il legame ai diversi templati presenti nel campione. Dopo la degradazione dell'RNA stampo segue la sintesi di un secondo filamento di DNA e la purificazione del cDNA a doppia elica. Questo cDNA funge da template per la fase di trascrizione *in vitro* operata dalla T7 polimerasi. E' a questo livello che vengono prodotte delle molecole di RNA antisense (aRNA), complementari al messaggero originale.

Il vantaggio del sistema è quello di conservare una correlazione lineare con la quantità di ogni messaggero nel campione di partenza.

Il passaggio successivo è la sovrapposizione delle immagini generate e la quantificazione della fluorescenza, effettuata con software specifici, che sono in grado di assegnare un valore di intensità corrispondente a ciascun elemento di un

array (calcolata generalmente come la mediana dell'intensità in pixel che compongono uno spot) rispetto al segnale di background relativo all'area tra essi. I geni che presentano uno stesso livello di espressione renderanno marcato uno spot con entrambi i fluorocromi, mentre geni differenzialmente espressi nelle due condizioni in esame determineranno la predominanza di uno dei due.

Esistono diversi errori di tipo sistematico che possono influenzare i risultati ottenuti in un esperimento (es. utilizzo di quantità differenti di RNA di partenza, diversa efficienza dello scanner nei due canali, disomogeneità di ibridazione sul vetrino) è necessario quindi utilizzare dei metodi di normalizzazione da applicare ai dati prima di effettuare analisi successive.

I dati di espressione genica sono di solito presentati sottoforma di matrice in cui ogni riga rappresenta un singolo gene e contiene i livelli di espressione relativi a quel gene nelle diverse condizioni analizzate mentre ogni colonna rappresenta una diversa condizione analizzata e contiene i livelli di espressione di tutti i geni in quella data condizione. La matrice avrà quindi tante righe quanti sono i geni e tante colonne quante sono le condizioni in studio.

Ad ogni cella della matrice si assegna un valore relativo di espressione genica cioè il rapporto tra l'intensità di un gene in una data condizione rispetto alla condizione standard. Normalmente si applica una trasformazione logaritmica (generalmente in base 2) ai dati di espressione, per garantire l'uguaglianza degli intervalli di variazione per geni sovra e sottoespressi.

L'identificazione di geni differenzialmente espressi nelle condizioni confrontate può avvenire mediante la definizione di un valore soglia, i geni che superano il valore soglia definito sono considerati differenzialmente espressi. In realtà è necessario verificare se gli spostamenti osservati siano o meno dovuti al caso, sono stati perciò elaborati dei programmi in grado di considerare i valori di intensità dei due canali come variabili statistiche a cui si possono associare dei modelli probabilistici. Dopo aver valutato i geni differenzialmente espressi è possibile utilizzare metodi di clustering che consentono di raggruppare unità statistiche (in questo caso i geni) sulla base di misure di similarità/dissimilarità. L'uso di algoritmi di cluster consente di creare dei gruppi di geni che presentano lo stesso profilo di espressione, fornendo un aiuto nell'identificazione di geni funzionalmente correlati come ad esempio geni appartenenti alla stessa via di segnalazione o allo stesso pathway metabolico.

Preparazione del campione

L'RNA totale di colture primarie di fibroblasti umani è stato estratto con RNeasy mini kit (Qiagen), la quantificazione del campione è stata effettuata mediante lettura allo spettrofotometro (Eppendorf) di una diluizione in TE (pH=8), valutandone l'assorbanza a $\lambda=260\text{nm}$. La qualità è stata analizzata utilizzando l'applicazione Eukaryote total RNA Nano assay del Bioanalyzer 2100 Agilent (Agilent Technologies), vedi paragrafi precedenti.

Amplificazione dell'RNA

1.5 µg di RNA totale di ciascun campione sono stati utilizzati per la reazione di amplificazione, che è stata eseguita seguendo le istruzioni fornite dal produttore (Invitrogen, SuperScript™RNA Amplification Sistem Cat. No. L1016-01). Nello step di trascrizione *in vitro* è stato incorporato un nucleotide modificato 5-(3-aminoallyl)UTP (Sigma A5660) che possiede in posizione C5 dell'uracile un gruppo amminico. E' stato così generato un RNA antisense (aRNA) marcato con un gruppo amminoallilico in grado di reagire chimicamente con il gruppo estero dei fluorofori (NHS-Cy). L'aRNA amplificato è stato quantificato mediante lettura allo spettrofotometro e la sua qualità è stata valutata con l'applicazione mRNA Nano assay del Bioanalyzer 2100 Agilent.

Marcatura

5 µg di aRNA del campione e del relativo controllo sono stata marcati con aliquote di fluoroforo monouso Cy™3 e Cy™5 (Amersham Biosciences), purificati dall'eccesso delle cianine utilizzando le colonne fornite dal kit Invitrogen ed eluiti in 100 µl di H₂O DEPC. Una diluizione del marcato è stata misurata allo spettrofotometro (Nanodrop). La valutazione dell'assorbanza a 650nm e 550nm ha permesso di quantificare le picomoli di fluoroforo (Cy5 o Cy3) incorporate.

Per consentire la risospensione in un adeguato volume di buffer di ibridazione, 200 picomoli di ciascuna cianina sono state riunite e precipitate con ammonio acetato (Sigma) ed etanolo.

Ibridazione

Le piattaforme di ibridazione utilizzate sono state acquistate presso il CRIBI (Università di Padova, www.microcribi.unipd.it). Questi appartengono al set oligo Uomo e rappresentano una collezione di 21329 sequenze di settantimeri (Operon 2.0), depositate in doppio sul supporto in vetro (MICROMAX Glass Slide, PerkinElmer). Gli oligonucleotidi sono disegnati su cluster di Unigene Human, corrispondono alla regione 3' terminale del gene depositato.

Prima di depositare il campione, gli array sono stati sottoposti ad una pre-ibridazione di un'ora a 48°C in un tampone appropriato (SSC 5X, SDS 0.1%, ss-DNA 100ng/µl, Denhardt's solution 5X), per ridurre l'ibridazione aspecifica.

I campioni, dopo essere stati concentrati, sono stati risospesi in un appropriato buffer di ibridazione (SSC 5X, SDS 0.1%, formammide 25%, ss-DNA 50 ng/µl) scaldato alla temperatura di ibridazione, la sonda così ottenuta è stata denaturata a 95°C per 2' ed applicata sull'array. L'ibridazione è stata condotta a 48°C per tutta una notte in un sistema di ibridazione automatica (ArrayBooster™, Advalytix), che possiede il vantaggio di mantenere la soluzione in continua agitazione durante l'ibridazione.

Successivamente sono stati eseguiti dei lavaggi seriali con SSC e SDS in modo tale da rimuovere l'eccesso di sonda e di aumentare la stabilità del legame tra questa e gli oligonucleotidi depositati. Dopo essere stato asciugato, il vetrino è stato sottoposto a scansione con un sistema laser (ScanArray Lite, PerkinElmer).

Repliche

Per ogni condizione il campione è stato analizzato in duplicato, effettuando l'inversione dei fluorofori. Quindi in una replica il campione derivato dal paziente in esame è stato marcato con CyTM3 e il pool di controlli con CyTM5, mentre nel vetrino di replica il primo è stato marcato con CyTM5 e il secondo con CyTM3. Questo tipo di controllo consente di ridurre dell'errore derivato dalla efficienza di incorporazione dei fluorofori e dalla intensità di emissione di fluorescenza.

Normalizzazione

I dati grezzi di intensità di fluorescenza ottenuti per ogni esperimento nei due canali, sono stati organizzati in unico file, questo è stato poi *normalizzato* secondo un metodo LOWESS, nel quale gli errori sistematici commessi nella valutazione della media del rapporto di fluorescenza tra i due canali sono corretti per il valore medio locale.

Il software utilizzato per condurre questa analisi è stato MIDAS, disponibile gratuitamente in rete all'indirizzo <http://www.tigr.org/>.

Analisi dei dati : identificazione di geni differenzialmente espressi

Dopo la normalizzazione per ciascun gene verrà identificato un dato di *rapporto di espressione*, corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel controllo. Il logaritmo in base 2 di questo valore consente di identificare un intervallo all'interno del quale geni che possiedono livelli di espressione costanti avranno $\log_2(\text{ratio})$ pari a zero, mentre geni con espressione up o down regolata avranno valori rispettivamente superiori o inferiori ad un cut-off scelto (nel nostro caso ± 0.7).

I geni che mostrano un significativo fold change (differenzialmente espressi) all'interno dei due gruppi sono stati identificati attraverso l'utilizzo di un'analisi statistica di tipo SAM (Thusher V.G. et al, 2001).

Questo test combina l'assegnazione di un punteggio calcolato attraverso un t test ($[S = R_g / (c + SE_g)]$), dove R_g è la media del rapporto logaritmico dei livelli di espressione per un singolo gene, SE_g è l'errore standard e la costante c è il valore del 90 percentile per SE_g con un'analisi di permutazione e il calcolo del tasso di falsi positivi (FDR) per ciascun gene.

KEGG PATHWAYS e GENE ONTOLOGY

Per correlare con maggior efficienza i dati ottenuti dall'interpretazione degli array dopo il 'filtro' statistico ad un significato biologico, sono state usate due banche dati pubbliche che forniscono informazioni sulle reti di connessione esistenti tra geni. GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome, <http://www.genome.jp/kegg/>).

Questi sistemi permettono di individuare con una certa rapidità la modulazione di vie di segnale, rendendo così possibile formulare ipotesi riguardanti la condizione analizzata.

Validazione dei dati

Una volta selezionati i geni di interesse, si è proceduto a validare i risultati ottenuti mediante PCR quantitativa. I primers specifici sono stati disegnati con primer3; le sequenze e le condizioni di reazione sono riportate nella TAB 3. Le condizioni di reazione sono state messe a punto su ogni primer e i dati di fluorescenza ottenuti sono stati normalizzati sul gene housekeeping HMBS.

SAGGI FUNZIONALI

Valutazione della sensibilità dei recettori purinergici ai nucleotidi attraverso la valutazione dei flussi di calcio

Colture primarie di adipociti maturi, piastrate su vetrino coprioggetto, sono state incubate per 30 minuti a 37°C al buio in PBS 1X addizionato con Ca^{2+} , in presenza di una sonda fluorescente sensibile al calcio (fura-2/AM [2 μ M]). Questa sonda permette di distinguere la quantità di calcio libero all'interno della cellula. Il colorante è in grado di entrare all'interno delle cellule, dopo l'ingresso il legame estereoico viene idrolizzato e il Fura è a disposizione per l'interazione con il calcio, l'accoppiamento del fura con lo ione modifica la capacità di assorbimento/emissione del fluoroforo stesso. E' così possibile monitorare se la concentrazione del calcio intracellulare viene modificata. Dopo l'incubazione le cellule sono lavate due volte con PBS 1X e incubate in una soluzione salina (140mM NaCl, 5.0mM KCl, 1.0mM $MgCl_2$, Hepes 25mM e glucosio 5Mm, pH 7.4) contenente o meno $CaCl_2$ 1.0 mM. I vetrini sono quindi stati trasferiti in una cameretta termostata posta sul piano di un microscopio invertito a fluorescenza. Un laser colpisce alternativamente la cameretta con ad lunghezza d'onda di 340 e 380 nm, le immagini degli adipociti marcati con fura-2 vengono acquisite attraverso una telecamera CCD. Dopo avere sottratto il background, si calcola il rapporto tra le intensità della fluorescenza ottenuta alle due lunghezze d'onda per ciascun campione. I dati ottenuti vengono analizzati utilizzando il software Metafluor (Universal Imaging Corporation, PA, USA).

Valutazione del rilascio di ATP

La valutazione del rilascio di ATP in colture primarie di adipociti è stata effettuata utilizzando un sistema in chemiluminescenza ENLITEN rLuciferase/Luciferin (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

I preadipociti sono stati seminati alla concentrazione di 3.5×10^3 cellule/cm² e una aliquota del medium di coltura a diversi stadi del differenziamento (tempo 0, 7 e 14 giorni dopo il differenziamento) è stata utilizzata per misurare la concentrazione del nucleotide.

La presenza di ATP nel medium di coltura è riscontrata grazie alla capacità dello strumento di rilevare l'emissione luminosa generata dalla seguente reazione:



Il sistema prevede l'aggiunta al campione in esame del reattivo che contiene luciferina e luciferasi e l'immediata lettura del campione al luminometro (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Il sistema si basa sul fatto che quando l'ATP è la componente limitante nella reazione, la luce emessa è proporzionale alla concentrazione di ATP. La quantificazione viene eseguita usando una retta standard ottenuta eseguendo diluizioni seriali di ATP (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Valutazione del rilascio di IL-6

Adipociti differenziati *in vitro* dopo 24 h di coltura con un medium privo di siero sono stati trattati con dosi crescenti di ATP (SigmaAldrich) per 3h. Il terreno è stato quindi raccolto conservato a -80°C fino allo svolgimento del test. Il rilascio di IL6 è stato valutato mediante saggio immuno-enzimatico ELISA (BioSource International, USA). L'anticorpo specifico è immobilizzato sul fondo della micropiastra utilizzata per la titolazione, dopo l'aggiunta del campione da testare viene addizionato un secondo anticorpo biotinilato che lega l'antigene a livello di un secondo epitopo. Successivamente si rimuove dell'eccesso di anticorpo secondario e si introduce l'enzima streptavidina-perossidasi, che dopo il legame con l'anticorpo biotinilato, è in grado di mediare la deposizione di un substrato cromogeno. L'intensità del colore prodotto (lettura dell'assorbanza a 450 nM) è proporzionale alla concentrazione di IL6 presente. La quantificazione viene effettuata attraverso l'uso di una curva standard.

REALIZZAZIONE DI UN NUOVO MODELLO MURINO PER LA SINDROME DI ALSTRÖM

In una linea di cellule ES derivanti dal ceppo 129/SvPas è stata utilizzata una cassetta pT1betageo per generare una linea *gene trap* a livello del gene *Alms1* (A028F08 GGTC, German Gene Trap Consortium). La cassetta è localizzata nell'introne 7 del gene, FIG 10.

Dopo l'identificazione mediante PCR della corretta inserzione, le cellule ES *Alms1* +/- sono state microiniettate in una blastocisti derivante dal ceppo C57BL/6J.

I maschi chimera ottenuti sono stati incrociati (backcross) per C57BL/6J e la progenie agouti (N1F1) è stata genotipizzata per la presenza della mutazione. La progenie eterozigote F1 è stata poi incrociata (intercross) producendo circa 350 animali di generazione N1F2.

Gli animali, in questo studio, sono stati mantenuti presso il The Jackson Laboratory (Research Animal Facility), Maine-USA.

I topi descritti sono stati alimentati con una dieta dalle seguenti caratteristiche: 18% proteine e 4% di contenuto in grassi. Agli animali è stato fornito accesso illimitato all'acqua (acidificata con HCl, pH 2.8-3.2) in un ambiente a temperatura e umidità controllate e con un ciclo di 12 ore luce/buio.

Genotipizzazione della progenie N1F2

La genotipizzazione è stata effettuata partendo dalla purificazione di DNA genomico derivante dalla coda dei topi ottenuti. Brevemente: la coda viene digerita con proteinasi K e il DNA precipitato con isopropanolo, il pellet viene quindi lavato in etanolo e risospeso in TE 1X.

Primers specifici sono stati disegnati con il software MacVector per rilevare la presenza degli alleli wild type e mutante relativi al gene *Alms1*. Per identificare il primo, è stato scelto un primer a livello di una regione a monte (GT-F1) e una valle dell'inserimento (GT-R1) (entrambi nell'introne 7). Per identificare l'avvenuta inserzione della cassetta, la reazione è stata condotta usando il primer GT-F1 mentre l'altro è stato disegnato all'interno della stessa (En2.4R). La composizione in basi dei primers utilizzati è la seguente:

GTiF1	5'-		
AACCTGCTGAACCAAATCAC-3',	GTIR1	5'-	
CATTGACAAAGTCCAACACCC	-3',	En2.4R	5'-
AACGGGTTCTTCTGTTAGTCC-3'.			

Le condizioni di PCR utilizzate sono: 94°C 2min ; seguito da 45 cicli di 94°C 20'', 54°C 30'', 72°C 30'' con una fase di estensione finale a 72°C per 7min.

Il prodotto di amplificazione per entrambi gli alleli è stato separato mediante gel di agarosio (2%) e visualizzato mediante colorazione con bromuro di etidio.

Nel caso di presenza dell'allele wild type la banda relativa è a circa 300 bp, nel caso della presenza della cassetta la banda corrispondente è evidenziata a circa 700 bp.

Fenotipizzazione della progenie N1F2

Il peso corporeo, la concentrazione di glucosio plasmatico e i livelli di insulina sono stati misurati a partire dalla quarta settimana di vita, con cadenza mensile.

Sangue intero è stato prelevato attraverso la via sino-orbitale usando capillari trattati con EDTA. I campioni sono stati centrifugati a 6000rpm per 6 min a 4°C, il plasma così collezionato è stato utilizzato per le successive misurazioni.

L'insulina plasmatica è stata misurata usando ultrasensitive mouse insulin ELISA kit (ALPCO Diagnostics). I livelli di glucosio sono stati invece valutati usando Beckman Coulter Synchron CX5 Delta chemistry analyzer.

La valutazione della percentuale del grasso corporeo è stata effettuata in 10 animali anestetizzati per ogni gruppo, con Lunar PIXImus II (GE Medical

System, Madison, WI), utilizzando cioè un sistema densitometrico DEXA a bassa energia (*dual-energy X-ray absorptiometry*).

Fissazione e Colorazione con X-gal

Topi adulti sono stati sacrificati inducendo l'asfissia con CO₂ o per dislocazione cervicale.

I tessuti raccolti sono stati lasciati 4 ore in PFA 2% a temperatura ambiente e successivamente sciacquati in PBS.

Per la colorazione degli embrioni, il tempo di fissazione è stato proporzionale alle dimensioni degli stessi.

Dopo la fissazione i tessuti o gli embrioni sono stati incubati tutta la notte a 37 °C, in una soluzione di X-gal (potassio ferrocianide 5mM, potassio ferricianide 5mM, MCl₂ 2mM, Nonidet P40 0.02%, sodio deossicolato 0.01%, X-gal 1 mg/ml in PBS 1X, www.baygenomics.ucsf.edu/protocols/). Dopo due lavaggi in PBS 1X, i campioni sono stati visualizzati e fotografati usando uno stereomicroscopio Leica, per rilevare la presenza del colore blu dovuta all'attività beta-galattosidasi.

STATISTICA

Tutti i risultati sono stati espressi come valori medi \pm DS. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test T di Student e un valore di P <0.05 è stato ritenuto statisticamente significativo.

INTRODUZIONE (I)

Nucleotidi e Recettori Purinergici

A partire dal 1976 e nei due anni successivi sono state poste le basi per distinguere due tipi di recettori presenti a livello della membrana plasmatica, responsivi a nucleotidi extracellulari. Sono state infatti identificate le classi dei recettori purinergici P1 e P2 i cui agonisti principali sono rispettivamente il nucleoside adenosina (ADO) e i nucleotidi ATP/ADP.

La classificazione è stata effettuata a livello funzionale (tipologia del recettore) e a livello farmacologico tramite l'identificazione degli agonisti, ma è stata rivista negli ultimi anni dopo l'analisi della sequenza nucleotidica e della struttura terziaria. Fino ad oggi sono stati clonati e caratterizzati 15 recettori P2 nei mammiferi, di alcuni inoltre è stata identificata la funzione biologica dopo stimolazione con nucleotidi extracellulari. E' stato così possibile identificare il loro coinvolgimento in molteplici e differenti processi fisiologici nei diversi tipi cellulari.

I recettori per purine e pirimidine P2 sono divisi in due sottofamiglie in dipendenza dal meccanismo di trasmissione del segnale: canali ionici attivati da ligando (P2X) e recettori accoppiati a proteine G (P2Y).

I recettori P2X possiedono due subunità idrofobiche che costituiscono i segmenti transmembrana TM1 e TM2 che sono separati da un dominio extracellulare contenente 10 residui di cisteina, in grado di formare ponti disolfuro.

Gli estremi C- ed N-terminale di queste proteine si localizzano a livello del citosol, la porzione extracellulare invece possiede dei siti di glicosilazione e le due porzioni transmembrana possono contribuire alla formazione di un poro dopo l'assemblaggio dei recettori stessi in strutture multimeriche dando così origine a vie di permeabilizzazione della cellula. In particolare la capacità di dare origine a un poro non selettivo sulla membrana plasmatica è stata dimostrata per P2X7.

L'agonista naturale per questa classe di recettori è l'ATP e affinché il suo legame si determini in modo corretto sembrano essere necessarie delle lisine extracellulari, conservate nei P2X, localizzate alle estremità delle regioni TM1 e TM2 e il legame di uno Zn^{2+} a livello di alcuni residui di istidina per determinare l'apertura del canale.

La trasduzione del segnale avviene attraverso il rapido influsso di Na^+ e Ca^{2+} e il rapido eflusso di K^+ , portando alla depolarizzazione della membrana plasmatica e all'incremento della concentrazione di Ca^{2+} nel citoplasma, attivando così numerosi secondi messaggeri. E' noto anche che la di questa classe di recettori sono suscettibili a desensitizzazione che può avvenire sia in maniera rapida che lenta.

I recettori del tipo P2Y sono proteine caratterizzate dalla presenza di 7 domini transmembrana, la porzione N-terminale è situata nella regione extracellulare mentre il dominio C-terminale si trova nella porzione citoplasmatica. Studi di tipo farmacologico hanno identificato ATP e UTP come ligandi per questa sottofamiglia, mettendo in evidenza le diverse affinità per i differenti sottotipi recettoriali. FIG

La trasduzione del segnale avviene mediante l'attivazione di proteine G differenti, la cui tipologia dipende dalla porzione C-terminale associata e che possono appartenere alle classi $G_{q/11}$, G_s e G_i . Queste danno avvio ad una cascata di segnale intracellulare che porta alla produzione di secondi messaggeri che possono determinare l'attivazione della fosfolipasi C e il rilascio di calcio intracellulare o agire sull'adenilato ciclasi portando alla variazione dei livelli di cAMP.

Fino al 1972 gli unici ruoli noti dell'ATP erano quelli di substrato energetico rapidamente disponibile e di costituente base per la sintesi di DNA. Inoltre era presente una forte opposizione al concetto che l'ATP potesse svolgere un ruolo extracellulare, gli argomenti principali a supporto di questa ipotesi erano la carica fortemente negativa e la grossa dimensione della biomolecola che determinavano ne impedivano il passaggio attraverso la membrana per diffusione semplice. La scoperta che questo nucleotide veniva rilasciato da alcune terminazioni nervose ha portato all'identificazione di un suo coinvolgimento nei complessi meccanismi di segnalazione cellulare.

Il primo meccanismo identificato per il rilascio di ATP è stato la lisi cellulare, attualmente è noto come la liberazione di ATP avvenga anche in maniera fisiologica. Dati sperimentali hanno dimostrato che cellule neuronali liberano ATP mediante esocitosi, mentre altri tipi cellulari utilizzano meccanismi mediati da trasportatori ubiquitari: ATP binding cassette (ABC), proteine altamente conservate. L'ATP inoltre sembra essere rilasciato in seguito a fenomeni meccanici di distensione e distorsione delle membrane.

Dopo la liberazione l'ATP viene inattivato molto rapidamente da numerosi enzimi che sono raggruppati nella classe delle ecto-nucleotidasi che funzionano defosforilando il substrato fino alla generazione di adenosina. Gli intermedi prodotti durante questa degradazione sono anch'essi biologicamente attivi.

La trasduzione del segnale attraverso recettori di tipo purinergico può essere classificata secondo due tipologie: rapida e lenta.

Nel primo caso possiamo includere eventi di cotrasmissione e neuromodulazione, secrezione di tipo esocrino ed endocrino, aggregazione piastrinica, regolazione del tono muscolare e trasmissione nocicettiva.

Meccanismi di segnalazione lenta (trofica) sono coinvolti nella proliferazione e differenziamento cellulare, apoptosi durante lo sviluppo embrionale, riparazione e riassorbimento osseo, aterosclerosi, restenosi ed ischemia, turnover cellulare nel derma, in organi viscerali e cancro.

In particolare, segnalazioni di questo tipo svolgono un ruolo importante in meccanismi coinvolti nell'infiammazione e nell'immunomodulazione.

Recentemente sono state identificate numerose sequenze di DNA che codificano per motivi caratteristici dei recettori metabotropici, ma i cui ligandi non sono ancora identificati (recettori orfani). Per individuare recettore e ligando specifico normalmente si utilizza uno screening di librerie di ligandi putativi e con questo sistema è stato identificato un recettore sensibile all'UDP-glucosio: il recettore

P2Y₁₄. L'uridin difosfoglucosio (UDPG) appartiene alla famiglia degli esosi ed è ampiamente riconosciuto il suo ruolo nella sintesi di carboidrati.

È stato dimostrato che UDPG è in grado di determinare rapidamente l'innalzamento del livello di Ca²⁺ intracellulare. Inoltre poiché il trattamento con la *tossina della pertosse* elimina gli effetti UDPG mediati, è stato dimostrato che il suo recettore è accoppiato ad una proteina del tipo G_{i/o}.

Studi di espressione a livello tissutale del recettore nell'uomo hanno dimostrato che il recettore P2Y₁₄ è presente ad alti livelli nella placenta, nel tessuto adiposo, nello stomaco e nell'intestino mentre lo è a livelli moderati nel cervello, nella milza, nel polmone e nel cuore.

Lavori recenti hanno ipotizzato un ruolo del recettore nel processo infiammatorio. L'identificazione della sua presenza a livello delle cellule dendritiche unita all'osservazione di una parziale omologia di sequenza (20-30% aa) con i recettori per le chemochine, suggeriscono un possibile ruolo nella segnalazione di danno e quindi un coinvolgimento nella risposta immunitaria.

Infiammazione, recettori purinergici e nucleotidi extracellulari

Le molecole segnalatorie costituiscono un elemento essenziale per il mantenimento della reazione infiammatoria. Esse sono coinvolte nel reclutamento di leucociti, mast cell e APC a livello del sito infiammatorio fino a che il danno non sia risanato. In particolare i nucleotidi extracellulari costituiscono una nuova e importante classe di molecole segnalatorie coinvolte nell'infiammazione.

Recettori purinergici sono localizzati sulla membrana plasmatica di molte cellule coinvolte nella risposta infiammatoria come cellule dendritiche, monociti/macrofagi, linfociti ma anche da cellule appartenenti alla glia. Inoltre nucleotidi sono rilasciati a livello di siti infiammatori da cellule danneggiate o possono sfruttare meccanismi di trasporto sopra descritti. Molti tipi cellulari sono in grado di secernere ATP se sottoposti a stimoli particolari, ad esempio cellule endoteliali ed epiteliali sottoposte a shear stress, macrofagi e microglia in presenza di LPS, piastrine stimulate da adenosina e trombina, cellule T citotossiche attivate a livello del proprio TCR.

Le vie che vengono attivate in seguito all'aumento di ATP extracellulare coinvolgono l'induzione di proliferazione e differenziamento, il rilascio di istamina, di prostaglandine e citochine, la chemotassi di cellule con capacità fagocitica. Inoltre ATP è in grado aumentare la permeabilità cellulare a soluti di basso peso molecolare, inducendo la morte cellulare.

In particolare la simulazione in vivo di un danno da corpo estraneo ha portato all'osservazione che l'espressione di alcuni recettori purinergici a livello dei vasi di neoangiogenesi, dei macrofagi e delle cellule giganti viene modulata durante lo stato infiammatorio suggerendo così una funzione regolatoria dei processi infiammatori da parte di questa classe recettoriale³⁵. Tra la classe dei recettori purinergici ionotropi è stato estensivamente studiato il ruolo di P2X₇, in grado di formare complessi multimerici che danno origine a pori di membrana, per alcuni ricercatori questo determinerebbe la variazione delle concentrazioni ioniche citoplasmatiche con stimolazione della produzione di IL-1 β matura.

Nei macrofagi è stata osservata la variazione del potenziale di membrana determinata da ATP ed è stata associata all'aumento della trascrizione di IL-6. In monociti P2X7 sembra essere coinvolto nel rilascio di IL-18. Tutte queste caratteristiche fanno presumere che i recettori purinergici possano essere coinvolti nella presentazione dell'antigene.

Sono stati generati modelli murini di delezione genica per alcuni recettori, si è quindi potuto osservare come P2X7 -/- mostri alterazioni nella produzione di citochine e fattori chemoattrattanti per macrofagi. Un modello doppio ko per P2Y1 e P2Y2 mostra una ridotta risposta immunitaria innata con diminuzione della sopravvivenza, calo nella produzione di IL6 e dell'infiltrato macrofagico.

Il sistema purinergico è stato implicato nella modulazione della motilità di cellule endoteliali e dendritiche attraverso il riarrangiamento del citoscheletro, azione svolta rispettivamente da P2Y2 e P2Y4 e P2Y11. L'effetto mediato da P2Y6, UDP sensibile, è stata riferita all'attivazione della ben nota via infiammatoria di NF-Kbeta.

Come già ampiamente descritto, il segnale trasmesso dai recettori purinergici dipende da un'ampia varietà di fattori, inclusi l'espressione dei recettori stessi e la loro sensibilità, come pure i livelli di nucleotidi e nucleosi extracellulari. E' quindi comprensibile che la segnalazione, durante la risposta infiammatoria, è resa più complessa dalla sintesi di elementi immunomodulatori che regolano in modo dinamico l'espressione dei recettori e degli enzimi responsabili della degradazione dei nucleotidi.

E' quindi evidente come l'ATP eserciti un ruolo complesso nella risposta infiammatoria: funziona da segnale di danno locale reclutando e stimolando le cellule del sistema immunitario a svolgere funzioni riparatrici. D'altro canto è anche in grado di dare avvio ad una risposta di ben altro tipo: è capace di indurre la cellula stessa alla morte. Una possibile spiegazione di questa dicotomia è la capacità di ATP di essere agonista delle due classi di P2: ad alte concentrazioni e come stimolo prolungato potrebbe attivare i P2X portando alla lisi cellulare, mentre a concentrazioni più basse e pulsatili potrebbe agire sui P2Y attivando un segnale di riparazione.

Tessuto adiposo, recettori purinergici e nucleotidi extracellulari

L'analisi del ruolo del nucleotide ha portato ad osservare un'ampia gamma di effetti a livello del tessuto adiposo sia bruno che bianco.

In adipociti bruni di ratto la stimolazione con ATP dei recettori purinergici ha portato all'osservazione della generazione di acidi grassi in seguito all'attivazione di canali per K^+ voltaggio dipendenti e l'aumento del metabolismo cellulare, lo stimolo all'esocitosi, la regolazione dell'attività proliferativa cellulare.

In adipociti bianchi l'azione dell'ATP è stata rilevata come una forte riduzione del trasporto di glucosio mediato da insulina, senza influenze sul trasporto basale; peraltro una riduzione dei trasportatori GLUT-1 e GLUT-4 è stata evidenziata anche in cardiomiociti di ratto dopo stimolazione con ATP.

E' stata messa in luce l'esistenza nel tessuto adiposo di un meccanismo di controllo negativo, mediato da ATP e P2r, sul rilascio di leptina. I sistemi identificati coinvolgono due vie: in un caso si è osservata una riduzione

dell'espressione genica regolata dalla variazione dei livelli di cAMP, nell'altro si è osservata un'inibizione della secrezione dell'adipocitochina, mediato dai livelli di Ca^{2+} intracellulare.

Inoltre l'attivazione dei recettori da parte di ATP ha come conseguenza l'aumento della lipolisi.

Insulina, recettori purinergici e nucleotidi extracellulari

Molti autori hanno indagato la relazione tra recettori purinergici e insulina, innanzitutto è stata osservata la presenza di recettori del tipo P2Y a livello delle cellule β del pancreas.

Questo dato ha consentito di valutare l'effetto del ligando su tale sistema.

Studi condotti su isole pancreatiche di ratto e su una linea cellulare (INS-1) hanno dimostrato la capacità stimolatoria di ATP sulla secrezione di insulina. Inoltre la somministrazione di ATP nel medium di coltura determina un aumento del rilascio ormonale, osservato anche come potenziamento degli effetti fisiologici del glucosio stesso sulla secrezione dell'insulina.

Sembra che i meccanismi capaci di indurre questo tipo di fenomeno vengano attuati secondo due diverse vie. In un caso è stata associata l'attivazione di canali K^+ sensibili all'ATP, attraverso l'innalzamento dei livelli di calcio intracellulare. Inoltre è stata osservata una correlazione significativa tra rilascio di insulina glucosio dipendente e aumento dei livelli di cAMP, evidenza che porta a postulare un coinvolgimento del signalling PKA dipendente.

In ratti indotti al diabete da trattamento con streptozotocina si è osservata una capacità di secrezione insulinica dopo la somministrazione di un analogo dell'ATP.

RISULTATI (I)

Caratterizzazione dell'espressione dei recettori purinergici nel tessuto adiposo

La valutazione della presenza dei trascritti relativi ai diversi tipi recettoriali è stata effettuata mediante PCR semi-quantitativa. I primers specifici sono stati raccolti in letteratura o disegnati utilizzando il software primer3 e le condizioni di reazione sono state messe a punto per ogni recettore.

Per valutare il profilo di espressione dei recettori stessi nel tessuto adiposo, i prodotti di PCR sono stati caricati in gel di agarosio, e i campioni sono stati confrontati con l'amplificato ottenuto nel controllo positivo adeguato.

Per verificare che il prodotto di PCR derivi dall'mRNA e non dalla presenza di DNA contaminante è stato utilizzato un controllo negativo di PCR, ottenuto omettendo l'enzima retrotrascrittasi (M-Mulv) nella reazione di sintesi del cDNA. Nessun prodotto di PCR è stato ottenuto da tali controlli negativi, quindi permettendo di concludere che la banda visualizzata si riferisce al trascritto in esame.

Quasi tutti i recettori purinergici P2 sono espressi nel tessuto adiposo

In questo studio è stato analizzato se i membri della famiglia recettoriale P2 siano espressi nel tessuto adiposo e come essi siano regolati durante l'adipogenesi. A tal proposito abbiamo quindi verificato quale sia la distribuzione all'interno dei compartimenti sottocutaneo e viscerale del tessuto adiposo umano e quale sia il profilo di espressione durante il processo differenziativo che porta alla maturazione della cellula adiposa.

Come mostrato in figura FIG 1, l'mRNA di quasi tutti i sottotipi recettoriali espressi risulta presente nei campioni di tessuto adiposo analizzati. In particolare abbiamo identificato che P2X1, P2X2, P2Y1 e P2Y11 mostrano gli stessi livelli di espressione del controllo positivo. In tutti i campioni, P2Y13 mostra un livello di espressione più basso rispetto a quello del controllo positivo. Differentemente P2X3 non è stato identificato nei campioni analizzati.

Alcuni di questi mostrano delle possibili isoforme o varianti di splicing.

L'uso di primers specifici per le sequenze codificanti di P2X4, P2X5, P2X7 e P2Y4 hanno messo in luce la presenza di più amplificati rispetto all'unico

prodotto atteso. In particolare per P2Y4 la banda ulteriore è stata identificata solo nei campioni di tessuto adiposo.

Tutti gli ampliconi generati dalla reazione di PCR sono stati sequenziati, confermando la specificità della reazione. Il software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>) è stato utilizzato per confrontare le sequenze ottenute con quelle depositate presso le banche dati pubbliche NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ed ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>). Questa analisi ha portato ad identificare che la banda più piccola relativa a P2X4 è il risultato della completa delezione di un esone di 97 bp.

Il sequenziamento dell'amplicone a basso peso molecolare di P2X5 ha mostrato la delezione di un frammento di circa 84 bp all'interno di un esone di 134 bp.

Per quanto riguarda invece il sottotipo P2X7 il sequenziamento delle due diverse bande ha identificato l'omologia con diverse varianti di splicing, in particolare l'amplicato di dimensioni maggiori corrisponde alle sequenze con i seguenti numeri di accesso AY847299, AY847303, AY847298 e AY847301, mentre la banda a basso peso molecolare evidenzia la presenza dei seguenti trascritti NM_002562, AY84702, AY84704. Tutte le sequenze nominate corrispondono a varianti di splicing del gene P2X7.

Espressione dei recettori P2Y6 e P2Y12 durante l'adipogenesi

L'analisi dei tipi recettoriali P2Y6 e P2Y12 ha portato all'evidenza che questi due membri della famiglia sono differenzialmente espressi durante l'adipogenesi: in particolare l'espressione di P2Y6 risulta essere maggiore nei preadipociti negli rispetto agli adipociti maturi, ottenuti sia mediante coltura *in vitro* che mediante isolamento *ex vivo*.

La regolazione dell'espressione di P2Y12 mostra invece un andamento opposto: ridotta nella frazione vasculo-stromale ricca in preadipociti e abbondante nella frazione matura FIG .

Per caratterizzare con maggior precisione l'andamento dell'espressione di P2Y6 e P2Y12, il contenuto in mRNA di questi trascritti è stato quantificato durante una cinetica di differenziamento *in vitro* (0, 1, 4, 6, 11, 15 e 18 giorni dopo l'aggiunta del terreno di differenziamento adipogenico) e in preadipociti e adipociti direttamente isolati *ex vivo*, mediante real-time RT-PCR.

Il differenziamento adipogenico *in vitro* è stato condotto in presenza o assenza di rosiglitazone, agonista di PPAR γ , per valutare se i recettori purinergici potessero essere regolati attraverso questo importante fattore trascrizionale. In tutte le cinetiche realizzate è stata analizzata l'espressione di geni tessuto-adiposo specifici, al fine di caratterizzare dal punto di vista dell'espressione genica il differenziamento evidenziato dall'osservazione alla microscopia ottica. A tale scopo è stata quantificata l'espressione di PPAR γ , FABP4 and Leptina, identificando un aumento dell'espressione di questi geni durante il differenziamento (dati non mostrati).

Come mostrato in FIG 2, P2Y6 mRNA risulta significativamente più espresso nei preadipociti e rapidamente down regolato dopo 24 ore dall'induzione.

Successivamente il suo livello di espressione rimane pressoché stabile durante tutto il processo differenziativo. Tale profilo di espressione non viene modificato dall'aggiunta di rosiglitazone differenziamento nel terreno adipogenico, suggerendo la mancanza di una regolazione diretta di tale gene da parte del PPAR γ .

Lo stesso profilo di espressione si osserva anche nei campioni di preadipociti ed adipociti maturi direttamente isolati dal tessuto adiposo FIG 2.

Il recettore P2Y₁₂ risulta essere solo debolmente espresso da colture primarie di preadipociti, il suo livello di espressione aumenta a partire dall'induzione del differenziamento, raggiungendo differenze statisticamente significative a partire dal sesto giorno. Dopo questo punto i livelli di espressione rimangono sostanzialmente conservati durante tutto il differenziamento. Anche in questo caso non sono apprezzabili differenze significative tra campioni derivanti da cinetiche condotte in presenza o assenza di rosiglitazone, indicando l'indipendenza della regolazione dell'mRNA di questo gene dal fattore trascrizionale PPAR γ , FIG 2.

Questo andamento di espressione è confermato anche nelle frazioni direttamente isolate dal tessuto adiposo: nella frazione vasculo-stromale il livello di RNA messaggero è inferiore a quello ottenuto da adipociti maturi isolati FIG 2.

Valutazione dell'attivazione dei recettori purinergici in colture primarie di adipociti

La stimolazione dei recettori P2 purinergici in colture primarie di preadipociti umani differenziati in senso adipocitario induce un aumento del Ca²⁺_i, caratterizzato dalla manifestazione di un ampio picco iniziale seguito da una fase di decremento che termina in una fase di plateau relativo ad un livello di calcio intracellulare maggiore di quello basale (FIG 3A). Il picco iniziale è imputabile ad un rilascio di Ca²⁺ dai depositi intracellulari, mentre la seconda fase è relativa all'ingresso dello ione dall'ambiente extracellulare, attraverso la membrana plasmatica. Questo dato sembra essere sostenuto dal fatto che l'aggiunta nel medium di EGTA, un chelante del Ca²⁺, abolisce la fase di plateau (FIG 3 A). L'incubazione delle cellule in un tampone di coltura privo di Ca²⁺ non influenza l'insorgenza del picco iniziale, mentre determina l'abolizione della fase di plateau (FIG 3 B).

La valutazione della curva dose-risposta per monitorare le variazioni delle concentrazioni di Ca²⁺_i, è stata eseguita in presenza di Ca²⁺_e, e ha mostrato che la concentrazione EC₅₀ per ATP è di circa 5 μ M.

L'utilizzo di un altro nucleotide, UTP, ha evidenziato come colture primarie di adipociti umani sono sensibili alla sua stimolazione e la curva dose-risposta mostra, in questo caso, una EC₅₀ di 1 μ M e dose massima efficace di 100 μ M.

Per dimostrare che l'aumento dello ione calcio da parte dei nucleotidi è provocato dall'apertura dei depositi intracellulari, abbiamo pre-stimolato le cellule con tapsigargina (100nM), un inibitore delle pompe per il Ca²⁺ del reticolo

endoplasmatico (RE) che normalmente svuota i depositi intracellulari di Ca^{2+} , l'esperimento, che è stato condotto in un medium privo di calcio, ha mostrato la formazione di un picco di fluorescenza, riassorbito rapidamente, cosa che dimostra il ripristino dei livelli iniziali della concentrazione di Ca^{2+}_i . (FIG 4). L'aggiunta successiva di ATP e UTP negli stessi campioni non ha prodotto alcuna elevazione della $[\text{Ca}^{2+}_i]$, confermando che il picco normalmente indotto da ATP e UTP è dovuto all'apertura di depositi localizzati all'interno delle cellule (FIG 4).

Valutazione della secrezione di IL6 in colture primarie di adipociti umani

Abbiamo valutato se e come lo stimolo dei recettori purinergici esercitato da ATP potesse influenzare le capacità endocrine di colture primarie di adipociti differenziati *in vitro*, al 14° giorno dopo lo stimolo induttivo. Queste cellule sono state quindi saggiate per la capacità di rilasciare IL6 nel terreno in seguito alla somministrazione di dosi crescenti di ATP. Lo stimolo è stato applicato per tre ore, dopodichè il mezzo è stato raccolto e analizzato mediante test immunoenzimatico.

Come mostrato in FIG 5, adipociti ottenuti *in vitro* dopo 14 giorni di coltura in terreno adipogenico hanno un rilascio basale di IL6 pari a 20 nmoli/ml. Tale rilascio aumenta dopo stimolazione con ATP in maniera dose dipendente, raggiungendo concentrazioni pari a 40nmoli/ml alla dose di agonista massima utilizzata.

Valutazione della secrezione di ATP in colture primarie di adipociti umani

Per valutare se le cellule del tessuto adiposo fossero in grado di rilasciare ATP nel mezzo extracellulare abbiamo utilizzato un saggio di luminescenza. In particolare abbiamo valutato la presenza di ATP nel mezzo di coltura di preadipociti differenziati *in vitro* a diversi tempi dall'induzione del differenziamento (precisamente dopo 0, 7 e 14 giorni dall'aggiunta del terreno differenziativo) per valutare se la secrezione del nucleotide fosse modulata durante l'acquisizione del fenotipo maturo. Abbiamo osservato che sia preadipociti che adipociti in coltura sono in grado di secernere il nucleotide in concentrazioni nano molari.

Quello che viene evidenziato è che il rilascio rimane pressoché costante durante il differenziamento; infatti la secrezione da parte dei preadipociti è molto simile a quella rilevata a circa metà del processo differenziativo (7 giorni). Si riscontra invece un aumento della concentrazione di ATP nel mezzo verso la fine del differenziamento (14 giorni), FIG 6.

DISCUSSIONE (I)

E' ormai ampiamente accettato che il tessuto adiposo rappresenta a tutti gli effetti un organo endocrino e ormai molti studi sono finalizzati a caratterizzare i complessi sistemi che ne regolano l'attività.

Durante la mia ricerca ho analizzato un sistema di segnalazione noto a partire dagli anni '70, che si sta dimostrando essere diffuso in quasi tutti i tessuti e coinvolto in numerosi meccanismi cellulari (). Tuttavia, pochi sono i lavori che caratterizzano questo sistema a livello del tessuto adiposo bianco, e , spesso, riportano dati contrastanti.

Per prima cosa quindi abbiamo valutato l'espressione del complesso sistema dei recettori purinergici del tipo P2 a livello del tessuto adiposo umano, analizzando in particolare diversi depositi adiposi poichè è ben noto che le caratteristiche endocrino-metaboliche sono spesso molto diverse (ref).

Abbiamo studiato inoltre le principali componenti del tessuto adiposo, separando preadipociti da adipociti maturi per valutare se potesse esistere una regolazione del sistema P2 durante il differenziamento adipogenico.

Il sistema purinergico P2 è espresso a livello del tessuto adiposo bianco

Abbiamo così dimostrato che il tessuto adiposo esprime il sistema purinergico in maniera complessivamente analoga nei depositi sottocutaneo e viscerale.

Il trascritto per il gene P2X3 risulta assente in tutti i campioni analizzati mentre i trascritti per tutti gli altri recettori sono stati individuati.

Per alcuni sottotipi è stata identificata la formazione, durante la reazione di PCR, di ulteriori amplificati rispetto a quelli attesi in base alle sequenze note per lo specifico recettore. Tali amplificati aggiuntivi sono stati sequenziati e l'analisi delle sequenze ha messo in evidenza la mancanza di porzioni di alcuni esoni, rispetto alla sequenza genica depositata, suggerendo che si tratti di varianti di splicing.

Una osservazione molto interessante è emersa dallo studio dei recettori P2Y6 e P2Y12: essi infatti si sono rivelati differenzialmente espressi durante il differenziamento adipogenico. In particolare il primo mostra un'elevata espressione nel preadipocita, che decrementa subito dopo l'induzione del differenziamento; al contrario il recettore P2Y12, risulta essere molto poco espresso nelle cellule fino al quarto giorno di coltura, dopo il quale il suo livello di espressione aumenta in modo significativo, seguendo l'andamento di espressione di un gene tessuto adiposo-specifico tardivo.

Tali risultati ottenuti nelle cellule differenziate *in vitro* vengono confermati anche isolando le due popolazioni, preadipociti e adipociti maturi, direttamente dal tessuto adiposo. Tutto ciò fa supporre un ruolo regolatorio del sistema recettoriale P2 nel processo adipogenetico, da una parte inibendo il differenziamento e dall'altra contribuendo a formare e a mantenere il fenotipo cellula adiposa matura.

L'attivazione del sistema purinergico P2 in colture primarie di adipociti mobilizza lo ione calcio

L'attivazione del sistema purinergico può portare all'apertura di canali ionici rappresentati dagli stessi recettori P2X o all'attivazione di una cascata di segnale (attraverso i recettori P2Y) che porta ad un aumento del livello di calcio intracellulare. Lo ione calcio rappresenta un secondo messaggero molto utilizzato per la realizzazione di numerose e svariate funzioni all'interno della cellula, per cui i suoi livelli vengono sempre finemente regolati (ref). La variazione della sua concentrazione all'interno della cellula segue un andamento preciso, che è monitorabile utilizzando sonde fluorescenti sensibili alle concentrazioni di ione calcio libero. A seconda che l'aumento del calcio sia dovuto all'influsso dallo spazio extracellulare o al rilascio da depositi intracellulari, è possibile osservare un diverso profilo di accumulo e metabolismo all'interno della cellula.

In particolare misurando nel tempo la concentrazione del calcio all'interno della cellula, nel primo caso si osserva il rapido raggiungimento di un livello costante di entrata (ossia la formazione di un plateau), nel secondo invece si registra un aumento repentino della concentrazione (ampio picco), dovuto alla veloce apertura dei depositi intracellulari e una repentino ripristino della concentrazione iniziale dello ione. Dopo la somministrazione dei ligandi naturali dei recettori purinergici P2, è stato possibile osservare l'insorgenza di una risposta intracellulare mediata da calcio, il cui profilo ha suggerito la presenza e l'attività funzionale di recettori ionotropi e metabotropici. L'uso di sonde fluorescenti ha prodotto un grafico rappresentante un picco iniziale dovuto all'apertura degli *stores* intracellulari, che dopo un rapido riassorbimento viene invece sostituito dall'insorgenza di una fase di plateau. L'utilizzo di inibitori dell'apertura dei depositi intracellulari ha evidenziato, nonostante l'applicazione dello stimolo, la depressione del picco normalmente generato, mentre la captazione del calcio extracellulare (mediante chelanti presenti nel tampone extracellulare) ha determinato la completa abolizione dell'insorgenza della fase di plateau.

E' pertanto possibile affermare che in colture primarie di adipociti coesistono diverse tipologie di recettori purinergici P2, in quanto sono osservabili sia meccanismi di risposta indotti da P2X che da P2Y.

Possono i recettori purinergici mediare alcune funzioni endocrine dell'adiposità?

Esistono numerosi dati che legano i recettori purinergici presenti su cellule del sistema immunitario allo sviluppo e al mantenimento di una reazione infiammatoria. Sono anche presenti numerose evidenze che dimostrano come questa classe di recettori sia responsabile del rilascio di citochine pro-infiammatorie.

Nell'Introduzione a questa tesi si è accennato all'ipotesi che lega un' alterazione del tessuto adiposo all'aumento di uno stato infiammatorio locale, che si riflette successivamente e in modo più ampio a livello sistemico. A tal proposito abbiamo analizzato la capacità, svolta da parte di ATP extracellulare, di determinare il

rilascio di IL6, una delle citochine il cui livello plasmatico è aumentato in soggetti obesi. Abbiamo potuto quindi osservare che adipociti maturi, differenziati *in vitro*, sono in grado di liberare questa citochina dopo lo stimolo del sistema recettoriale purinergico e riescono a farlo seguendo un andamento dose dipendente.

Abbiamo anche osservato che le cellule sono in grado di rilasciare IL6 anche in assenza di uno stimolo specifico, suggerendo che il livello di ATP che abbiamo osservato come tonicamente liberato dall'adipocita stesso nel mezzo, possa essere responsabile della secrezione basale della citochina.

Può ATP costituire una molecola segnale nel tessuto adiposo?

L'ATP rappresenta il ligando a cui quasi tutti questi recettori P2 sono in grado di rispondere, normalmente le sue concentrazioni extracellulari non sono elevate, in quanto rappresenta un segnale in grado di innescare meccanismi di danno e morte cellulare. Normalmente quindi il sistema è controllato da enzimi detti ecto-ATPasi presenti sulla membrana cellulare che degradano il nucleotide trifosfato, riducendone di molto la concentrazione extracellulare.

Sotto condizioni di stress, in numerosi tipi cellulari, è stato dimostrato però che il nucleotide può essere rilasciato principalmente mediante due meccanismi, uno che prevede la lisi della cellula e l'altro che sfrutta invece sistemi di tipo secretorio che mantiene l'integrità della membrana cellulare.

Non essendo presente alcun dato in letteratura sulle capacità di rilascio di ATP da parte di cellule del tessuto adiposo, abbiamo verificato se colture primarie di adipociti potessero essere in grado di rilasciare il nucleotide nel mezzo extracellulare.

Abbiamo perciò questo quantificato le concentrazioni di ATP presenti nel terreno di coltura durante un differenziamento adipogenico *in vitro*, rilevando che sia i preadipociti che gli adipociti maturi sono in grado di rilasciare il nucleotide e che il suo livello risulta essere aumentato a fine differenziamento.

E' possibile che si verifichi un processo di stiramento della membrana dovuto al forte aumento delle dimensioni cellulari, come agisca da stimolo per la liberazione dell'ATP. Peraltro non si può escludere che alla fine del differenziamento vi sia un incremento della morte cellulare che condurrebbe invece ad un liberazione di ATP in seguito a lisi. Inoltre deve essere considerato anche che il numero di cellule aumenta durante il differenziamento, dal momento che la conversione preadipocita-adipocita è preceduta da almeno due divisioni mitotiche (REF). Sarà pertanto necessario definire quale sia il meccanismo attraverso il quale questo fenomeno si attua.

Le concentrazioni da noi rilevate nel mezzo di coltura degli adipociti non risultano essere particolarmente elevate, ma bisogna tenere in considerazione che l'ATP, una volta liberato, raggiunge il massimo dell'accumulo nell'intorno della membrana cellulare, riducendosi rapidamente in seguito all'azione delle apirasi.

Come già detto, molteplici sono i dati emersi negli ultimi anni che legano i recettori purinergici e soprattutto l'ATP ad un ruolo infiammatorio e numerose sono anche le vie attraverso le quali il nucleotide svolge la sua azione.

La maggior parte degli studi è stata realizzata in cellule del sistema immunitario (neutrofili, cellule dendritiche) nelle quali è stato dimostrato il ruolo di ATP nella chemiotassi.

E' stato anche provato che l'ATP è in grado di generare in macrofagi radicali liberi dell'ossigeno (ROS), come il perossido di idrogeno (H_2O_2), , che possono mediare una cascata di segnale che porta alla sintesi e alla liberazione di citochine pro-infiammatorie.

E' possibile inoltre che questo tipo di segnalazione via-ATP funzioni anche in modo autocrino sulle cellule del tessuto adiposo, contribuendo ad instaurare un meccanismo di stress ossidativo all'interno dell'adipocita coinvolgendo nell'attivazione fattori importanti come IKK e NF-kB e JNK.

Tali fattori sono stati associati all'azione insulinica sulla cellula adiposa: è stato infatti osservato che l'attivazione di JNK porta ad una massiccia fosforilazione di IRS, determinando così la riduzione del signaling insulinico e una conseguente insulino-resistenza, sia nell'adipocita che nell'epatocita .

Lo studio presentato in questa tesi dimostra che il sistema dei recettori P2 è presente a livello del tessuto adiposo e che risulta essere funzionale. Possiamo inoltre ragionevolmente supporre che le cellule adipose, come accade per altri tipi cellulari, siano in grado di rilasciare ATP, che a sua volta, come abbiamo illustrato, stimola l'adipocita a secernere la citochina pro infiammatoria IL6.

Tutti questi risultati insieme potrebbero fornire una spiegazione del meccanismo con cui insorge e viene mantenuto lo stato infiammatorio di basso grado che si osserva a livello del tessuto adiposo in corso di obesità.

Sarà pertanto interessante indagare a quale livello venga effettuata la maggiore azione dell'ATP; ovvero se il nucleotide promuova principalmente la diapedesi di monociti dal sangue circolante o se stimoli i macrofagi residenti nel tessuto adiposo a secernere citochine o ancora se agisca sugli adipociti stessi innescando il rilascio di adipocitochine.

Inoltre sarebbe utile approfondire il meccanismo preciso con cui le cellule adipose liberano ATP , quantificando se questa quota "rilasciata" possa essere sufficiente all'attivazione dei recettori, oppure se siano le cellule che vanno incontro a necrosi e a lisi cellulare a fungere da principale stimolo infiammatorio.

Essendo i differenti recettori purinergici sensibili a diverse concentrazioni di nucleotide si potrebbe comunque ipotizzare la coesistenza di diversi meccanismi, aumentando così la complessità del sistema di regolazione che coinvolge il tessuto adiposo nell'omeostasi dell'intero organismo.

La chiarificazione di questi punti ancora oscuri potrebbe aumentare l'importanza di questo sistema recettoriale nel tessuto adiposo, tanto da pensare di utilizzare antagonisti di questi recettori per ridurre lo stato infiammatorio che potrebbe costituire il primo evento nella genesi dell'obesità.

INTRODUZIONE (II)

LA SINDROME DI ALSTRÖM: CLINICA

La sindrome di Alström (ALMS) (OMIM 203800) è una patologia estremamente rara a trasmissione autosomica recessiva. I pazienti affetti da tale sindrome presentano un'ampia variabilità fenotipica che si osserva già a partire dalla prima infanzia. Essi mostrano un disordine oculare caratterizzato da una progressiva distrofia retinica (Alström et al., 1959; Millay et al., 1986; Russell-Eggitt et al., 1998; Tremblay et al., 1993) e si può osservare anche la perdita uditiva neurosensoriale bilaterale che solitamente peggiora progressivamente (Marshall et al., 1997). Altre caratteristiche ad insorgenza precoce includono manifestazioni metaboliche come obesità, iperinsulinemia, diabete mellito di tipo 2 e iperlipidemia, costituendo a questo livello un buon modello per lo studio della sindrome metabolica. Cuore, reni e fegato possono essere interessati dalla manifestazione della patologia, influenzando severamente la prognosi e la sopravvivenza dei pazienti. Meno frequentemente è stato osservato un interessamento polmonare, osseo, neuromuscolare e dei sistemi emopoietico ed endocrino. Nella maggior parte dei pazienti il quoziente intellettivo è nella norma, sebbene sia stato riportato qualche caso di ritardo mentale. La valutazione di alcuni reperti autoptici ha messo in luce la presenza di una forte fibrosi interstiziale diffusa in diverse tipologie di tessuti.

La sindrome è pertanto può essere definita come multiorgano, l'ampia variabilità fenotipica fa pensare inoltre all'esistenza di un meccanismo genetico che funziona da 'modificatore', in grado di modulare quindi l'effetto della mutazione di un singolo gene.

Non sono state riportate differenze etniche né razziali: la sindrome è stata riscontrata in diverse etnie ed aree geografiche che includono Europa, Asia, Africa e America settentrionale.

Il numero totale di casi di ALMS finora conosciuti è approssimativamente 350 (database disponibile presso il The Jackson Laboratory, USA).

LA SINDROME DI ALSTRÖM: GENETICA

Il gene *ALMS1* è stato localizzato quasi contemporaneamente da due diversi gruppi sul cromosoma 2p13 (Collin et al., 2002) (Hearn et al., 2002).

Esso è costituito da 23 esoni che si estendono in una regione genomica di circa 230 kB, viene espresso a bassi livelli in tutti i tessuti e non mostra omologia di sequenza significativa, con altri geni riportati finora (Collin et al., 2002). Inoltre sono state identificate diverse varianti di splicing in differenti tessuti, sia nell'uomo che nel topo.

Il trascritto completo di *ALMS1* codifica per una proteina, predetta, di 461.2 kDa costituita di 4169 amminoacidi, che contiene un ampio dominio di tandem-repeats (Hearn et al., 2002). L'esone 1 è costituito da un tratto di poligluttammato (aa 13-29) che consiste in una ripetizione di (GAG)_NGAA(GAG)₃, seguita da una sequenza di 7 residui di alanina.

L'esone 8, che è lungo 6 Kb, è costituito quasi interamente dal dominio di tandem-repeats, codificante per 34 ripetizioni imperfette di 45-50 amminoacidi. L'analisi *in silico* della sequenza proteica di *ALMS1* predice un pattern leucine-zipper (aa 2480-2501) e numerosi siti per glicosilazioni, N-miristilazioni e fosforilazione (Prosite). *ALMS1* non mostra omologia significativa con nessuna proteina umana nota, però sono stati identificati geni ortologhi in *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta* e *Gallus gallus* (NCBI: National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

L'analisi proteomica basata sulla spettrometria di massa condotta da Mann *et al.* (Andersen et al., 2003) in centrosomi umani isolati durante l'interfase cellulare; ha consentito di rilevarne la presenza a livello centrosomico, confermata da successivi studi. L'uso di metodiche di immunofluorescenza ha determinato la co-localizzazione di *ALMS1* γ -tubulina a livello centrosomico (Hearn et al., 2005), in fibroblasti di controlli sani e pazienti *ALMS*. Lo studio è stato rafforzato dall'analisi di diverse linee cellulari (linee di epatociti-Hep62, linee linfoblastoidi, linee di retinoblastoma-WERI e fibroblasti fetali del derma) in quanto ha riconfermato i dati di localizzazione ottenuti.

Nelle cellule i centrosomi sono gli organizzatori dei microtubuli e rivestono un'importante funzione a livello di citoscheletro, mitosi, meiosi, traffico vescicolare, ciglia e flagelli.

Le caratteristiche fenotipiche mostrate dai pazienti *ALMS* sono molto simili a quelle di manifestate in un'altra malattia genetica: la sindrome di Bardet-Biedl (BBS). Sono stati identificati 11 loci per la BBS e parecchie proteine BBS sono state collegate alla funzione dei corpi basali e al trasporto in cellule ciliate. Per questa ragione la sindrome di *ALMS* e quella di BBS sono state classificate come "ciliopatie", una classe emergente di malattie genetiche umane che presentano difetti nella struttura o nella funzione ciliare (Badano et al., 2006).

La variabilità fenotipica in pazienti con sindrome di Alström, risulta essere molto elevata ma non sono ancora stati chiariti i meccanismi che starebbero alla base di questa. Possibili ipotesi riguardano l'interazione di elementi genetici (geni modificatori) ed ambientali con il locus *ALMS1*. La maggior parte delle mutazioni identificate sono non-senso o con slittamento del modulo di lettura (frameshift) e permettono di predire la formazione di una proteina tronca. Tali mutazioni sono state localizzate principalmente a livello degli esoni 8, 10, 16 e potrebbero concorrere in maniera diversa alla differente progressione della malattia; sono in corso studi per verificare una possibile correlazione genotipo-fenotipo, per valutare il peso della localizzazione delle mutazioni identificate.

Modelli murini per la sindrome di Alström

Come è facilmente rintracciabile in letteratura, la sindrome di Alström presenta una notevole variabilità fenotipica, la cui causa non è chiaramente identificata

anche se si suppone che almeno in parte sia dovuta alla differente posizione delle mutazioni lungo la sequenza del gene *ALMS1*, identificato come gene-malattia.

Sono a tutt'oggi disponibili diversi modelli animali che riassumono parzialmente le caratteristiche fenotipiche della patologia, ma non ci sono ancora state chiarificazioni sulla reale funzione del gene. Nonostante sia possibile

In particolare è stato realizzato un modello murino mediante *gene-trap*, *Alms1*^{GT(pGT1Lxf)/Pjn} (*alms1*^{-/-}), (Collin et al., 2005) che mostra caratteristiche simili a quelle individuate nei pazienti, in particolare per quanto riguarda obesità, iperinsulinemia, steatosi epatica, disfunzioni retiniche, ipogonadismo e infertilità e perdita di udito. L'insulino-resistenza e l'aumento di peso corporeo cominciano ad essere evidenti tra le 8 e 12 settimane di età, con iperglicemia che compare dalla 16 settimana di età, con differenze legate al sesso (glucosio plasmatico ≥ 250 mg/dl).

Un secondo modello è rappresentato dal topo *Fat aussie* (*alms1 foz/foz*), descritto da un gruppo australiano (Arsov et al., 2006); in questo topo si è verificata la mutazione spontanea del gene (delezione di 11 bp nell'esone 8 ai nucleotidi 3918-3928) di una colonia NOD. Fenotipicamente i topi *Fat aussie* cominciano a mostrare obesità e iperinsulinemia a partire dalla 17 settimana di età. Il diabete, che si sviluppa successivamente, è accompagnato da iperplasia delle insule pancreatiche. I maschi risultano essere sterili a causa di una alterata spermatogenesi.

Il terzo modello della sindrome è indicato come *Alms1*^{L2131X/L2131X}, è stato generato per mutagenesi con nitrosuree, presenta una mutazione nell'esone 10, ed è caratterizzato da obesità, steatosi epatica, normali livelli di glucosio ma iperinsulinemia, elevata leptina, trigliceridemia e un aumento di HDL/colesterolo). Inoltre presenta inefficace formazione degli spermatozoi e un alterato trasporto della rodopsina all'interno della retina. Gli stessi Autori riportano che il silenziamento del gene *Alms1* ha determinato la formazione di ciglia tronche e con ridotta attività in cellule epiteliali renali *in vitro* (mIMCD3). La transfezione della porzione N-terminale (corrispondente agli esoni 1-8) della proteina *Alms* nelle cellule silenziate è sufficiente a ripristinare la funzionalità delle cilia.

RISULTATI (II)

Analisi di espressione genica mediante DNA microarray

Per la realizzazione di un esperimento di microarray abbiamo utilizzato come campionicolture primarie di fibroblasti, ottenute come descritto nella sezione Materiali e Metodi. L'obiettivo dell'esperimento è stato differente confrontare il profilo di espressione genica di fibroblasti cutanei ottenuti da pazienti affetti dalla sindrome di Alström con quelli di soggetti sani. Sono stati analizzati campioni di 4 soggetti ALMS con mutazioni diagnosticate a livello del gene *ALMS1*, in particolare due soggetti erano fratelli e quindi portatori della medesima mutazione, e di 3 soggetti di controllo non-ALMS e privi di patologie inerenti al sistema endocrino e metabolico al momento della biopsia cutanea. Le principali caratteristiche dei soggetti insieme alla descrizione delle mutazioni sono riportate in tabella XX.

Abbiamo deciso di riunire il cRNA derivante dai campioni di controllo per cercare di ridurre l'influenza dovuta alla variabilità interindividuale. Pertanto ogni paziente singolarmente è stato confrontato contro il pool di controlli mediante co-ibridazione su un vetrino con depositati oligonucleotidi sintetici (array). Ogni esperimento è stato condotto in duplicato, effettuando l'inversione dei fluorofori (Cy3 e Cy5) con i quali è stato marcato il cRNA, in modo da ridurre l'errore determinato da una incorporazione differenziale dei marcatori fluorescenti.

Abbiamo ottenuto quindi dei dati di fluorescenza grezzi, che sono stati normalizzati secondo il sistema LOWESS (Locally WEighted Scatterplot Smoothing), cioè utilizzando un sistema di normalizzazione locale.

Per l'analisi successiva sono stati presi in considerazione solo geni che mostrassero lo stesso andamento di espressione in almeno il 70% dei dati ottenuti. L'analisi statistica condotta, basata su SAM (Significance Analysis of Microarray), ha assegnato un livello di significatività ai geni la cui espressione fosse dipendente dalla presenza della mutazione FIG 7. Per evitare la presenza di un forte numero di falsi positivi o negativi abbiamo preso in considerazione solo geni con un valore statistico di q (che rappresenta il tasso di FDR, False Discovery Rate, nella lista dei geni significativi) pari a zero, cercando così di aumentare la stringenza dell'analisi.

Quindi, su circa 21500 oligonucleotidi depositati (corrispondenti ciascuno ad una sequenza genica unica), un totale di 560 geni sono risultati essere differenzialmente espressi, FIG 8. Di questi, 188 geni sono risultati essere up-regolati nei pazienti ALMS, mentre 372 risultano essere i geni down-regolati, FIG 8. All'interno di queste due categorie, solo 95 geni per ciascuna, mostrano un \log_2 rispettivamente superiore a 0.7 e inferiore a -0.7 (quindi, rispettivamente, una up o down-regolazione di 1.5 volte dell'espressione del gene nei pazienti ALMS versus il pool dei controlli) TAB 4.

La lista dei geni differenzialmente espressi così ottenuta è stata usata per evidenziare il significato biologico dei dati ottenuti, questo mediante due database

disponibili online: GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome, <http://www.genome.jp/kegg/>).

Geni differenzialmente espressi

Per poter avere una visione d'insieme riguardo ai geni identificati come differenzialmente espressi, abbiamo utilizzato il database di Gene Ontology, che rappresenta attualmente lo standard internazionale per l'annotazione genica. In questo modo è possibile collocare le numerose informazioni ottenute da questi tipi di esperimenti, all'interno di strutture classificate di geni (che rappresentano i termini di Gene Ontology), consentendo l'identificazione di alcuni processi biologici modulati in un ampio set di dati. A ciascun termine evidenziato è associato un valore statistico *p-value*, che fornisce una stima della rilevanza dei geni in analisi nelle liste di classificazione fornite dalla Gene Ontology. Tanto più basso è questo valore tanto le informazioni ottenute risultano essere più specifiche.

I geni raggruppati nella Gene Ontology vengono divisi in 3 categorie principali: *biological process*, *cell component* e *molecular function*, in base alle informazioni che si conoscono di ciascun gene e che permettono di inserirli in qualche specifico processo biologico, nella generazione di qualche struttura cellulare o in base alla loro funzione. (I termini principali della Gene Ontology sono rappresentati da *biological process*, *cell component* e *molecular function*.)

La nostra analisi ha portato ad identificare, all'interno della categoria *biological process* la modulazione di numerosi messaggeri che svolgono funzioni a livello di: proliferazione e regolazione del ciclo cellulare, metabolismo cellulare, in particolare quello di purine e pirimidine e organizzazione del citoscheletro.

Nella categoria relativa alle componenti cellulari risultano essere modulati messaggeri relativi a: collagene e matrice extracellulare, strutture relative alla replicazione cellulare, microtubuli e filamenti intermedi. In particolare i geni relativi alla matrice extracellulare e al collagene risultano essere up-regolati, mentre geni connessi con l'organizzazione del citoscheletro risultano avere una ridotta espressione nei pazienti.

Per ottenere ulteriori informazioni volte a identificare le vie di segnalazione coinvolte nel confronto tra pazienti e controlli, ci siamo serviti di un altro database : il KEGG. In questo database i geni vengono ordinati in mappe che rappresentano numerose vie di segnale note presenti e funzionanti nella maggior parte delle cellule. Il risultato dell'analisi è mostrato nella TAB 5.

Utilizzando questi diagrammi è visivamente possibile rappresentare in modo immediato come (aumento o diminuzione dell'espressione genica) e a che livello (posizione all'interno di una via complessa) i geni differenzialmente espressi nei pazienti ALMS rispetto al pool di controlli sani.

In particolare geni up-regolati sono rappresentati in rosso e arancio, e i geni down regolati sono rappresentati in blu e celeste. In rosso e in blu sono colorati i geni che hanno passato l'analisi statistica di SAM e mostrano un \log_2 rispettivamente maggiore di 0.7 e minore di -0.7. Invece i geni rappresentati in arancio o verde

sono geni che hanno superato l'analisi statistica con SAM ma il cui \log_2 è compreso rispettivamente tra 0.7 e 0.5 e nell'intervallo tra -0.5 e -0.7, ossia i geni la cui espressione risulta rispettivamente aumentata o diminuita ma in maniera più modesta rispetto ai precedenti. L'utilizzo di questi diagrammi permette di valutare con un unico colpo d'occhio diversi geni che appartengono ad un particolare pathway e di poter valutare in modo globale le variazioni di tutti questi geni insieme e l'impatto globale che tali variazioni hanno sul pathway stesso. Va da sé che se molti geni che risultano differenzialmente espressi nei pazienti rispetto ai controlli possono essere clusterizzati in uno o più vie di segnale tali vie diventano molto importanti e assumono un significato del tutto particolare nella patologia in esame, nel nostro caso la ALMS. L'attenzione sarà inferiore invece per quelle vie di segnale in cui solo un gene di quelli differenzialmente espressi risulta coinvolto..

Utilizzando questo sistema di analisi abbiamo osservato che numerosi geni modulati appartengono ai seguenti *pathways*: *cell cycle*, *MAPK signaling*, *p53 signaling*, *cell communication*, *ECM receptor interaction*. Abbiamo potuto rilevare anche un effetto su *Insulin signaling pathway*. I diagrammi di tali vie sono riportati in appendice 2.

Per quanto riguarda la via che racchiude meccanismi coinvolti nel ciclo cellulare, identifichiamo che il principale andamento osservato è quello di una down-regolazione; osserviamo infatti il decremento dell'espressione di 12 geni, tra cui numerose cicline dipendenti o meno da chinasi (CycA, B ed E e CDK1). Risulta inoltre ridotta l'espressione anche di numerosi geni appartenenti al *Mini Chromosome Maintenance Complex* (Mcm2, 3, 4, 6).

La regolazione di *MAPK signaling pathway* mostra la sovraespressione di FGF13, FGFR2, GADD45, MEF2C e c-fos, mentre evidenzia la riduzione dell'espressione di MKP, STMN1 e Cdc25b.

All'interno di *p53 signaling* abbiamo identificato come up regolati il trascritto per IGF-BP3 e ritroviamo quello di GADD45. Mostrano invece livelli di espressione più bassi i trascritti per le cicline B ed E, per p53R2, e per PERP.

Come si osserva in appendice 2, anche le vie che sono coinvolte nella comunicazione cellulare sono modulate: è possibile osservare una forte aumento di espressione relativamente a componenti della matrice extracellulare (tra cui si osservano numerosi trascritti codificanti per collageni come COL1A1, COL3A1, COL4A1, COL5A1, COL5A2, COL8A1, COL11A1, COL12A1, COL15A1) e alcuni geni codificanti per cheratine (KRT7, KRT18, KRT18, KRTHA4).

All'interno del *pathway* insulinico risultano essere down-regolati i geni per IRS1, PRKAR2B (PKA) e SOCS2, mentre l'espressione del gene PPP1R3C (PPI) aumenta.

Validazione dei dati ottenuti attraverso i DNA microarray: real time PCR

Per confermare i risultati ottenuti con il sistema precedentemente descritto, abbiamo utilizzato il sistema della qPCR, considerata gold standard per l'analisi quantitativa di espressione genica.

Sono stati selezionati alcuni geni coinvolti nelle vie di segnalazione sopradescritte. In particolare abbiamo verificato l'aumento di espressione osservato per alcuni collagene : COL1A1, COL3A1, COL4A1, COL5A1, COL5A2, COL8A1, COL11A1, COL12A1, COL15A1. Abbiamo inoltre quantificato il messaggero per il fattore di crescita dei fibroblasti 13 (FGF13) e per il recettore di tipo 2 del il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR2).

I campioni di cDNA utilizzati per la verifica derivano dallo stesso RNA utilizzato per effettuare l'esperimento mediante microarray e da un campione indipendente, relativo ad un passaggio cellulare successivo.

I dati ottenuti con questa tecnica confermano che l'espressione dei geni considerati è effettivamente aumentata cellulari nei fibroblasti derivanti dai pazienti ALMS, rispetto a quelle ottenute nei soggetti di controllo. FIG 9 A E B.

Realizzazione e caratterizzazione di un nuovo modello murino per la sindrome di Alström

La sindrome di Alström presenta una notevole variabilità fenotipica, dovuta in parte alla differente localizzazione delle mutazioni all'interno del gene ALMS1, identificato come gene-malattia. Sono tutt'oggi disponibili diversi modelli animali che riassumono parzialmente le caratteristiche fenotipiche della patologia, ma non ci sono ancora state chiarificazioni sulla reale funzione del gene. Per avere maggiori informazioni a tal proposito è stato realizzato un nuovo modello gene trap, dove la mutazione è stata introdotta a livello dell'introne 7 del gene *Alms1*. Non è riportato alcun caso clinico in cui siano presenti mutazioni più precoci all'interno del gene (in posizione più proximale rispetto al 5' del gene).

Le cellule staminali embrionali A028F08 sono state generate usando un approccio di gene trap su larga scala per studi di funzione genica nel topo (ref 21,22). Esse contengono una cassetta PT1betageo inserita a livello dell'introne 7 del gene *Alms1*. Il gene murino *Alms1* è localizzato nel cromosoma 6 il suo trascritto (mRNA) è composto di 23 esoniper un totale di 10005 nucleotidi (NM_145223) e codifica per una proteina di 3251 amminoacidi.

L'evento di gene trap è stato identificato nelle cellule ES attraverso una 5'RACE-PCR che è in grado di identificare il trascritto di fusione che si crea a livello dell'N-terminale del gene *Alms1* e la beta-galattosidasi/neo.

Le cellule ES sono state poi microiniettate in una blastocisti wild type per ottenere così un topo chimera, che è utilizzato per generare una linea murina portante la mutazione.

Genotipizzazione della progenie N1F2

Dall'incrocio delle chimere con un C57BL/6J è stata selezionata solo la progenie agouti, quella cioè portante la mutazione in eterozigosi, questa costituisce la generazione N1F1. Abbiamo quindi incrociato (intercross) gli individui della generazione F1, e caratterizzato a livello genomico la presenza della mutazione nella progenie F2.

Significativamente, dall'analisi genotipica di 205 topi, sono stati identificati 67 animali con un genotipo wild type e 138 mostranti un genotipo eterozigote, ma nessun individuo è risultato essere omozigote per la mutazione.

Fenotipizzazione della progenie N1F2

Circa 80 animali della generazione F2 sono stati valutati per le caratteristiche fenotipiche di peso corporeo, livelli plasmatici di glucosio ed insulina. L'analisi è stata effettuata fino alle 20 settimane di età. E' stata anche valutata la composizione corporea mediante DEXA. I topi sono stati mantenuti in una dieta con il 4% di contenuto lipidico, in un ambiente a temperatura ed umidità controllate e con un ciclo di 12 ore luce/buio.

Ciascuna misura è stata effettuata con cadenza mensile a partire dalla quarta settimana di età FIG 11.

Peso corporeo

Come è osservabile in figura XX i dati relativi agli individui eterozigoti della generazione F2 seguono la curva di crescita degli individui wild type, mostrando l'assenza di differenze significative tra i due gruppi. Questo risultato è verificato sia per individui maschi che femmine.

Livelli plasmatici di glucosio ed insulina

Per valutare se parametri metabolici fossero differenti tra individui wild type e eterozigoti abbiamo misurato i livelli plasmatiche di glucosio e insulina degli animali. La figura xx mostra come questi rimangano pressoché stabili, evidenziando l'assenza di differenze tra i due gruppi, sia per gli individui di sesso maschile che per quelli di sesso femminile. Glicemia e insulinemia rimangono, in entrambi i casi, nell'intervallo di normalità.

Valutazione della composizione corporea mediante DEXA

Per accertare l'assenza di differenze nella distribuzione della massa adiposa, indipendentemente dal peso corporeo, abbiamo effettuato una analisi densitometrica. Abbiamo quindi comparato la percentuale di grasso corporeo relativa ai diversi distretti, in 10 animali per ciascun gruppo a 20 settimane. L'analisi realizzata anche in questo caso non ha identificato nessuna differenza tra animali wild type ed eterozigoti, sia di sesso maschile che femminile (dati non mostrati).

Localizzazione dell'attività beta-galattosidasi in un individui eterozigoti adulti

Per valutare la localizzazione del gene abbiamo sfruttato la presenza del gene reporter beta-galattosidasi inserito a livello dell'introne 7 del gene *Alms1*, e abbiamo effettuato una colorazione con x-gal. La presenza dell'enzima beta-galattosidasi permette la conversione del substrato X-gal in un prodotto colorato che consente così di visualizzare la localizzazione della cassetta gene trap FIG 12. La colorazione ha consentito di identificare cervello, testicolo, orecchio e reni come siti di espressione di questo gene nell'individuo adulto, dimostrando analogia con il precedente modello murino per la sindrome di Alström (Collin et al. 2005).

Caratterizzazione genotipica e localizzazione dell'attività beta-galattosidasica in embrioni

Dopo aver messo in luce l'assenza di omozigoti per la mutazione e supposto la letalità embrionale abbiamo caratterizzato il genotipo e la localizzazione di circa 80 embrioni. In particolare ne abbiamo analizzato 34 per 7.5 giorni, 4 per 8.5 giorni, 15 per 9.5 giorni, 13 per 12.5 giorni, 3 per 14.5 giorni e 12 per 15.5 giorni contati a partire dal concepimento.

L'analisi genotipica è stata effettuata estraendo il DNA dal sacco vitellino dove possibile, altrimenti il DNA è stato estratto dall'embrione stesso.

L'amplificazione del DNA con primers specifici ci ha consentito di identificare nuovamente l'assenza di omozigoti per la mutazione.

Per valutare la localizzazione della cassetta di espressione durante l'embriogenesi, abbiamo analizzato l'attività beta-galattosidasica negli embrioni eterozigoti, analogamente a quanto descritto in precedenza per i diversi tessuti dell'animale adulto.

Come è possibile osservare in figura , il gene è ampiamente rappresentato durante le prime fasi dello sviluppo embrionale: è osservabile infatti nella cavità amniotica, a livello dell'endoderma definitivo e dell'ectoderma extraembrionale. Successivamente, quando l'organogenesi è avviata, è possibile identificare la sua espressione prevalentemente a livello del sistema visivo e uditivo, a livello degli arti superiori ed inferiori, in diversi distretti encefalici (mes-, met-, tel-encefalo) e a livello della colonna vertebrale FIG 13 a e b.

L'assenza di embrioni omozigoti recessivi per la mutazione e la bassissima presenza di embrioni riassorbiti, fa ipotizzare che la mutazione possa generare la letalità ad uno stadio ancora più precoce, probabilmente a livello pre-impianto.

DISCUSSIONE (II)

Come già detto in precedenza la sindrome di Alström è una rara patologia a trasmissione autosomica recessiva e poco è attualmente conosciuto a livello della proteina codificata dal gene *ALMS1*. I principali studi di tipo funzionale sulla proteina ALMS1 sono stati condotti *in vitro* utilizzando modelli murini. Studi di immunofluorescenza effettuati in cellule umane hanno permesso di localizzare la proteina ALMS1 a livello dei centrosomi, strutture cellulari altamente specializzate, coinvolte nella divisione cellulare e nell'organizzazione del citoscheletro. La sindrome di Alström condivide alcune caratteristiche fenotipiche con la sindrome di Bardet-Biedl, una malattia genetica che può essere causata da mutazioni presenti in diversi geni (finora sono stati identificati 11 loci coinvolti) che codificano per proteine strutturali che partecipano alla formazione delle ciglia o alla loro regolazione. Queste analogie hanno determinato la recente classificazione di entrambe le patologie come "ciliopatie" di origine genetica (Badano et al 2006). Alcuni studi hanno indicato un possibile coinvolgimento di ALMS1 nel trasporto vescicolare intracellulare, ma in realtà non è stato ancora chiarito quali funzioni la proteina svolga all'interno della cellula.

Analisi di espressione genica su larga scala: DNA microarrays

Il sistema dei microarray ha cominciato a diffondersi a partire degli anni novanta e da allora ha mostrato un enorme sviluppo. Il grosso vantaggio che ha apportato questo metodo è rappresentato dal flusso informativo generato: infatti valutando due o più condizioni simultaneamente vengono generati numerosissimi dati. In particolare l'applicazione più diffusa è stata quella relativa all'analisi di espressione; i DNA microarray infatti hanno permesso di valutare un sistema indagando migliaia di geni nello stesso momento in modo da evidenziare non la modificazione di un singolo gene, ma quella derivante da un'intera via di segnalazione. Questo ha consentito di formulare ipotesi per direzionare nuovi esperimenti, un approccio di estrema utilità nel caso in cui siano disponibili solamente poche informazioni rispetto alla problema in esame.

Purtroppo successivamente sono emerse alcune problematiche relative a questa tipologia di approccio, risolte, almeno in parte, generando sistemi di analisi statistica sempre più complessi. In qualsiasi caso peraltro, questo sistema ha contribuito alla presa di coscienza della forte complessità che sta alla base di qualsiasi sistema biologico.

L'utilizzo dei DNA microarray nell'analisi di espressione genica ha aumentato in maniera vertiginosa il numero delle informazioni ottenibili dall'analisi di un dato sistema, ma non ha modificato la qualità delle informazioni ottenute; pertanto in alcuni casi, la modulazione dei trascritti non corrisponde all'andamento proteico di un sistema.

Rimane perciò necessario validare i dati ottenuti con differenti approcci che consentano di analizzare, a livelli successivi la complessità del sistema in esame per confermare che la modulazione della trascrizione genica osservata si rifletta in

un cambiamento delle caratteristiche funzionali del organismo analizzato. in modo tale da conferire robustezza all'ipotesi generata.

Questo tipo di analisi è risultata particolarmente adatta alle nostre necessità, per indagare le modificazioni presenti a livello dell'espressione genica globale di pazienti affetti dalla sindrome di Alström rispetto a quella mostrata da individui sani. Il nostro obiettivo è stato quello di identificare quali vie di segnale fossero alterate in seguito alla mutazione del gene *ALMS1* ed eventualmente evidenziare profili di espressione differenti in base alla localizzazione delle mutazioni nella sequenza.

Abbiamo utilizzato colture primarie di fibroblasti per la realizzazione dei nostri esperimenti in quanto risultano essere relativamente facili da mantenere in coltura e dal momento che sono stati frequentemente utilizzati per analizzare casi di insulino-resistenza, come il Leprecaunismo (MIM # 246200), la sindrome di Rabson-Medenhall (MIM #262190) e l'insulino resistenza di tipo A (MIM #147670). Fibroblasti sono stati inoltre utilizzati per studi in soggetti obesi e diabetici *in vitro* al fine di valutare l'efficienza del legame dell'insulina al suo recettore nonché l'integrità del signaling insulinico.

L'analisi dei dati effettuata ci ha permesso di evidenziare la modulazione di diverse tipologie di vie di comunicazione cellulare, come già descritto nei risultati. L'uso di banche dati relative alla funzione genica ci ha aiutati nella loro interpretazione, suggerendo possibili bersagli per ulteriori studi volti alla chiarificazione della funzione del gene *ALMS1*.

In fibroblasti derivanti da pazienti Alström geni coinvolti nel ciclo cellulare sono modulati

Abbiamo potuto osservare delle alterazioni riconducibili a geni correlati al ciclo cellulare, che in generale possono essere interpretate come un rallentamento dello stesso. Molte cicline presentano una riduzione dei loro livelli di espressione. Inoltre, geni riuniti nella categoria "*p53 signaling*" presentano un profilo di espressione che concorda con un blocco o un rallentamento del ciclo cellulare. E' riportato infatti come la proteina PERP (*TP53 apoptosis effector*) risulti essere inibita quando il ciclo cellulare è bloccato (ref). PERP è sotto il controllo di p53 e normalmente risulta essere attivata da segnali di stress; è una proteina di membrana e la sua espressione in cellule p53^{-/-} è sufficiente ad indurre un fenomeno di morte cellulare per apoptosi.

Anche il gene p53R2 (*ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)*) è incluso nella stessa via e risulta analogamente represso. p53R2 codifica per una subunità di una ribonucleotide reduttasi, enzimi che provvedono alla riduzione dei quattro ribonucleotidi nei loro corrispondenti deossiribonucleotidi, in modo tale che possano essere utilizzabili dalla DNA polimerasi. In particolare questa subunità sembra essere fondamentale per l'attività enzimatica (ref nel paper), quindi, anche in questo caso, la riduzione di questo trascritto negativo porterebbe ad una inibizione del ciclo cellulare; infatti la deplezione di nucleotidi disponibili porterebbe a una diminuzione della sintesi di DNA. Coerentemente diversi trascritti codificanti per il complesso MCM (Mini-chromosome maintenance), che

prende parte e risulta essere essenziale per la sintesi di DNA durante la fase replicativa, mostrano una riduzione di espressione (Nosedà M, Karsan A 2006).

Numerosi mRNA codificanti per cicline risultano avere un più basso livello di espressione nei fibroblasti derivanti dai pazienti, quelle individuate sono: CycE, CycA, CycB, CDC20 (cell division cycle 20 homolog), CDC25 (cell division cycle 25 homolog) e CDK1.

Le cicline sono proteine che regolano la progressione attraverso il ciclo cellulare, normalmente la loro iper-espressione è stata associata alla progressione tumorale. Di notevole importanza risulta essere la ciclina CDC20, essa è disponibile per molteplici associazioni proteiche durante diverse fasi del ciclo, in special modo risulta essere richiesta per il movimento del nucleo prima dell'anafase e per la separazione cromosomica. È stato dimostrato che un'insufficiente quantità di CDC20 durante il ciclo cellulare porta ad un rallentamento dell'anafase.

La funzione di CDC25 nel ciclo cellulare riguarda la transizione della cellula dalla fase G2 alla fase M, attraverso l'attivazione del complesso ciclina B (che risulta anch'essa down-regolata nei nostri esperimenti) CDC2. In particolare, CDC25B è localizzata a livello centrosomico durante la fase S ed esperimenti che ne forzano l'espressione comportano un'amplificazione del centrosoma e un'incorretto assemblaggio delle strutture microtubulari con un'eccessivo accumulo di tubulina gamma. Al contrario l'inibizione della proteina determina l'inibizione dell'organizzazione dei microtubuli per l'interfase e la localizzazione a livello centrosomico di tubulina gamma. Ne consegue quindi l'evidenza di un ruolo di CDC25 nella regolazione e nell'assemblaggio delle strutture centrosomiche.

Altro gene particolarmente importante nel ciclo cellulare risulta essere CDK1, anch'esso è coinvolto nella progressione tra le fasi G2 e M; numerosi riferimenti associano la sua funzione alla separazione centrosomica. La sua de-regolazione conduce alla mancata separazione dei centrosomi, impedendo la formazione del fuso mitotico.

Abbiamo inoltre identificato un aumento di espressione del gene PP1c (PPP1R3C, *protein phosphatase1, regulatory subunit C*) che; codifica per la subunità catalitica della protein fosfatasi 1; la sua azione è inibitoria ed è coinvolta in numerosi processi cellulari. Sebbene nell'analisi effettuata usando *KEGG pathway* il gene venga incluso nella via di segnalazione insulinica, esso svolge un'azione anche a livello del ciclo cellulare, ed è coinvolto nella regolazione della separazione dei centrosomi, promuovendo in condizioni fisiologiche la rottura del legame esistente tra i centrosomi.

Come è stato già detto in precedenza, la proteina ALMS1 è localizzata a livello centrosomico e la sua alterazione provoca un'assemblaggio non corretto di strutture ciliari e di corpi basali. Strutture analoghe sono coinvolte anche nella regolazione della replicazione cellulare. I dati ottenuti dai nostri esperimenti suggeriscono che il ciclo cellulare dei fibroblasti analizzati potrebbe essere modificato, in particolare emerge la possibilità che strutture interagenti con il centrosoma siano alterate, suggerendo quindi una incorretta formazione delle strutture microtubulari che originano da esso.

Una analisi più approfondita condotta a livello dei singoli geni ha permesso anche di identificare la modulazione negativa dell'espressione di altri geni coinvolti nella interazione centrosoma-microtubuli. Abbiamo osservato infatti la alterazione

dell'espressione dei geni BUB3, STMN1, STK6 e TUBG1 ciascuno dei quali è coinvolto nei processi di nucleazione dei microtubuli dal centrosoma.

Geni codificanti componenti della matrice extracellulare sono modulati

Tra le caratteristiche fenotipiche nella tipiche della sindrome di Alström è stata osservata una diffusa fibrosi interstiziale, localizzata in diversi in diversi distretti corporei, la cui causa rimane però sconosciuta.

Dall'analisi condotta con DNA microarrays abbiamo evidenziato un forte aumento della trascrizione di numerosi tipi di collagene e di alcune cheratine, che potrebbe determinare un'alterazione nella composizione della matrice extracellulare.

I collageni risultano essere le più abbondanti proteine presenti nei mammiferi e, una volta sintetizzati, vengono normalmente rilasciati nello spazio extracellulare. Successivamente essi si assemblano dando origine a polimeri ordinati detti fibrille collagene, che una volta formate vengono "saldate" mediante legami covalenti trasversali che contribuiscono al conferimento della loro stabilità.

Esistono numerosi esempi di patologie manifestanti fibrosi associate ad una anomala deposizione di collagene, esse possono coinvolgere numerosi organi, come fegato, polmoni, reni e possono essere il risultato di situazioni infiammatorie o di sindromi di origine genetica .

Nei nostri esperimenti abbiamo identificato inoltre un aumento di espressione del recettore di tipo 2 per fattori di crescita dei fibroblasti (FGFR2). Questo è in grado di legare numerosi FGFs e di mediare differenti tipi di segnale all'interno della cellula. Normalmente dopo l'interazione del ligando-recettore si verifica la dimerizzazione di quest'ultimo con autofosforilazione di residui tirosinici presenti nella sua porzione citoplasmatica. E' possibile che FGFR2 controlli direttamente la produzione di alcuni collageni, in quanto è già stato dimostrato che l'uso di dominanti negativi per questo gene comportino la repressione della trascrizione per il collagene di tipo 4. Altri studi hanno inoltre dimostrato che FGF2, uno dei ligandi di questo recettore, contribuisce direttamente alla genesi della fibrosi.

E' quindi ipotizzabile che la forte up-regolazione dei geni codificanti per collageni e cheratine siano alla base dell'insorgenza dell'esteso evento fibrotico individuabile nei pazienti con sindrome di Alström.

Mutazioni nel gene ALMS1 potrebbero influenzare la motilità cellulare

Un meccanismo di segnale interessante che ci è apparso durante l'analisi dei dati è quello che riguarda l'interazione tra IGFBP3 e COL1, entrambi i trascritti risultano essere aumentati. E' riportata l'interazione tra le due proteine che, in una situazione fisiologica, porta alla modulazione della migrazione cellulare. Cellule coltivate in matrici di collagene 1 mostrano una forte inibizione della motilità cellulare in presenza di IGFBP3.

Nel nostro esperimento abbiamo identificato la riduzione della trascrizione di una ulteriore proteina associata alla motilità: connessina 45. In particolare questa proteina è coinvolta nella formazione delle giunzioni GAP che rivestono ruoli nello svolgimento della comunicazione e della migrazione cellulare. La riduzione della trasmissione di informazioni attraverso giunzioni di tipo GAP determina

alterazioni nel movimento cellulare. Abbiamo inoltre osservato che l'espressione di alcune integrine è modulata nei nostri esperimenti (aumento dell'espressione); queste proteine contribuiscono alla regolazione della comunicazione e del movimento cellulare, legano componenti della matrice extracellulare (es. collagene) trasmettendo così segnali all'interno della cellula. In particolare una forte adesione della matrice extracellulare alle integrine determina un segnale di 'stop' al movimento cellulare. Inoltre sul versante intra-citoplasmatico tali proteine controllano l'aggregazione di componenti del citoscheletro, in modo tale da predisporre la cellula ai cambiamenti strutturali che si verificano in seguito al movimento. A supporto di questa ipotesi, dati preliminari hanno mostrato che fibroblasti derivanti da pazienti Alström, se seminati in una matrice tridimensionale di ialuronato, falliscono nella sua colonizzazione, suggerendo che tali cellule potrebbero essere incapaci di realizzare un corretto orientamento spaziale.

Fibroblasti ALMS mostrano un pathway insulinico alterato, ma non a livello del recettore insulinico

Abbiamo inoltre evidenziato una modulazione a livello del *signaling* insulinico: differenti proteine all'interno di questa via mostrano variazioni nei livelli degli mRNA che le codificano. Possiamo osservare la down regolazione dell'mRNA di SOCS, che origina una proteina con attività regolatoria sul signaling insulinico mediante l'attivazione della degradazione via proteasoma del recettore insulinico stesso. La sua bassa espressione potrebbe contribuire al tentativo di mantenere il segnale generato dall'insulina a livelli normali all'interno della cellula.

Abbiamo osservato l'up regolazione della fosfatasi PP1, questo enzima provvede a trasdurre uno dei segnali provenienti dall'insulina: la sua attivazione termina con la promozione della sintesi del glicogeno e la depressione della glicogenolisi. Coerentemente si osserva la diminuzione dell'espressione di PRKAR2B (PKA). Tale enzima nella cellula avvia un segnale che determina il blocco del processo di sintesi del glicogeno, pertanto la sua riduzione porterebbe all'effetto contrario. A questo proposito è riportato che un modello murino in cui questo gene viene deletato resistenza risulta resistente alle complicanze metaboliche derivanti da una dieta ad alto contenuto di grassi.

E' possibile che l'alterazione di queste vie sia determinata dal tentativo di recupero da una situazione di insulino resistenza superata dopo la coltura *in vitro*, quando cioè le cellule vengono trasferite in un ambiente privo di tali stimoli negativi.

I fibroblasti derivanti da pazienti con sindrome di Alström mostrano una normale risposta all'insulina

Come già detto in precedenza, colture primarie di fibroblasti cutanei sono state ampiamente utilizzate in passato per valutare *in vitro* la sensibilità insulinica ed hanno consentito di evidenziare una scarsa incorporazione di glucosio insulino-mediata determinata dal difetto del recettore insulinico. (Schilling et al., 1979).

Fibroblasti derivanti da pazienti ALMS testati per la loro capacità di rispondere all'insulina in test di incorporazione di glucosio, hanno mostrato una risposta

paragonabile a quella di soggetti di controllo. Questi dati concordano con esperimenti effettuati in precedenza (Rudiger et al., 1985), condotti però su un unico paziente diagnosticato sulla base di criteri clinici ma non geneticamente caratterizzato per mutazione del gene *ALMS1*.

Generazione di un nuovo modello murino per la sindrome di Alström

Nei modelli murini sopra descritti così come nella maggior parte dei pazienti geneticamente caratterizzati le mutazioni sono localizzate negli esoni 8, 10 e 16. Questa osservazione unitamente agli esperimenti *in vitro* precedentemente ricordati in cui la sola porzione 5' è sufficiente a ripristinare la struttura e la funzionalità ciliari, hanno suggerito un'importanza particolare di questa regione del gene *Alms1* per lo svolgimento della sua funzione .

Per questa ragione si è pensato di costruire un nuovo modello murino portante l'interruzione del gene a livello dell'introne 7.

L'analisi genotipica di 205 topi derivanti della progenie F2 ha portato ad osservare la completa assenza di omozigoti per la mutazione, mentre la proporzione tra topi con un genotipo *wild type* ed eterozigote è risultata essere 1:2, come atteso. Queste informazioni ci hanno spinto a supporre che la mutazione generata, quando in omozigosi, determini una letalità embrionale.

La caratterizzazione dei topi eterozigoti ci porta ad affermare che non sono osservabili differenze con i controlli *wild type* per quanto riguarda peso, distribuzione della massa adiposa, livelli plasmatici di glucosio e di insulina . La valutazione dell'attività beta-galattosidasi conferma che, come nel modello precedentemente descritto *Alms1^{GT(pGT1Lxf)/Pjn}*, il gene viene espresso soprattutto a livello dell'orecchio, del cervelletto, del rene e dei testicoli.

La fase successiva ha riguardato l'analisi di embrioni a diversi stadi differenziativi, attraverso la caratterizzazione del genotipo e del fenotipo. Nuovamente abbiamo riscontrato la mancanza di omozigoti per la mutazione introdotta. Mediante colorazione specifica abbiamo osservato che il gene *Alms1* è ampiamente rappresentato durante il differenziamento: durante lo stadio di 7.5 giorni post-concepimento è osservabile nella cavità amniotica, a livello dell'endoderma definitivo e nell'ectoderma extraembrionale. Successivamente, dopo l'avvio del processo organogenetico, la sua espressione è prevalentemente a livello del sistema visivo e uditivo, a livello degli arti superiori ed inferiori, in diversi distretti encefalici (mes-, met-, tel-encefalo) e a livello della colonna vertebrale.

La mancata identificazione di mutanti in omozigosi ci ha pertanto suggerito che il gene *Alms1* e soprattutto la sua porzione N-terminale possa essere coinvolto nelle primissime fasi dell'embriogenesi.

Il movimento dinamico e i riarrangiamenti all'interno della cellula risultano essere di fondamentale importanza per la definizione degli assi corporei. E' stato dimostrato come l'alterazione della regolazione dei filamenti actinici conduca all'incorretta migrazione e quindi formazione di endoderma, mesoderma ed ectoderma nella fase di pre-gastrulazione, in seguito alla mancata polarizzazione cellulare che impedisce di definire l'asse antero-posteriore dell'embrione. Durante questa fase la cellule mostrano un attivo movimento che viene esplicito attraverso

la generazione di filopodi, evidenziando un profondo riarrangiamento morfologico.

Anche la componente citoscheletrica microtubulare riveste un ruolo particolarmente importante nello sviluppo embrionale, in quanto contribuisce alla riorganizzazione citoplasmatica dell'embrione e coordina la divisione mitotica. Il mancato assemblaggio di organizzate strutture impedisce la formazione del mesoderma viscerale, responsabile attraverso l'interazione cellula-cellula, della determinazione dell'organizzazione endodermale. La mancata specificazione di queste due strutture è stato ampiamente dimostrato condurre ad una letalità embrionale.

Pertanto è possibile che vista la sua localizzazione a livello centrosomico e le emergenti evidenze di una partecipazione a livello del trafficking intracellulare *Alms1* prenda parte alla organizzazione di strutture embrionali, e che, la porzione 5' della proteina possa essere essenziale nell'esercizio di tali funzioni.

BIBLIOGRAFIA

- Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L. & Katsanis, N. The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 125-148 (2006)
- Baroni, T. et al. P253R fibroblast growth factor receptor-2 mutation induces RUNX2 transcript variants and calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 202, 524-35 (2005).
- Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64, 1471-83 (2007).
- Caraccio, N. et al. Extracellular adenosine 5'-triphosphate modulates interleukin-6 production by human thyrocytes through functional purinergic P2 receptors. *Endocrinology* 146, 3172-8 (2005).
- Collin, G. B. et al. Alms1-disrupted mice recapitulate human Alström syndrome. *Hum Mol Genet* 14, 2323-33 (2005).
- Collin, G. B., Maddatu, T. P., Sen, S. & Naggert, J. K. Genetic modifiers interact with Cpe(fat) to affect body weight, adiposity, and hyperglycemia. *Physiol Genomics* 22, 182-90 (2005).
- Collin, G. B. et al. Alström syndrome: further evidence for linkage to human chromosome 2p13. *Hum Genet* 105, 474-9 (1999).
- Collin, G. B. et al. Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alström syndrome. *Nat Genet* 31, 74-8 (2002).
- Despres, J. P. & Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881-7 (2006).
- Farmer, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4, 263-73 (2006).
- Gao, Z. et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277, 48115-21 (2002).
- Gesta, S., Tseng, Y. H. & Kahn, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-56 (2007).
- Hearn, T. et al. Mutation of ALMS1, a large gene with a tandem repeat encoding 47 amino acids, causes Alström syndrome. *Nat Genet* 31, 79-83 (2002).
- Hearn, T. et al. Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 1581-7 (2005).
- Hirosumi, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-6 (2002).
- Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-7 (2006).
- Huang, S. & Czech, M. P. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 5, 237-52 (2007).
- Iancu, C., Mistry, S. J., Arkin, S., Wallenstein, S. & Atweh, G. F. Effects of stathmin inhibition on the mitotic spindle. *J Cell Sci* 114, 909-16 (2001).
- Jones, D. E. Fat is an immuno-regulatory issue. *Hepatology* 42, 755-8 (2005).
- Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840-6 (2006).

Kawaguchi, N. et al. ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating beta1 integrin function. *J Cell Sci* 116, 3893-904 (2003).

Khan, A. H. et al. Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is dependent upon both the amino terminus and the large cytoplasmic loop. *J Biol Chem* 279, 37505-11 (2004).

Khan, A. H. & Pessin, J. E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45, 1475-83 (2002).

Khan, A. H. et al. Munc18c regulates insulin-stimulated glut4 translocation to the transverse tubules in skeletal muscle. *J Biol Chem* 276, 4063-9 (2001).

Laviola, L. et al. Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 55, 952-61 (2006).

Lazar, M. A. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307, 373-5 (2005).

Marshall, J. D., Beck, S., Maffei, P. & Naggert, J. K. Alström syndrome. *Eur J Hum Genet* 15, 1193-202 (2007).

Marshall, J. D. et al. New Alström syndrome phenotypes based on the evaluation of 182 cases. *Arch Intern Med* 165, 675-83 (2005).

Marshall, J. D. et al. Spectrum of ALMS1 variants and evaluation of genotype-phenotype correlations in Alström syndrome. *Hum Mutat* 28, 1114-23 (2007).

Matarese, G. & La Cava, A. The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol* 25, 193-200 (2004).

Pazour, G. J. & Rosenbaum, J. L. Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol* 12, 551-5 (2002).

Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-53 (2006).

Rusnati, M. & Presta, M. Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenesis strategies. *Curr Pharm Des* 13, 2025-44 (2007).

Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 1793-801 (2006).

Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 772-83 (2006).

Van Gaal, L. F., Mertens, I. L. & De Block, C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444, 875-80 (2006).

Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-9 (2005).

Abbracchio, M. P. et al. in *Trends Pharmacol Sci* 52-5 (2003).

Abbracchio, M. P. & Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64, 445-75 (1994).

Abbracchio, M. P. & Burnstock, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78, 113-45 (1998).

Abbracchio, M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58, 281-341 (2006).

Beljaars, L. et al. Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 63, 197-208 (2004).

Bodin, P. & Burnstock, G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26, 959-69 (2001).

Bogdanov, Y., Rubino, A. & Burnstock, G. Characterisation of subtypes of the P2X and P2Y families of ATP receptors in the foetal human heart. *Life Sci* 62, 697-703 (1998).

Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N. & Dagnelie, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112, 358-404 (2006).

Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24, 509-81 (1972).

Burnstock, G. Current status of P2X receptors: distribution and pathophysiological roles. *Proc West Pharmacol Soc* 42, 119-21 (1999).

Burnstock, G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin Med* 2, 45-53 (2002).

Burnstock, G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S172-81 (2006).

Burnstock, G. & Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16, 433-40 (1985).

Cancello, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54, 2277-86 (2005).

Caspar-Bauguil, S. et al. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 579, 3487-92 (2005).

Chambers, J. K. et al. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* 275, 10767-71 (2000).

Chandra, R. K. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14304-7 (1996).

Chapal, J. et al. Comparative effects of adenosine-5'-triphosphate and related analogues on insulin secretion from the rat pancreas. *Fundam Clin Pharmacol* 11, 537-45 (1997).

Charriere, G. et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278, 9850-5 (2003).

Chaudry, I. Does ATP cross the cell plasma membrane. *Yale J. Biol. Med.* 55, 1-10 (1982).

Chevassus, H. et al. P2Y receptor activation enhances insulin release from pancreatic beta-cells by triggering the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366, 464-9 (2002).

Chung, S. et al. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology* 147, 5340-51 (2006).

Cinti, S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 9-15 (2005).

Cinti, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347-55 (2005).

Cockcroft, S. & Gomperts, B. D. ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* 279, 541-2 (1979).

Cousin, B. et al. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *Faseb J* 13, 305-12 (1999).

Cowherd, R. M., Lyle, R. E. & McGehee, R. E., Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10, 3-10 (1999).

Cox, M. A. et al. The pyrimidinergic P2Y6 receptor mediates a novel release of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytic cells stimulated with UDP. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 467-73 (2005).

Curat, C. A. et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53, 1285-92 (2004)

Di Virgilio, F. Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *J Auton Nerv Syst* 81, 59-63 (2000).

Di Virgilio, F., Borea, P. A. & Illes, P. P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol Sci* 22, 5-7 (2001).

Di Virgilio, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97, 587-600 (2001).

Di Virgilio, F. et al. A purinergic hypothesis for immunomodulation. *Ital J Biochem* 45, 195-203 (1996).

Dubyak, G. R. & el-Moatassim, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265, C577-606 (1993).

Fain, J. N., Bahouth, S. W. & Madan, A. K. TNF α release by the nonfat cells of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 616-22 (2004).

Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P. & Bahouth, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-82 (2004).

Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115, 911-9; quiz 920 (2005).

Farret, A. et al. P2Y purinergic potentiation of glucose-induced insulin secretion and pancreatic beta-cell metabolism. *Diabetes* 53 Suppl 3, S63-6 (2004).

Feng, C., Mery, A. G., Beller, E. M., Favot, C. & Boyce, J. A. Adenine nucleotides inhibit cytokine generation by human mast cells through a Gs-coupled receptor. *J Immunol* 173, 7539-47 (2004).

Fischer, Y., Becker, C. & Loken, C. Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 274, 755-61 (1999).

Fredholm, B. B. Effect of adenosine, adenosine analogues and drugs inhibiting adenosine inactivation on lipolysis in rat fat cells. *Acta Physiol Scand* 102, 191-8 (1978).

Freeman, K. et al. Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs. *Genomics* 78, 124-8 (2001).

Geary, C. et al. Increased susceptibility of purinergic receptor-deficient mice to lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L890-5 (2005).

Glynn, I. Membrane adenosine triphosphatase and cation transport. *Br. Med. Bull.* 24, 165-169 (1968).

Gregoire, F. M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 997-1002 (2001).

Gregoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78, 783-809 (1998).

Gu, B. J. & Wiley, J. S. Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X7 receptor. *Blood* 107, 4946-53 (2006).

Hanley, P. J. et al. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9479-84 (2004).

Hashimoto, N., Robinson, F. W., Shibata, Y., Flanagan, J. E. & Kono, T. Diversity in the effects of extracellular ATP and adenosine on the cellular processing and physiologic actions of insulin in rat adipocytes. *J Biol Chem* 262, 15026-32 (1987).

Hauner, H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc* 64, 163-9 (2005).

Hillaire-Buys, D., Chapal, J., Bertrand, G., Petit, P. & Loubatieres-Mariani, M. Purinergic receptors on insulin-secreting cells. *Fundam Clin Pharmacol* 8, 117-27 (1994).

Horckmans, M. et al. Extracellular adenine nucleotides inhibit the release of major monocyte recruiters by human monocyte-derived dendritic cells. *FEBS Lett* 580, 747-54 (2006).

Jiang, L. H. et al. Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 23, 8903-10 (2003).

Kaczmarek, E. et al. Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost* 93, 735-42 (2005).

Kanda, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116, 1494-505 (2006).

Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-56 (2004).

Khakh, B. S. & North, R. A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527-32 (2006).

Khine, A. A. et al. Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway. *Blood* 107, 2936-42 (2006).

Kolb, H. & Mandrup-Poulsen, T. An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia* 48, 1038-50 (2005).

Korcok, J., Raimundo, L. N., Du, X., Sims, S. M. & Dixon, S. J. P2Y6 nucleotide receptors activate NF-kappaB and increase survival of osteoclasts. *J Biol Chem* 280, 16909-15 (2005).

Lazarowski, E. R., Shea, D. A., Boucher, R. C. & Harden, T. K. Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Mol Pharmacol* 63, 1190-7 (2003).

Leaver, E. V. & Pappone, P. A. Beta-adrenergic potentiation of endoplasmic reticulum Ca(2+) release in brown fat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C1016-24 (2002).

Lee, B. C. et al. P2Y-like receptor, GPR105 (P2Y14), identifies and mediates chemotaxis of bone-marrow hematopoietic stem cells. *Genes Dev* 17, 1592-604 (2003).

Lee, H. et al. Dual roles of P2 purinergic receptors in insulin-stimulated leptin production and lipolysis in differentiated rat white adipocytes. *J Biol Chem* 280, 28556-63 (2005).

Lee, S. C., Hamilton, J. S., Trammell, T., Horwitz, B. A. & Pappone, P. A. Adrenergic modulation of intracellular pH in isolated brown fat cells from hamster and rat. *Am J Physiol* 267, C349-56 (1994).

Lee, S. C. & Pappone, P. A. Effects of P2 purinergic receptor stimulation in brown adipocytes. *Am J Physiol* 273, C679-86 (1997).

Lee, S. C. & Pappone, P. A. Membrane responses to extracellular ATP in rat isolated white adipocytes. *Pflugers Arch* 434, 422-8 (1997).

Lee, S. C. & Pappone, P. A. ATP can stimulate exocytosis in rat brown adipocytes without apparent increases in cytosolic Ca²⁺ or G protein activation. *Biophys J* 76, 2297-306 (1999).

Lippman, F. Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Enzymology* 1, 99 (1941).

Luttikhuisen, D. T., Harmsen, M. C., de Leij, L. F. & van Luyn, M. J. Expression of P2 receptors at sites of chronic inflammation. *Cell Tissue Res* 317, 289-98 (2004).

Marshall, S., Nadeau, O. & Yamasaki, K. Glucosamine-induced activation of glycogen biosynthesis in isolated adipocytes. Evidence for a rapid allosteric control mechanism within the hexosamine biosynthesis pathway. *J Biol Chem* 280, 11018-24 (2005).

Matarese, G. & La Cava, A. The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol* 25, 193-200 (2004).

Muller, T. et al. The P2Y₁₄ Receptor of Airway Epithelial Cells: Coupling to Intracellular Ca²⁺ and IL-8 Secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 601-9 (2005).

Mutini, C. et al. Mouse dendritic cells express the P2X₇ purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol* 163, 1958-65 (1999).

Nagaya, N., Tittle, R. K., Saar, N., Dellal, S. S. & Hume, R. I. An intersubunit zinc binding site in rat P2X₂ receptors. *J Biol Chem* 280, 25982-93 (2005).

North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013-67 (2002).

Pappone, P. A. & Lee, S. C. Purinergic receptor stimulation increases membrane trafficking in brown adipocytes. *J Gen Physiol* 108, 393-404 (1996).

Pastore, S. et al. Stimulation of Purinergic Receptors Modulates Chemokine Expression in Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* (2006).

Paz, K. et al. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272, 29911-8 (1997).

Perregaux, D. G., McNiff, P., Laliberte, R., Conklyn, M. & Gabel, C. A. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol* 165, 4615-23 (2000).

Pond, C. M. Adipose tissue and the immune system. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 17-30 (2005).

Pouwels, M. J. et al. Role of hexosamines in insulin resistance and nutrient sensing in human adipose and muscle tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5132-7 (2004).

Rajala, M. W. & Scherer, P. E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144, 3765-73 (2003).

Ralevic, V. & Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50, 413-92 (1998).

Schnurr, M. et al. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. *Blood* 102, 613-20 (2003).

Schodel, J., Weise, I., Klinger, R. & Schmidt, M. Stimulation of lipogenesis in rat adipocytes by ATP, a ligand for P2-receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 767-73 (2004).

Scrivens, M. & Dickenson, J. M. Functional expression of the P2Y14 receptor in murine T-lymphocytes. *Br J Pharmacol* 146, 435-44 (2005).

Scrivens, M. & Dickenson, J. M. Pharmacological effects mediated by UDP-glucose that are independent of P2Y14 receptor expression. *Pharmacol Res* 51, 533-8 (2005).

Scrivens, M. & Dickenson, J. M. Functional expression of the P2Y14 receptor in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 543, 166-73 (2006).

Shoelson, S. E., Lee, J. & Yuan, M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3, S49-52 (2003).

Skelton, L., Cooper, M., Murphy, M. & Platt, A. Human immature monocyte-derived dendritic cells express the G protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001, P2Y14) and increase intracellular calcium in response to its agonist, uridine diphosphoglucose. *J Immunol* 171, 1941-9 (2003).

Solini, A. et al. Defective P2Y purinergic receptor function: A possible novel mechanism for impaired glucose transport. *J Cell Physiol* 197, 435-44 (2003).

Solle, M. et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276, 125-32 (2001).

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A. & Buell, G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735-8 (1996).

Swennen, E. L., Bast, A. & Dagnelie, P. C. Purinergic receptors involved in the immunomodulatory effects of ATP in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 1194-9 (2006).

Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 772-83 (2006).

Weisberg, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116, 115-24 (2006).

Weisberg, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-808 (2003).

Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1785-8 (2003).

Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-9 (2005).

Wilson, S. M., Barsoum, M. J., Wilson, B. W. & Pappone, P. A. Purine nucleotides modulate proliferation of brown fat preadipocytes. *Cell Prolif* 32, 131-40 (1999).

Wilson, S. M., Lee, S. C., Shook, S. & Pappone, P. A. ATP and beta-adrenergic stimulation enhance voltage-gated K current inactivation in brown adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1847-58 (2000).

Wilson, S. M. & Pappone, P. A. P2 receptor modulation of voltage-gated potassium currents in Brown adipocytes. *J Gen Physiol* 113, 125-38 (1999).

Xu, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-30 (2003).

Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 299-309 (2000).

Ali, A. & Crawford, M. J. Developmental biology: an array of new possibilities. *Biotechnol Adv* 20, 363-78 (2002).

Cheung, V. G. et al. Making and reading microarrays. *Nat Genet* 21, 15-9 (1999).

Colantuoni, C., Henry, G., Zeger, S. & Pevsner, J. SNOMAD (Standardization and Normalization of MicroArray Data): web-accessible gene expression data analysis. *Bioinformatics* 18, 1540-1 (2002).

Cook, K. L. & Sayler, G. S. Environmental application of array technology: promise, problems and practicalities. *Curr Opin Biotechnol* 14, 311-8 (2003).

Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. & Trent, J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21, 10-4 (1999).

Forster, T., Roy, D. & Ghazal, P. Experiments using microarray technology: limitations and standard operating procedures. *J Endocrinol* 178, 195-204 (2003).

Jenson, S. D. et al. Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA. *Mol Pathol* 56, 307-12 (2003).

Kuo, W. P. et al. A primer on gene expression and microarrays for machine learning researchers. *J Biomed Inform* 37, 293-303 (2004).

Lockhart, D. J. & Winzeler, E. A. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827-36 (2000).

Stears, R. L., Martinsky, T. & Schena, M. Trends in microarray analysis. *Nat Med* 9, 140-5 (2003).

Walsh, B. & Henderson, D. Microarrays and beyond: what potential do current and future genomics tools have for breeders? *J Anim Sci* 82 E-Suppl, E292-299 (2004).

Baroni, T. et al. P253R fibroblast growth factor receptor-2 mutation induces RUNX2 transcript variants and calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 202, 524-35 (2005).

Basu, J. et al. Localization of the Drosophila checkpoint control protein Bub3 to the kinetochore requires Bub1 but not Zw10 or Rod. *Chromosoma* 107, 376-85 (1998).

Boutros, R., Lobjois, V. & Ducommun, B. CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. *Cancer Res* 67, 11557-64 (2007).

Chen, R. H. Dual inhibition of Cdc20 by the spindle checkpoint. *J Biomed Sci* 14, 475-9 (2007).

Crasta, K. & Surana, U. Disjunction of conjoined twins: Cdk1, Cdh1 and separation of centrosomes. *Cell Div* 1, 12 (2006).

Crosson, S. M., Khan, A., Printen, J., Pessin, J. E. & Saltiel, A. R. PTG gene deletion causes impaired glycogen synthesis and developmental insulin resistance. *J Clin Invest* 111, 1423-32 (2003).

Delibegovic, M. et al. Disruption of the striated muscle glycogen targeting subunit PPP1R3A of protein phosphatase 1 leads to increased weight gain, fat deposition, and development of insulin resistance. *Diabetes* 52, 596-604 (2003).

Dettman, R. W., Turner, F. R. & Raff, E. C. Genetic analysis of the *Drosophila* beta3-tubulin gene demonstrates that the microtubule cytoskeleton in the cells of the visceral mesoderm is required for morphogenesis of the midgut endoderm. *Dev Biol* 177, 117-35 (1996).

Gerdes, J. M. & Katsanis, N. Microtubule transport defects in neurological and ciliary disease. *Cell Mol Life Sci* 62, 1556-70 (2005).

Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y. & Tanti, J. F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99-109 (2005).

Helps, N. R., Luo, X., Barker, H. M. & Cohen, P. T. NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J* 349, 509-18 (2000).

Iancu, C., Mistry, S. J., Arkin, S., Wallenstein, S. & Atweh, G. F. Effects of stathmin inhibition on the mitotic spindle. *J Cell Sci* 114, 909-16 (2001).

Kawaguchi, N. et al. ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating beta1 integrin function. *J Cell Sci* 116, 3893-904 (2003).

Ku, N. O., Strnad, P., Zhong, B. H., Tao, G. Z. & Omary, M. B. Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology* 46, 1639-49 (2007).

Li, J. J. & Li, S. A. Mitotic kinases: the key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol Ther* 111, 974-84 (2006).

Lindqvist, A., van Zon, W., Karlsson Rosenthal, C. & Wolthuis, R. M. Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. *PLoS Biol* 5, e123 (2007).

Liu, B., Weinzimer, S. A., Gibson, T. B., Mascarenhas, D. & Cohen, P. Type Ialpha collagen is an IGFBP-3 binding protein. *Growth Horm IGF Res* 13, 89-97 (2003).

Luders, J. & Stearns, T. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 161-7 (2007).

Meraldi, P. & Nigg, E. A. Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *J Cell Sci* 114, 3749-57 (2001).

Meszaros, R., Akerlund, M., Hjalt, T., Durbeej, M. & Ekblom, P. Gene expression profiling of differentiating embryonic stem cells expressing dominant negative fibroblast growth factor receptor 2. *Matrix Biol* 26, 197-205 (2007).

Middelkoop, E. Fibroblast phenotypes and their relevance for wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 4, 9-11 (2005).

Ott, E. B., Sakalis, P. A., Marques, I. J. & Bagowski, C. P. Characterization of the Enigma family in zebrafish. *Dev Dyn* 236, 3144-54 (2007).

23.

Rakeman, A. S. & Anderson, K. V. Axis specification and morphogenesis in the mouse embryo require Nap1, a regulator of WAVE-mediated actin branching. *Development* 133, 3075-83 (2006).

Raynaud-Messina, B. & Merdes, A. Gamma-tubulin complexes and microtubule organization. *Curr Opin Cell Biol* 19, 24-30 (2007).

Rusnati, M. & Presta, M. Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenesis strategies. *Curr Pharm Des* 13, 2025-44 (2007).

Schreyer, S. A., Cummings, D. E., McKnight, G. S. & LeBoeuf, R. C. Mutation of the RIIbeta subunit of protein kinase A prevents diet-induced insulin resistance and dyslipidemia in mice. *Diabetes* 50, 2555-62 (2001).

Srinivas, S., Rodriguez, T., Clements, M., Smith, J. C. & Beddington, R. S. Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm. *Development* 131, 1157-64 (2004).

Wynn, T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199-210 (2008).

Youngren, J. F. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 64, 873-91 (2007).

APPENDICE 1

FIGURE

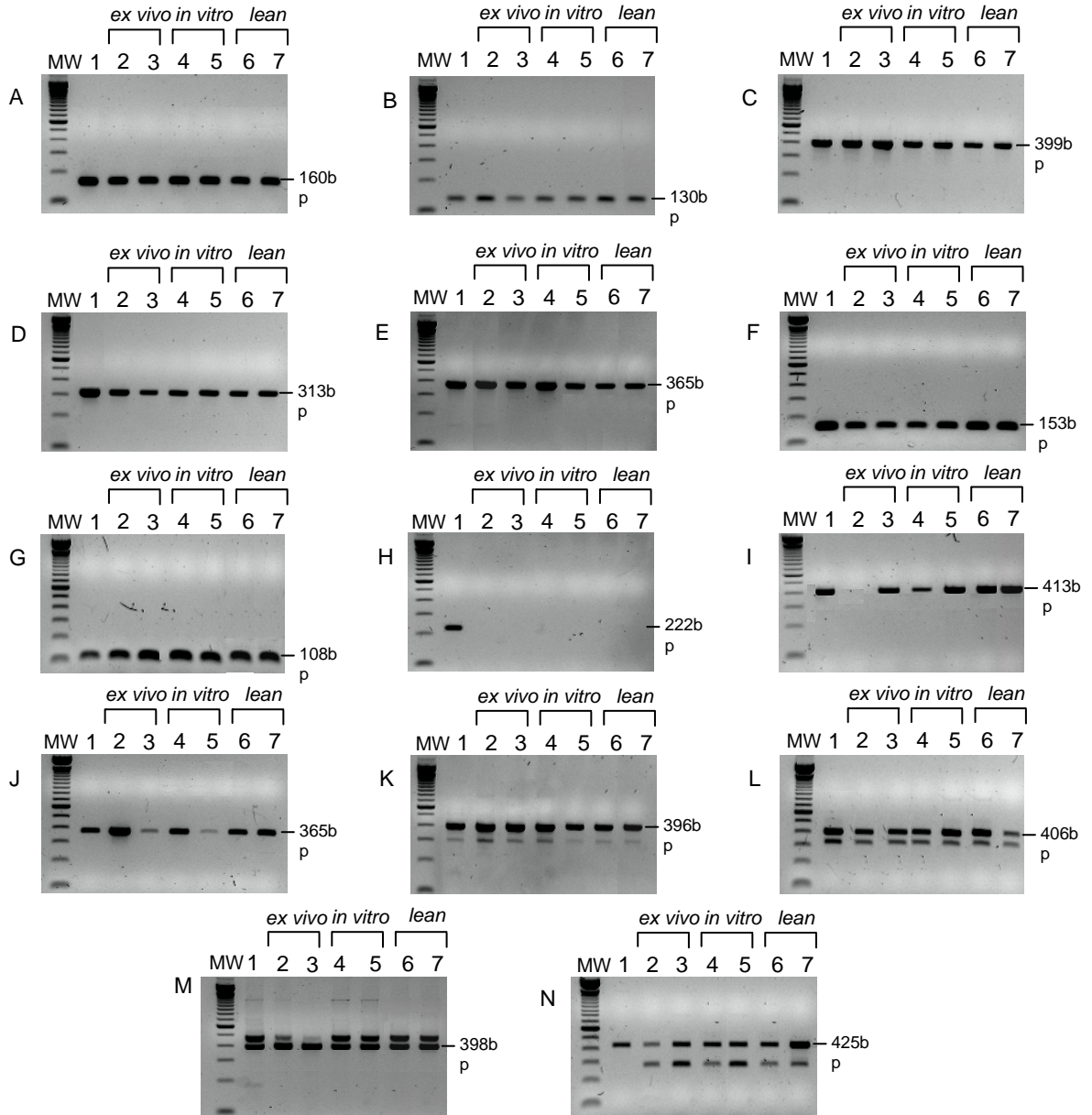


FIGURA 1

P2X and P2Y expression in adipose tissue.

Each receptor was tested at different stages of differentiation process (FVS and AD) and in several depots. P2X1, P2X2, P2Y1, P2Y2, P2Y11, P2Y13, P2Y14 (A-G) show the same expression levels in all samples. Adipose tissue doesn't express P2X3 subtype (H). P2Y6 (J) and P2Y12 (I) display different expression in FVS and AD both ex vivo than in vitro. Gene expression analysis highlights the presence of multiple PCR products for P2X4, P2X5, P2X7, P2Y4 (K-N). All the figures are representative of three different RT-PCR reactions. MW: 100 bp molecular weight. The brightest band corresponds at 600 bp. 1: positive control 2, 4: FVS (stromal vascular fraction) 3,5: AD (mature adipocytes) 6: SC subcutaneous adipose tissue) 7: VS (visceral adipose tissue) Ex vivo: FVS and AD were directly collected from the tissue. In vitro: FVS and AD from adipose tissue and subsequently grown in culture. Lean: subjects with BMI<25 kg/m².

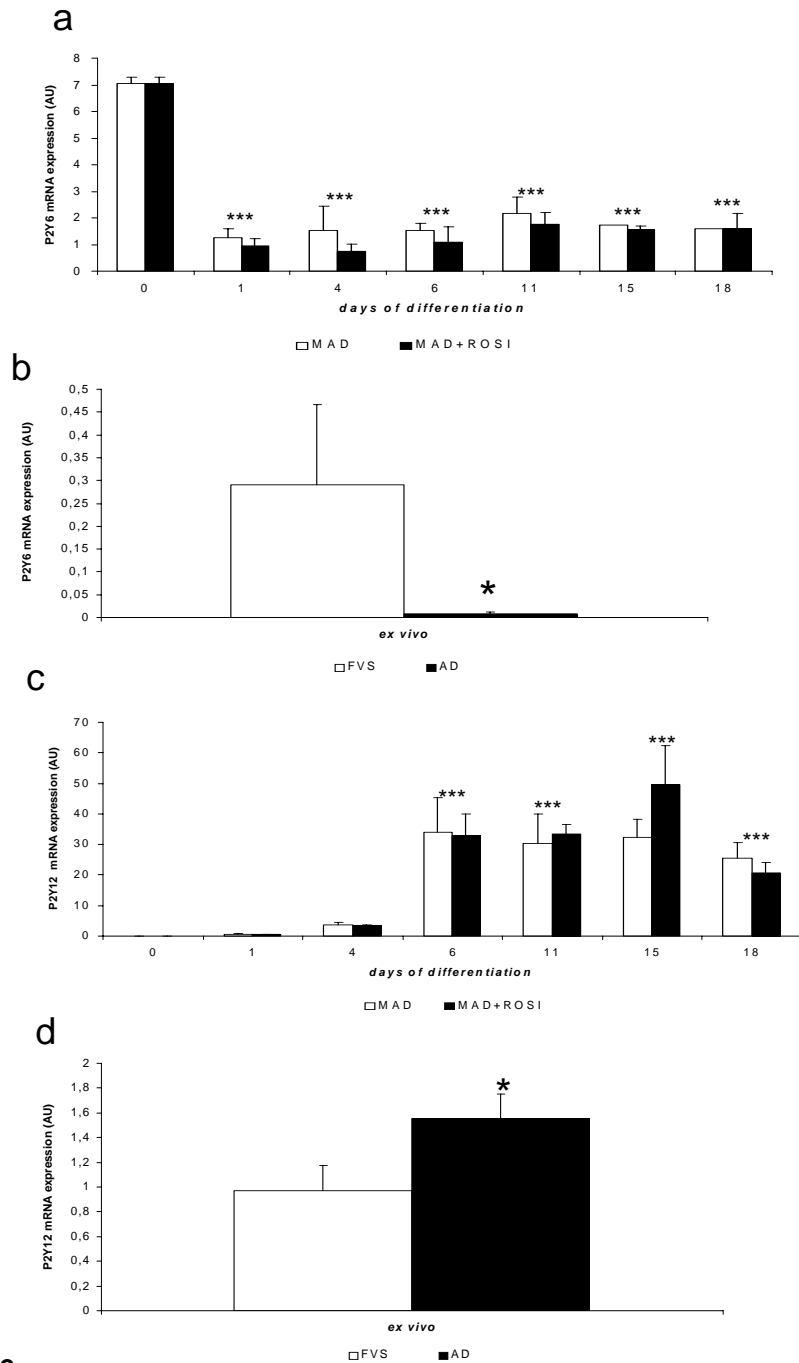


FIGURA 2

P2Y6 and P2Y12 displayed different expression levels during adipogenesis. The analysis of receptor's mRNA by qPCR was carried out at several time point of a differentiation process from preadipocytes to mature adipocytes and in these fractions freshly isolated. P2Y6 shows its fast down-regulation during adipogenesis both in culture (a) than in isolated cells (b). On the contrary, P2Y12 mRNA increases of transcripts in adipogenic process, both in vitro (c) than ex vivo (d). Rosiglitazone doesn't induce any change in P2Y6 and P2Y12 expression. The data are expressed as arbitrary unit (AU) and normalized using 18S or HMBS control. MAD: adipogenic medium (white bars). MAD+ROSI: adipogenic medium with Rosiglitazone (black bars). FVS: stromal vascular fraction (white bars), AD: mature adipocytes (black bars). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

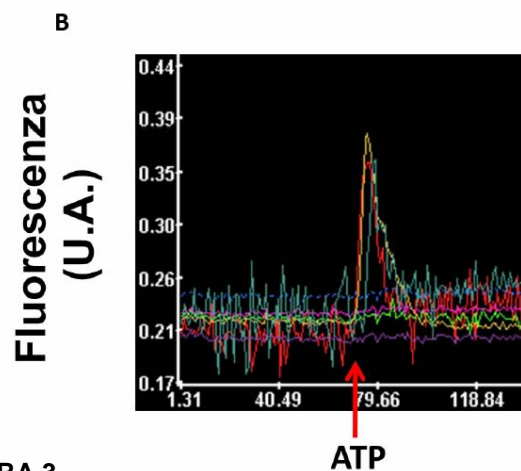
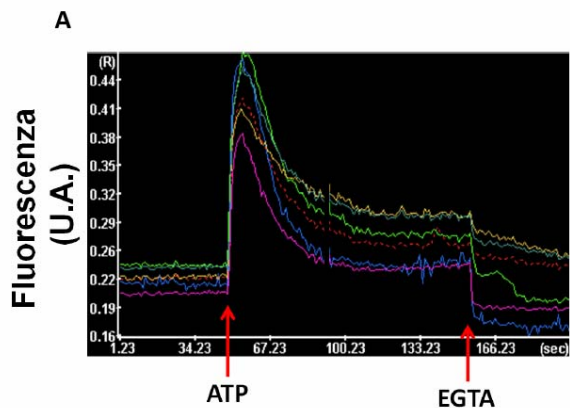


FIGURA 3

Figura . A: La stimolazione dei recettori P2 purinergici in colture primarie di adipociti umani da parte dell'ATP induce un aumento delle $[Ca^{2+}]_i$ caratterizzato da un picco iniziale seguito da una fase di plateau. B: La stimolazione da parte dell'ATP in ambiente in mezzo di coltura privo di Ca^{2+} non mostra variazioni significative del picco iniziale mentre annulla la seconda fase di plateau.

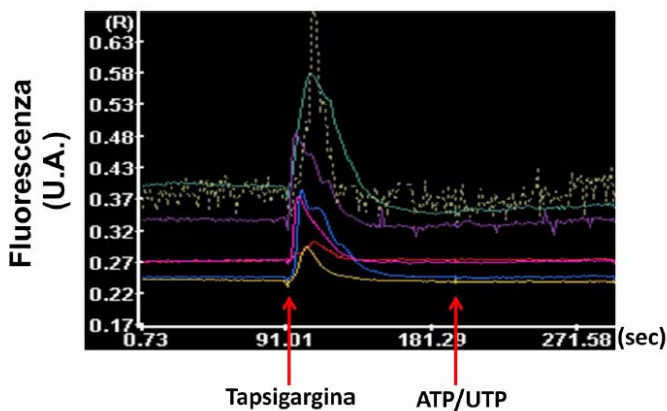


FIGURA 4. Lo svuotamento dei depositi intracellulari di Ca^{2+} negli adipociti umani da parte della tapsigargina annulla l'aumento delle $[Ca^{2+}]_i$ indotto dall'ATP e dall'UTP

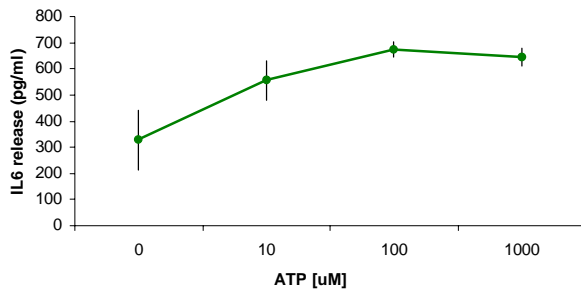


FIGURA 5

Misura del rilascio di IL6 dopo stimolo con dosi crescenti di ATP in colture primarie di adipociti al 14 giorno di differenziamento. L'errore è espresso come \pm DS.

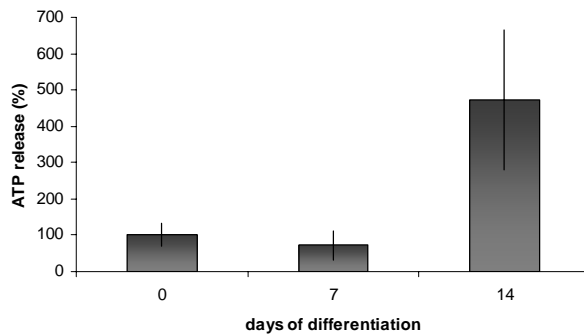


FIGURA 6

Valutazione della presenza di ATP nel terreno di colture primarie di adipociti. Il dosaggio è stato effettuato rispettivamente a 0, 7 e 14 dopo l'induzione del differenziamento. I dati sono rappresentati come percentuale sul basale (tempo zero). L'errore è espresso come errore percentuale.

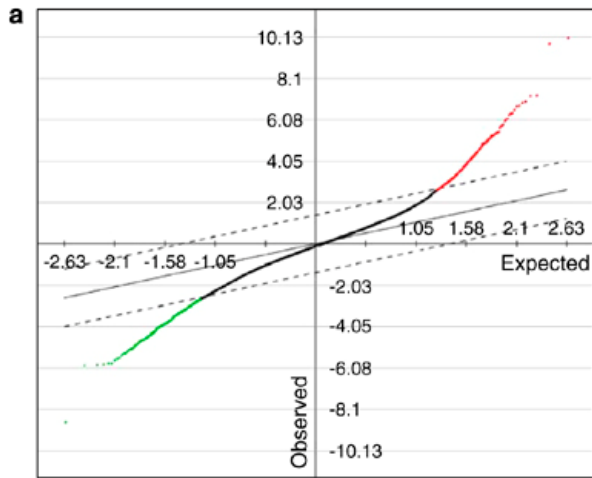


FIGURA 7

SAM plot. Rappresentazione grafica della distribuzione dei valori di espressione osservati rispetto alla distribuzione attesa.

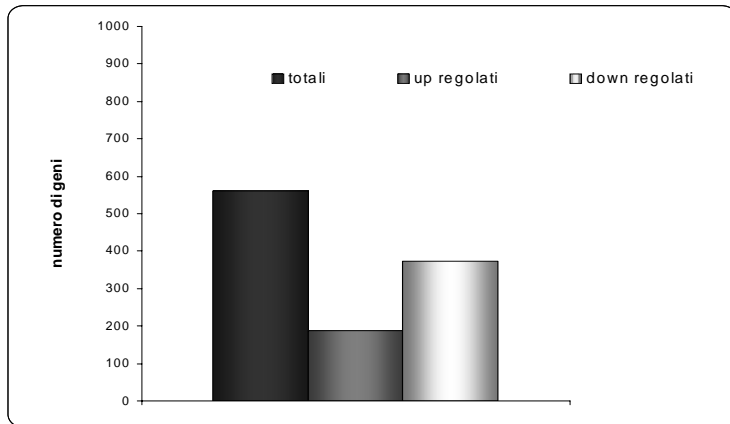


FIGURA 8

Rappresentazione del numero di geni differenzialmente espressi in un esperimento di DNA microarray effettuato confrontando fibroblasti derivanti da pazienti Alstrom contro fibroblasti derivanti da controlli sani.

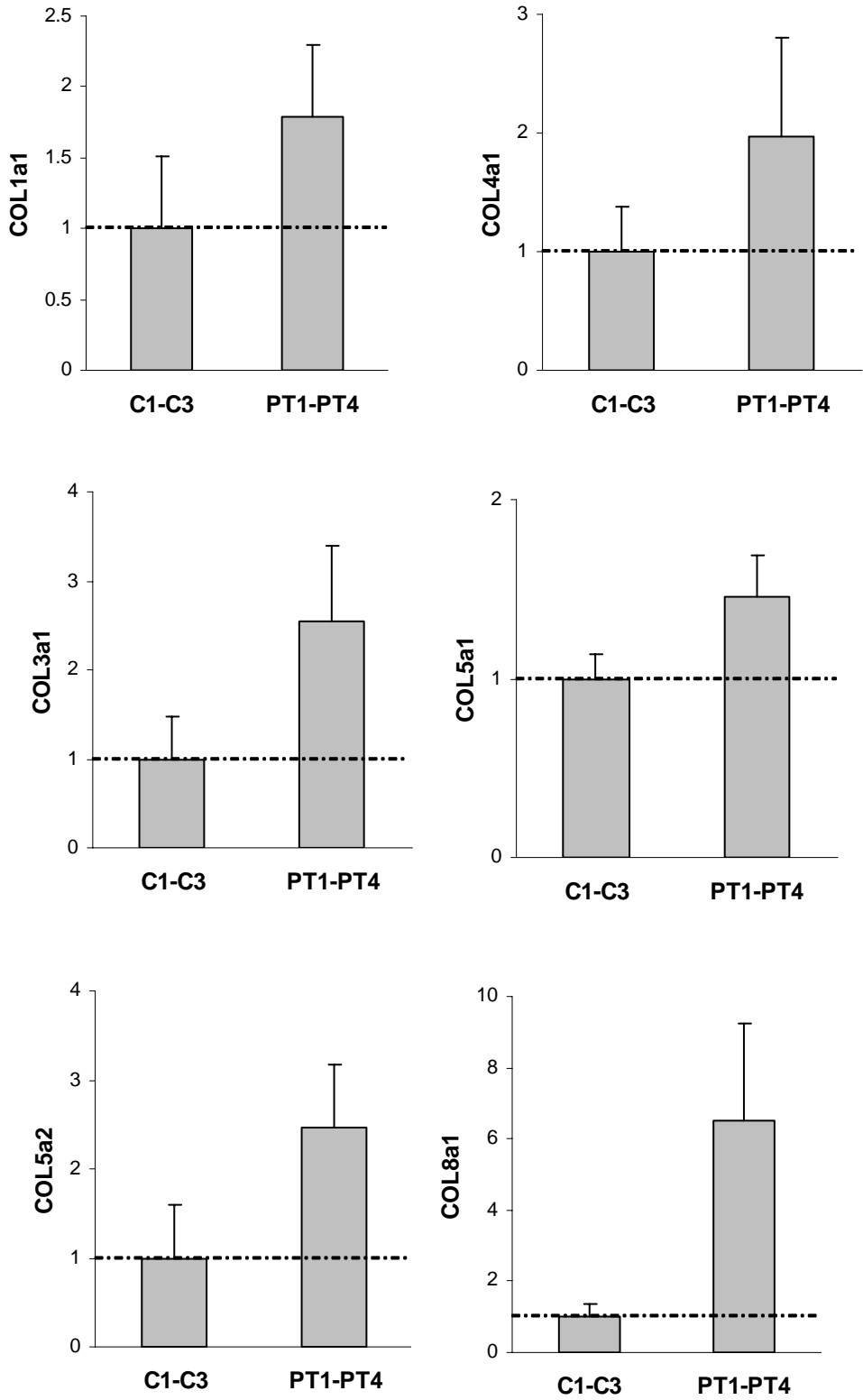


FIGURA 9a

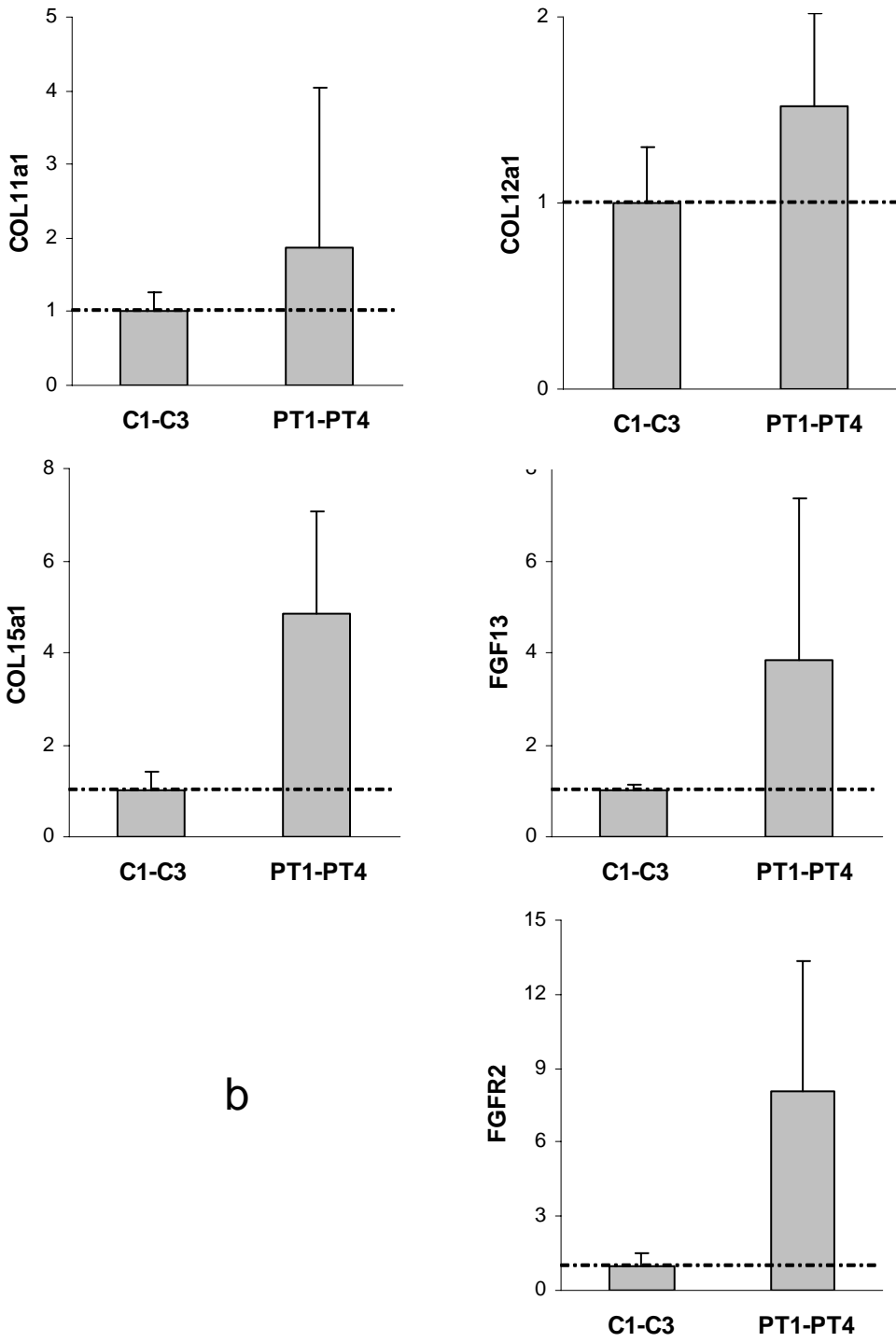


FIGURA 9 A E B Livelli di espressione genica in fibroblasti di controllo (C1-C3) e in fibroblasti ALMS (PT1-PT4). L'espressione di ciascun gene è stata valutata singolarmente nei fibroblasti di 3 controlli sani (C1-C3) e nei fibroblasti di 4 pazienti ALMS (PT1-PT4). Per ciascun campione la quantità di mRNA è stata normalizzata rispetto alla quantità del trascritto di *HMBS*. In ciascuna figura, la media dell'espressione del gene analizzato nei pazienti ALMS è espressa rispetto alla media dei controlli posta uguale a 1.

GGTC gene trap

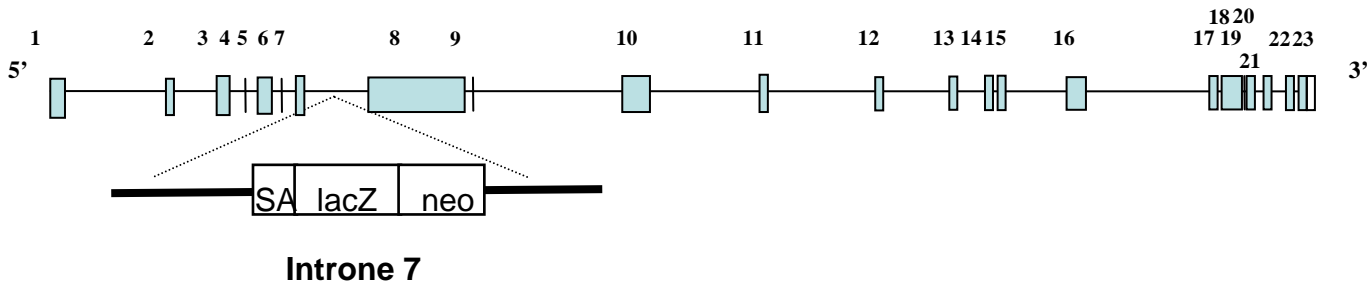


FIGURA 10

Schema dell'inserzione della mutazione nel gene *Alms1*. La cassetta che determina la rottura del gene nell'introne 7, porta un reporter gene (*lacZ*).

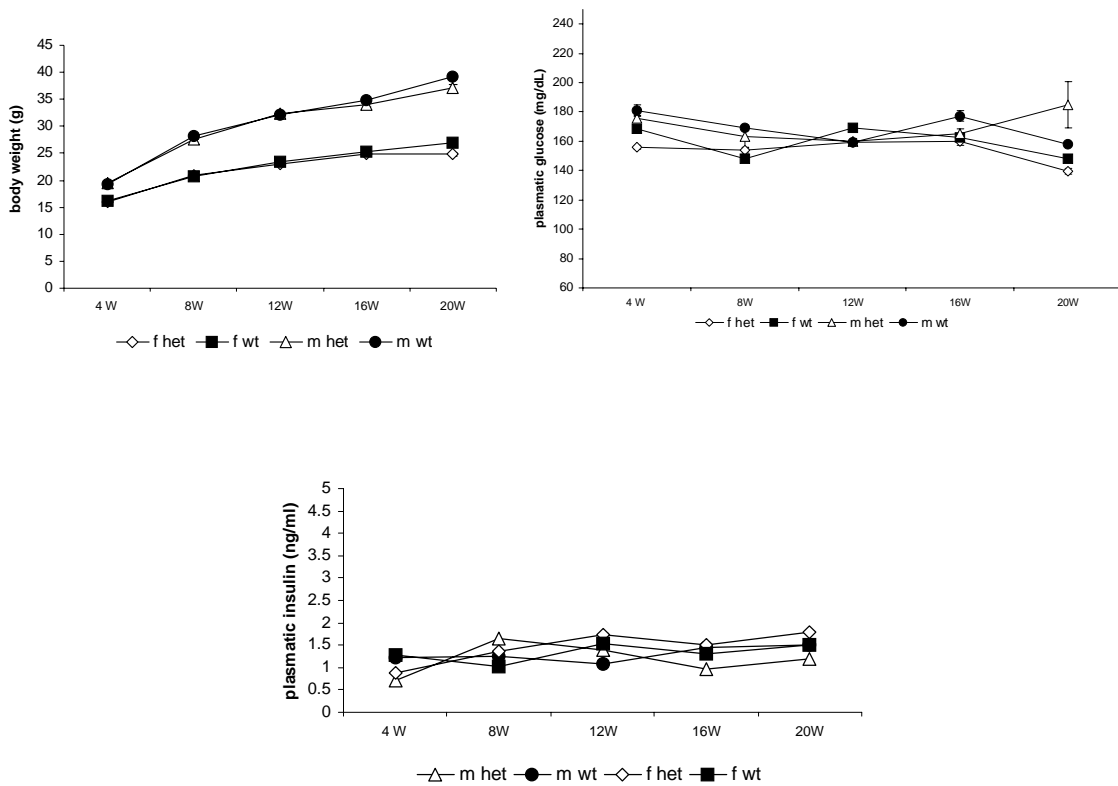
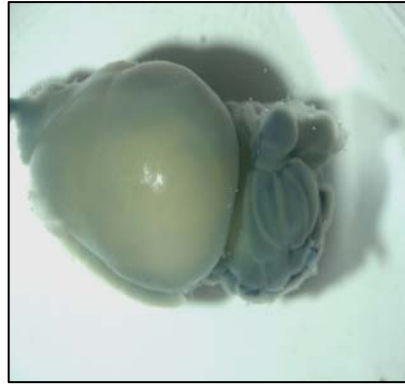
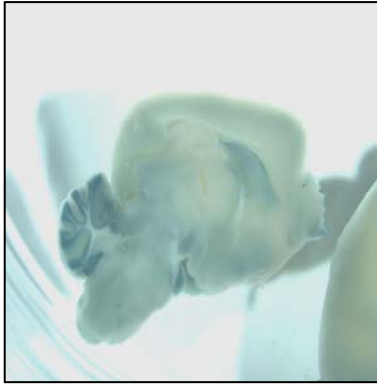


FIGURA 11

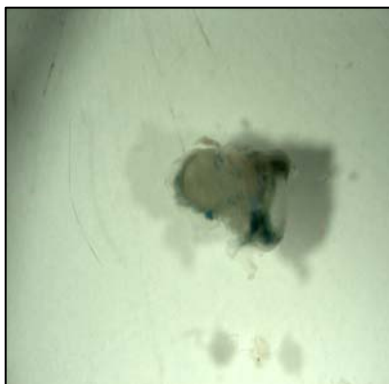
Caratterizzazione dei parametri biochimici relativi alla generazione N1F2 per individui wild type ed eterozigoti.



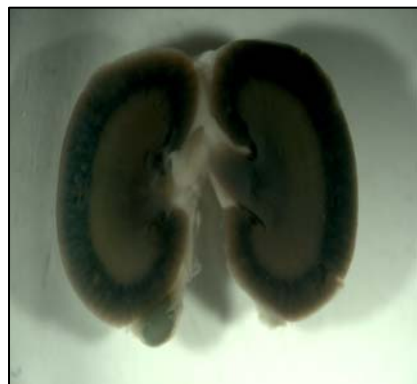
CEREBELLUM



TESTIS



EAR



KIDNEY

FIGURA 12

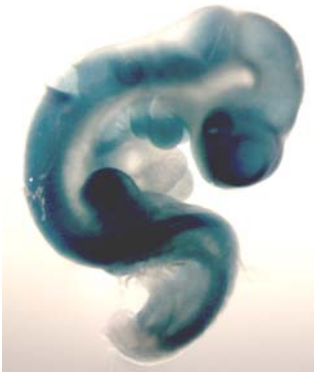
Espressione dell'attività beta- galattosidasi di lacZ in un individuo adulto eterozigote verificata mediante Xgal staining.



**7.5
days**



**8.5
days**



9.5 days



12.5 days

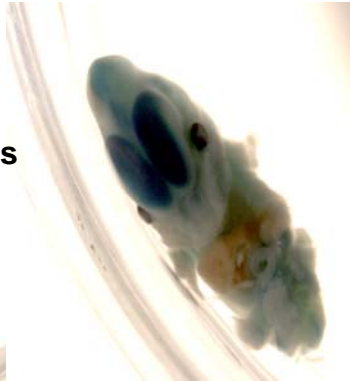


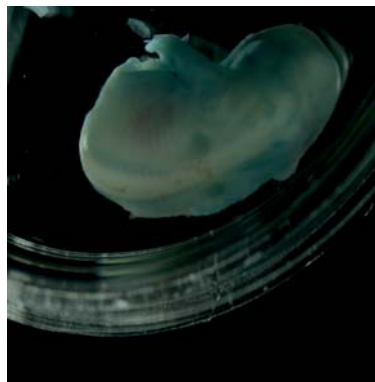
FIGURA 13a



14.5 days



15.5 days



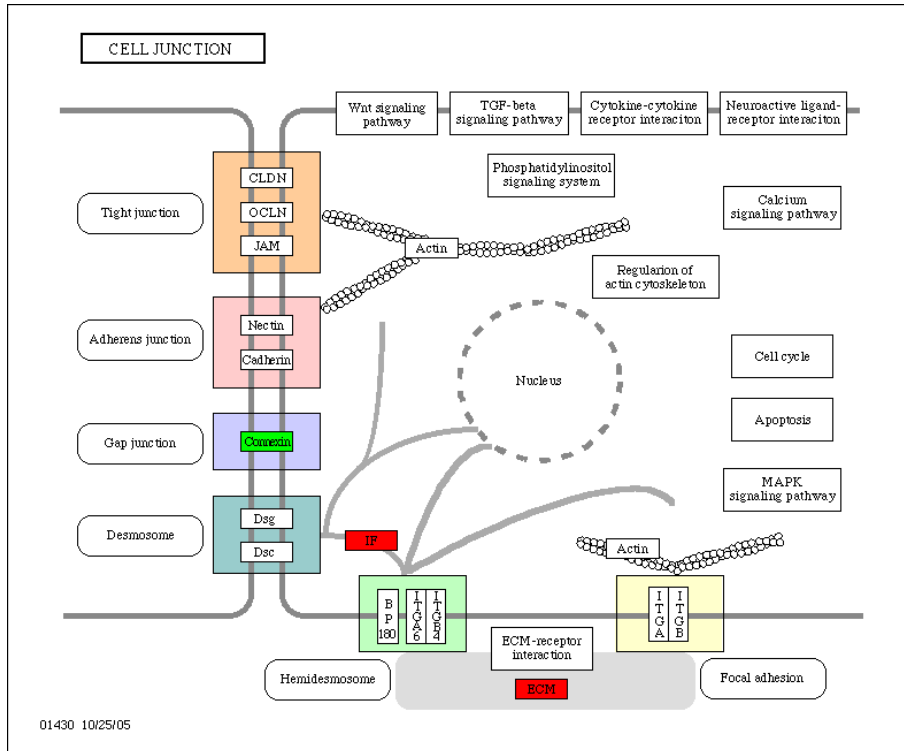
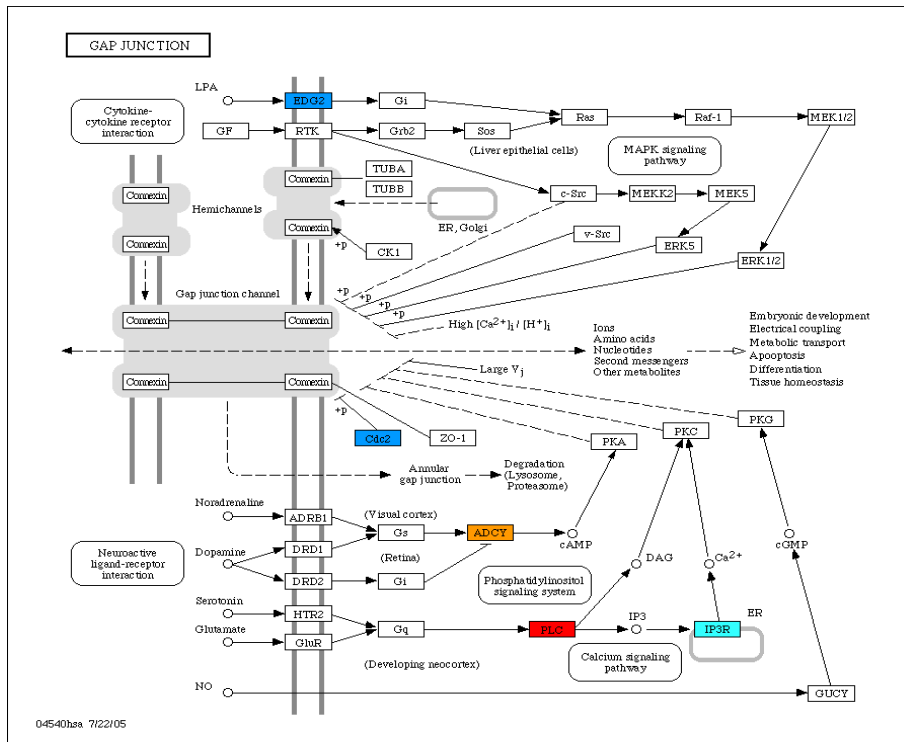
FUGURA 13b

FIGURA 13 a e b

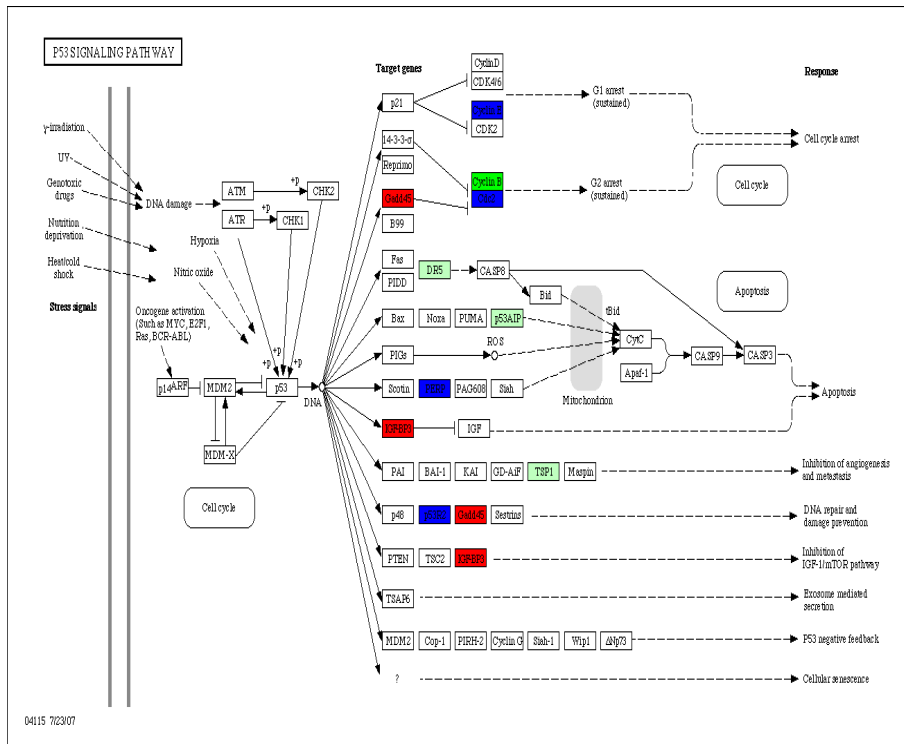
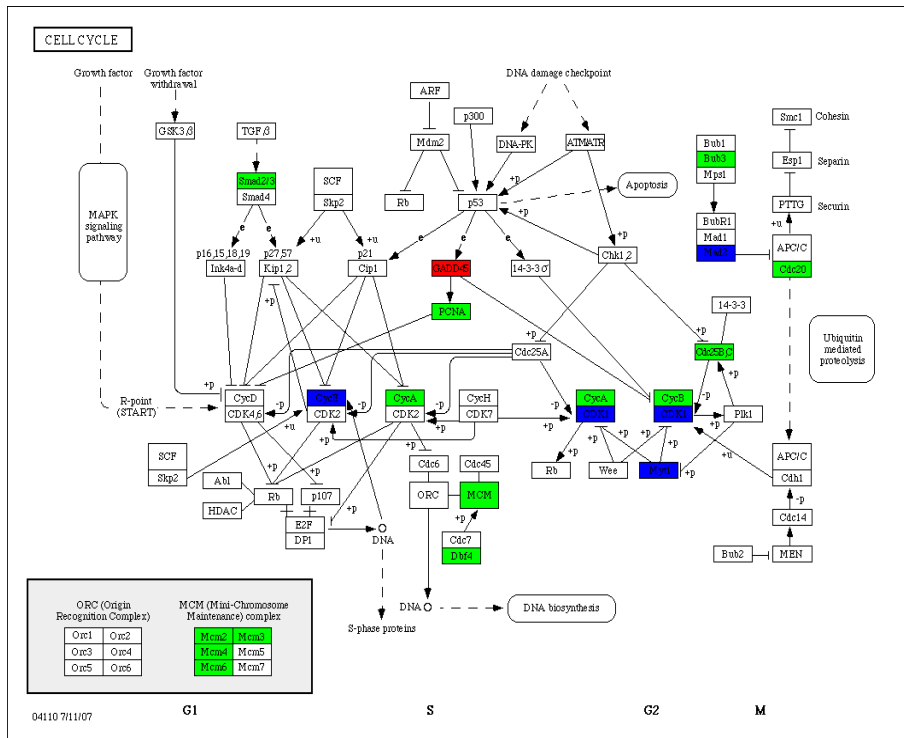
Espressione dell'attività beta- galattosidasica di lacZ in embrioni (7.5-15.5 giorni), visualizzata mediante Xgal staining.

APPENDICE 2

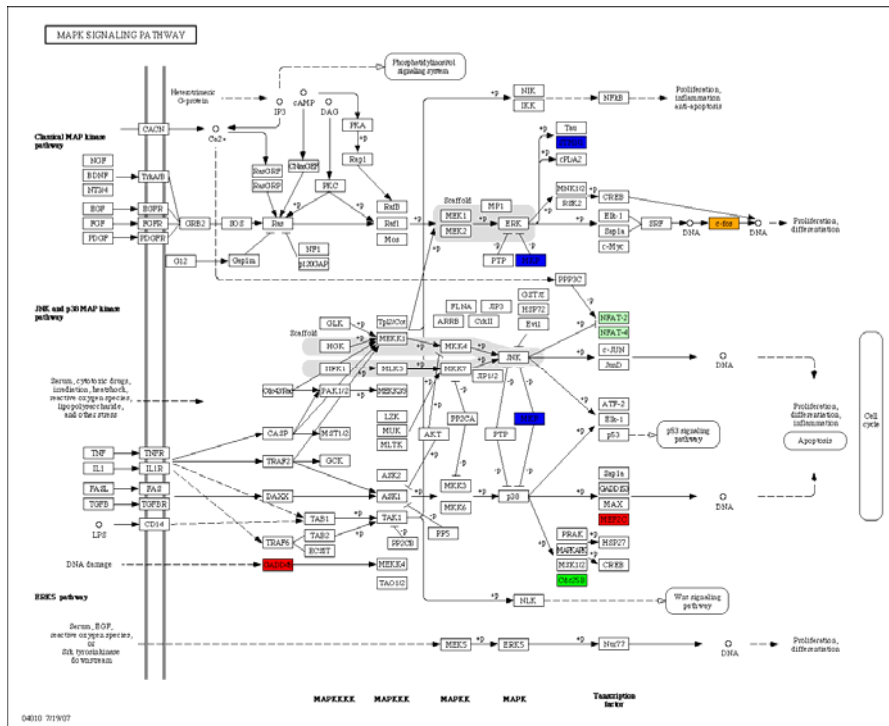
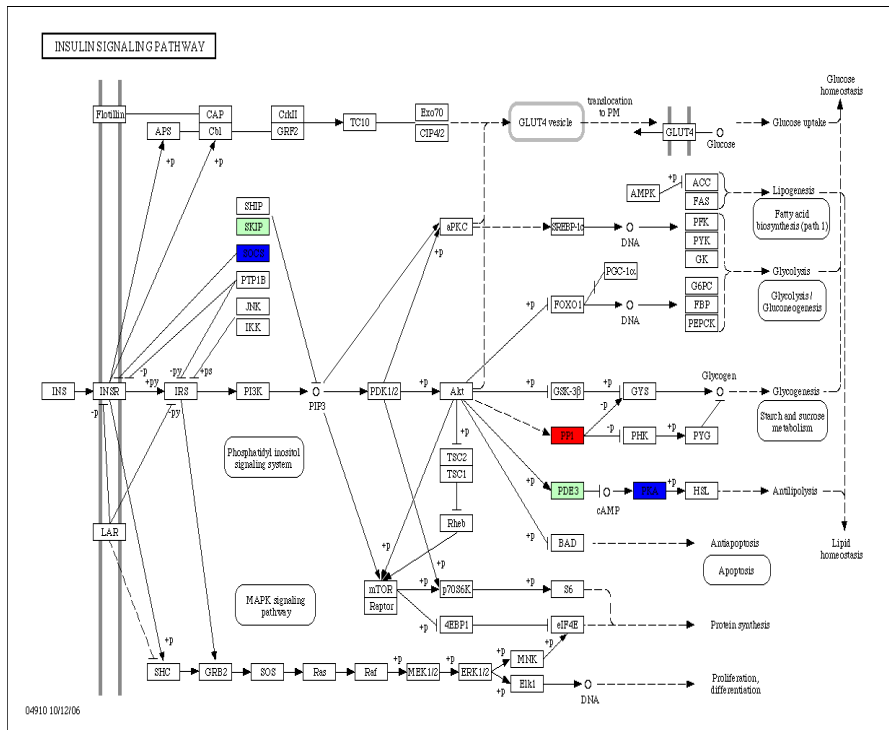
KEGG PATHWAYS



Pathway cellulari modulate in un esperimento di DNA microarray



Pathway cellulari modulati in un esperimento di DNA microarray



Pathway cellulari modulati in un esperimento di DNA microarray

Tabella 1A

gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Annealing Temperatur e (°C)	N. of cycle	Expected Product (bp)
P2X1 ³	TTCAGGTTTGCCAGGCACTTT	CCCCAAAGATGCCAATTCCA	59	40	160
P2X2 ³	GGTGCATCGGGGTCATTAT	ACCTGAAGTTGTAGCCGTACGA	56	40	130
P2X3 ³	CACCTATGAGACCACCAAGTCG	CGTCACGTAATCAGACACATCC	59	40	222
P2X4 ¹	TGTGATACCAGCTCAGGAGGAAAAC	GCATCATAAATGCACGACTTGAGGT	66	35	396
P2X5 ¹	CTTCTCCAAAAGCAATGTGATGGAC	GATGAGTACCAGGTCGCAGAAGAAA	65	39	406
P2X7 ¹	TGATAAAAGTCTTCGGGATCCGTTT	CCTGGACAAATCTGTGAAGTCCATC	65	39	398
P2Y1 ¹	ATGTGTGCTTTCAATGACAGGGTTT	TGTGGATGTGGGCATTTCTACTTCT	66	38	399
P2Y2 ¹	GTGTGCATTCATGAGTGAGGAACC	ATCAGACACAGCCAGGTGGAACATA	68	40	313
P2Y4 ²	CCACCTGGCATTGTCAGACACC	GAGTGACCAGGCAGGCACGC	61	38	425
P2Y6 ²	CGCTTCCTCTTCTTGCCAACC	CCATCCTGGCGGCACAGGCGGC	62	36	365
P2Y11 ¹	CTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCTG	CCATGTAGAGTAGAGGGTGGACACA	70	39	365
P2Y12 ¹	CATTCAAACCCTCCAGAATCAACAG	CGATCGATAGTTATCAGTCCCAGGAA	68	36	413
P2Y13 ³	AAAAAACTTTGGTGGCCGACTT	ACAGCACGATGCCACATACAT	58	37	154
P2Y14 ³	CACTTCAAGACGACAAACG	GAATATCCATCCTGACACTCC	60	38	108

1) Hanley PJ, Musset B, Renigunta V, Limberg SH, Dalpke AH, Sus R, Heeg KM, Preisig-Muller R, Daut J.

2) Govindaraju et al 2005 3) Primer Express

Tabella 1B

gene	Forward	Reverse	Cycling conditions	[primers] _r nM	Expected Size Product (bp)
P2Y6 ³	TGCCTCCCTGAACATAGGAAA	CTTGAAGTTCTCGCGGTAGACA	95°Cx15'' 55°Cx30'' 72°Cx30''	900	110
P2Y12 ³	TTTGCCCGAATTCCTTACAC	ATTGGGGCACTTCAGCATAC	95°Cx15'' 56°Cx30'' 72°Cx30''	900	192
P2Y14 ³	CACTTCAAGACGACAAACG	ACAGCACGATGCCACATACAT	95°Cx15'' 60°Cx60''	300	108
18S ³	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	95°Cx15'' 60°Cx60''	300F/50R	187
HMBS ³	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC	95°Cx15'' 60°Cx60''	300	80

Tabella 2

FRAMMENTO	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
1	AGTCAGGGCTCTCCCCTTC	AGCGGGTGCTGAGATACT
2	TCTCTGGAGGAGGGCATATT	CCAATGTCTGAATCAACAGGA
3	ACTGTGCCAAAGGCTCCTAA	TGTCTGCTAAGTCTGTGGGTA
4a	AGTTTCAGCCACTCCTGGAC	TTGGGACAGTCTTCTGGTCA
4b	TATTGGCTGCCAGAAGACT	CTAGGCTTCTCCCTCTGTGG
5	GACCAGAAGACTGTCCCAACA	CCGCTGAAACATTCTTAGCC
6	GAAAGTTTCACCTGTTCTTG	TGGTCCAGGAGCAGAAGAA
7	GAGCAAAGTCTGGCAGTTTC	AGGGCAGGATGTTTATTCCA
8	CGAGAGTTGCCGCATTTT	GCTGTTGGTAATACTGTTTTCTGG
9	CAGGAATTGCCAGGTAGTCA	TACTGTCCCACGAGCAGGA
10	CCACGGGTGTATCTAATGGTG	AGGTTGACATGCTTGGCTCT
11	TCCAAGGGTTTACAGAGTCCA	TTGCTACAATTTGCCCTGGT
12	GGAGCATCTGTGGGGGTATT	TGGAAGAAGTCTTGGGACAAA
13	GCATCTGCATCTACTCCTCCTT	CTGAGGCATCTGCATTTTCA
14	ACTTCCCAGCTCAGGTGCTA	CCTTCTGATCCCTTTGTGGA
15	TCAGCATCATCCAGACAAACA	TGCTCCGCTTCTCAAGGTAT
16	GGCTCTGCACGAAAGGAGTA	AGGGTTGCTCTCACAAATGG
17	CCAGGTAGCAAACCATGTGA	TTCCAAGGCTCTGAGGAAAA
18	CAAGCCTATCAGCAAGAAGGA	GCAGAAAGTATTGCTCCCAAA

Primers per effettuare la PCR sul cDNA in pazienti ALMS

Tabella 3

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	AT (C°)	[primers]_f nM
COL1A1	CCTGGATGCCATCAAAGTCT	TCTTGTCTTGGGGTTCTTG	60	300
COL3A1	AAGAATTTGGTGTGGACGTTG	CTCCCCTTTGATGATGTCGT	60	300
COL4A1	CCAGGATTTCAAGGTCCAAA	GGCTCCTTCCCTCTGTTCTC	60	300
COL5A1	CCTGACCCTGGACAGTGAAG	CCTGACCCTGGACAGTGAAG	60	300
COL5A2	TCAAAAGAAGCCTCCCAGAA	TCTAAGTCATTTGCCCTTTG	60	300
COL8A1	ACCACCCCAGGGAGAGTATC	AATGCAGGCATCTCATAGGC	60	300
COL11A1	GCATTTTGATGCTTTATTCAAGG	CACACATTTCCCTGTCCAAA	60	300
COL12A1	ACATGCCGTGTGCCTTTAGT	AACTGCCCGCTCGAAATAC	60	300
COL15A1	AGCAACCCACATCAGCTTCT	ATGCTCGGTAGGTGGACAAC	60	300
FGF13	TGTCGGGGCAAACAAAATTA	CGCAAAAAGTCAATAGAACCA	56	300
FGFR2	GTTGGAGACGCCTGTTAGGA	GAGGCTGGATCTTTTGGTGA	58	300

Primers per la validazione di esperimenti di DNA microarray

TABELLA 5

GB accession ID	UniGene ID	Gene Symbol	Description	log2ratio	SAM Score (d)
NM_006475	136348	POSTN	Osteoblastspecificfactor2(fasciclinI-like)	4.12	11.8
NM_001884	2799	HAPLN1	Cartilagelinkingprotein1	3.35	13.53
NM_017680	10760	ASPN	Asporin(LRRclass1)	3.15	10.9
NM_002725	76494	PRELP	Prolinearginine-richendleucine-richrepeatprotein	2.81	4.54
NM_004098	202095	EMX2	Emptyspiraclehomolog2(Drosophila)	2.51	15.83
NM_033256	348037	PPP1R14A	Proteinphosphatase1,regulatory(inhibitor)subunit14A	2.33	6.47
NM_014621	278255	HOXD4	HomeoboxD4	2.32	8.53
NM_018490	160271	LGR4	Gprotein-coupledreceptor48	2.25	8.08
NM_005711	129764	EDIL3	EGF-likepeatsanddiscoidinI-like domains3	2.15	4.7
AL359062	41271	COL8A1	HomosapiensmRNAfulllengthinsertcDNAcloneEUROIMAGE1913076	2.13	6.84
NM_001854	82772	COL11A1	Collagen,typeXI,alpha1	2.07	4.21
BC013438	42792	LOC375295	Homosapiens,cloneIMAGE:3899073,mRNA,partialc ds	2.05	15.95
NM_001850	114599	COL8A1	Collagen,typeVIII,alpha1	2.05	5.79
AF156100	334485	FBLN6	Fibulin6	1.96	4.68
AK026966	10862	AK3L2	HomosapienscDNA:FLJ23313fis,cloneHEP11919	1.95	4.84
		AK3L1			
BC012625	303090	PPP1R3C	Proteinphosphatase1,regulatory(inhibitor)subunit3C	1.87	13.54
AK021484	31412	SYNPO2	HomosapienscDNAFLJ11422fis,cloneHEMBA1001008	1.86	6.19
NM_014583	279943	LMCD1	LIMandcysteine-richdomains1	1.8	5.86
AB032953	173560	ODZ2	OddOz/ten-mhomolog2(Drosophila,mouse)	1.79	11.63
NM_003480	300946	MFAP5	Microfibril-associatedglycoprotein-2	1.79	5.14
AK026920	39871	MYO1D	MyosinID	1.77	5.26
NM_001822	169965	CHN1	Chimerin(chimaerin)1	1.67	11.51
NM_006472	179526	TXNIP	Thioredoxininteractingprotein	1.66	5.52
AL137734	149356	DKFZp586C0721	HomosapiensmRNA;cDNADKFZp586C0721(fromcloneDKFZp586C0721);partialc ds	1.63	6.61
AB018289	49500	KIAA0746	KIAA0746protein	1.59	9.72
AK022198	168830	GALNT5	HomosapienscDNAFLJ12136fis,cloneMAMMA1000312	1.54	9.09
AF109681	256297	ITGA11	Integrin,alpha11	1.5	6.19
L08895	78995	MEF2C	MADSboxtranscriptionenhancerfactor2, polypeptideC(myocyteenhancerfactor2C)	1.5	5.04
NM_012413	79033	QPCT	Glutaminyl-peptidocyclotransferase(glutaminylcyclase)	1.47	5.53
NM_004791	82582	ITGBL1	Integrin,beta-like1(withEGF-like repeatdomains)	1.46	6.4

NM_004772	142827	C5orf13	P311protein	1.41	5.21
NM_003474	8850	ADAM12	Adisintegrinandmetallopeptidase domain12(meltrinalpha)	1.36	6.61
U16306	81800	CSPG2	Chondroitinsulfateproteoglycan2(versican)	1.35	6.73
NM_000393	82985	COL5A2	Collagen,typeV,alpha2	1.34	6.39
AB029000	70823	SULF1	KIAA1077protein	1.32	7.96
NM_015675	110571	GADD45B	GrowtharrestandDNA-damage-inducible,beta	1.27	11.83
NM_012197	55099	RABGAP1	Rab6GTPaseactivatingprotein(GAPandcentrosome-associated)	1.24	5.13
NM_003713	173717	PPAP2B	Phosphatidicacidphosphatase type2B	1.15	5.48
NM_015833	85302	ADARB1	Adenosinedeaminase,RNA-specific,B1(RED1homolograt)	1.13	6.77
NM_003141	1042	TRIM21	Sjogrens syndrome antigen A1(52kD,ribonucleoprotein autoantigen SS-A/Ro)	1.12	5.53
NM_005264	105445	GFRA1	GDNFfamilyreceptor alpha1	1.11	5.48
NM_005576	65436	LOXL1	Lysyloxidase-like1	1.11	4.55
AF119905	6975	-	PRO1073protein	1.11	3.87
NM_000093	146428	COL5A1	Collagen,typeV,alpha1	1.1	9.58
NM_003186	75777	TAGLN	Transgelin	1.1	5.38
NM_005556	23881	KRT7	Keratin7	1.1	5.23
NM_054012	160786	ASS	Argininosuccinatesynthetase	1.09	4.71
NM_000090	119571	COL3A1	Collagen,typeIII,alpha1(Ehlers-DanlossyndrometypeIV,autosomaldominant)	1.08	9.18
NM_000088	172928	COL1A1	Collagen,typeI,alpha1	1.08	6.89
NM_005328	159226	HAS2	Hyaluronansynthase2	1.04	5.72
NM_020353	182538	PLSCR4	Phospholipidscramblase4	1.04	3.74
NM_004370	101302	COL12A1	Collagen,typeXII,alpha1	1.01	3.9
NM_007173	25338	PRSS23	Protease,serine,23	1	5.86
NM_001845	119129	COL4A1	Collagen,typeIV,alpha1	1	4.29
AK027647	1098	DNAJC10	DKFZp434J1813protein	0.99	6.78
NM_000917	76768	P4HA1	Procollagen-proline,2-oxoglutarate4-dioxygenase(proline4-hydroxylase),alphapolypeptidel	0.99	5.41
NM_006209	174185	ENPP2	Ectonucleotidepyrophosphatase/phosphodiesterase2(autotaxin)	0.98	4.81
AK021543	135159	DNM3	HomosapienscDNAFLJ11481fis,cloneHEMBA1001803	0.98	4.22
BC001619	169517	ALDH1B1	Aldehydedehydrogenase1family,memberB1	0.97	6.88
NM_014217	202696	KCNK2	Potassiumchannel,subfamilyK,member2(TREK-1)	0.97	6.41
NM_001901	75511	CTGF	Connectivetissuegrowthfactor	0.95	5.73
NM_032943	92254	SYTL2	Synaptotagmin-like2	0.95	3.74
NM_017526	23581	LEPROT	Leptinreceptorgene-relatedprotein	0.92	4.88
NM_005545	102171	ISLR	Immunoglobulinsuperfamilycontainingleucine-richrepeat	0.92	4.05
NM_023927	235445	NS3TP2	HypotheticalproteinFLJ21313	0.9	5.54

NM_018950	110309	HLA-F	Majorhistocompatibilitycomplex,classI,F	0.89	5.87
NM_001553	119206	IGFBP7	Insulin-likegrowthfactorbindingprotein7	0.89	5.68
AL359052	311054	-	HomosapiensmRNAfulllengthinsertcDNAcloneEUROIMAGE1968422	0.89	3.73
NM_002213	149846	ITGB5	Integrin,beta5	0.88	6.13
NM_002826	77266	QSCN6	QuiescinQ6	0.87	5.42
M12679	274485	HLA-C	Cw1antigen	0.86	4.63
AL136805	278436	ZNF537	KIAA1474protein	0.86	4.51
NM_001864	114346	COX7A1	CytochromecoxidasesubunitVIIapolypeptide1(muscle)	0.85	4.34
NM_001613	195851	ACTA2	Actin,alpha2,smoothmuscle,aorta	0.82	5.21
NM_001541	78846	HSPB2	Heatshock27kDprotein2	0.81	4.88
J04621	1501	SDC2	Syndecan2(heparansulfateproteoglycan1,cellsurface-associated,firoglycan)	0.81	4.83
NM_004512	64310	IL11RA	Interleukin11receptor,alpha	0.8	5.18
NM_013352	58636	SART2	SquamoucellcarcinomaantigenrecognizedbyTcell	0.8	4.82
M35878	77326	IGFBP3	Insulin-likegrowthfactorbindingprotein3	0.8	3.99
BC010607	104679	MGC18216	Homosapiens,cloneMGC:18216IMAGE:4156235,mRNA,completecds	0.79	6.38
NM_017635	343877	SUV420H1	HypotheticalproteinFLJ20039	0.79	6.24
NM_002116	181244	HLA-A	Majorhistocompatibilitycomplex,classI,A	0.78	3.86
NM_002127	73885	HLA-G	HLA-Ghistocompatibilityantigen,classI,G	0.77	6.64
NM_022356	10114	LEPRE1	Growthsuppressor1	0.77	5.93
NM_000022	1217	ADA	Adenosinedeaminase	0.76	4.35
NM_031442	8769	TMEM47	Braincellmembraneprotein1	0.76	4.19
NM_000820	78501	GAS6	Growtharrest-specific6	0.76	4.04
AK057328	9973	TNS	HomosapienscDNAFLJ32766fis,cloneTESTI2001862	0.75	4.96
NM_002345	79914	LUM	Lumican	0.74	3.98
NM_001497	198248	B4GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAcbeta1,4-galactosyltransferase,polypeptide1	0.74	3.84
NM_006482	173135	DYRK2	Dual-specificitytyrosine-(Y)-phosphorylationregulatedkinase2	0.73	4.03
NM_005567	79339	LGALS3BP	Lectin,galactoside-binding,soluble,3bindingprotein	0.72	5.43
L38486	296049	MFAP4	Microfibrillar-associatedprotein4	0.71	4.81
NM_002821	90572	PTK7	PTK7proteintyrosinekinase7	0.71	4.76
NM_001451	155591	FOXF1	ForkheadboxF1	-3	-7.37
BC013592	107515	DDIT4L	Homosapiens,SimilartoRIKENcDNA1700037B15gene,cloneMGC:9960IMAGE:3877854,mRNA,completecd	-2.02	-7.54
NM_002736	77439	PRKAR2B	Proteinkinase,cAMP-dependent,regulatory,typell,beta	-2.02	-8.38
NM_031957	307030	KRTAP1-5	Keratinassociatedprotein1.5	-2.02	-9.56
NM_002276	182265	KRT19	Keratin19	-1.94	-10.91

NM_031453	103378	C10orf45	HypotheticalproteinMGC11034	-1.87	-8.92
NM_003702	99236	RGS20	RegulatorofG-proteinsignalling20	-1.63	-6.49
NM_000224	65114	KRT18	Keratin18	-1.48	-6.9
NM_001034	75319	RRM2	RibonucleotidereductaseM2polypeptide	-1.42	-8.66
NM_014900	300855	COBLL1	KIAA0977protein	-1.41	-5.65
NM_017723	169758	FLJ20245	HypotheticalproteinFLJ20245	-1.36	-4.96
NM_003877	110776	SOCS2	STATinducedSTATinhibitor-2	-1.34	-6.23
NM_001449	239069	FHL1	FourandahalfLIMdomains1	-1.33	-7.91
NM_006021	43628	DLEU2	Deletedinlymphocyticleukemia,2	-1.32	-5.3
NM_007029	90005	STMN2	Stathmin-like2	-1.3	-5.24
BC017085	8254	TDE2L	Homosapiens,cloneMGC:9709IMAGE:3850147,mRNA,completecds	-1.29	-11.72
NM_004864	296638	GDF15	Prostatedifferentiationfactor	-1.27	-5.56
NM_004750	114948	CRLF1	Cytokinereceptor-likefactor1	-1.21	-5.57
NM_032623	154140	OSAP	Ovary-specificacidicprotein	-1.17	-3.66
AF278532	102541	NTN4	Netrin4	-1.16	-4
NM_022121	303125	PERP	P53-inducedproteinPIGPC1	-1.14	-6.2
AC004010	121520	AMIGO2	Homosapiens,cloneIMAGE:3625286,mRNA,partialcds	-1.11	-6.11
NM_012242	40499	DKK1	Dickkopfhomolog1(Xenopuslaevis)	-1.09	-5.63
NM_057159	75794	EDG2	Endothelialdifferentiation,lysophosphatidicacidG-protein-coupledreceptor,2	-1.08	-4.97
NM_001935	44926	DPP4	DipeptidylpeptidaseIV(CD26,adenosinedeaminasecomplexingprotein2)	-1.08	-5.93
AF155827	203963	HELLS	Helicase,lymphoid-specific	-1.08	-7.45
AF047033	132904	SLC4A7	Solutecarrierfamily4,sodiumbicarbonatecotransporter,member7	-1.04	-3.63
AB046781	49753	UACA	Uvealautoantigenwithcoiled-coildomainsandankyrinrepeats	-1.03	-5.61
U11058	89463	KCNMA1	Potassiumlargeconductancecalcium-activatedchannel,subfamilyM,alphamember1	-1.03	-6.48
NM_006823	75209	PKIA	Proteinkinase(cAMP-dependent,catalytic)inhibitoralpha	-1.02	-3.62
NM_006528	295944	TFPI2	Tissuefactorpathwayinhibitor2	-0.99	-7.06
NM_020675	21137	SPBC25	AD024protein	-0.98	-3.88
AB067514	351355	SSFA2	Sperm-specificantigen2	-0.98	-4.76
NM_002185	237868	IL7R	Interleukin7receptor	-0.98	-5.72
NM_032579	307047	RETNLB	Colonandsmallintestine-specificcysteine-richproteinprecursorsimilartoFIZZ2/resistin-likepr	-0.97	-5.16
NM_012080	78991	HDHD1A	DNAssegment,numerouscopies,expressedprobes(GS1gene)	-0.96	-6.28
AK055903	5921	KITLG	HomosapienscDNA:FLJ21592fis,cloneCOL07036	-0.94	-3.88
L21934	14553	SOAT1	SterolO-acyltransferase(acyl-CoenzymeA:cholesterolacyltransferase)1	-0.94	-4.02
NM_001827	83758	CKS2	CDC28proteinkinase2	-0.94	-6.16
NM_002923	78944	RGS2	RegulatorofG-proteinsignalling2,24kD	-0.94	-6.22

AB067500	172870	KIAA1913	KIAA1913protein	-0.93	-4.03
NM_057749	30464	CCNE2	CyclinE2	-0.92	-4.84
NM_000647	395	CCR2	Chemokine(C-Cmotif)receptor2	-0.92	-5.59
NM_018492	104741	PBK	T-LAKcell-originatedprotein kinase	-0.91	-4.74
BC016658	144687	E2F7	Homosapiens,Similartogrowthaccentuatingprotein43,cloneIMAGE:3923850,mRNA,partialcdds	-0.9	-4.96
NM_001889	83114	CRYZ	Crystallin,zeta(quinonereductase)	-0.9	-5.85
NM_005261	79022	GEM	GTPbindingproteinoverexpressedinskeletalmuscle	-0.89	-3.53
NM_002916	35120	RFC4	ReplicationfactorC(activator1)4(37kD)	-0.89	-3.89
NM_006479	24596	RAD51AP1	RAD51-interactingprotein	-0.89	-5.09
NM_003158	333116	STK6	Serine/threoninekinase6	-0.89	-6.29
NM_002358	79078	MAD2L1	MAD2mitoticarrestdeficient-like1(yeast)	-0.88	-4.39
NM_018719	351623	RAM2	HypotheticalproteinDKFZp762L0311	-0.87	-3.99
NM_001786	334562	CDC2	Celldivisioncycle2,G1toSandG2toM	-0.86	-3.72
NM_001769	1244	CD9	CD9antigen(p24)	-0.86	-4.25
NM_018112	279610	TMEM38B	HypotheticalproteinFLJ10493	-0.86	-4.54
AK021789	118208	C16orf52	HomosapienscDNAFLJ11727fis,cloneHEMBA1005374	-0.86	-5.34
NM_004203	77783	PKMYT1	Membrane-associatedtyrosine-andthreonine-specificcdc2-inhibitorykinase	-0.86	-5.45
AF220656	82101	PHLDA1	Pleckstrinhomology-likedomain,familyA,member1	-0.86	-5.53
NM_005746	239138	PBEF1	Pre-B-cellcolony-enhancingfactor	-0.85	-4.53
NM_018101	48855	CDCA8	HypotheticalproteinFLJ10468	-0.85	-5.01
NM_005563	250811	STMN1	Stathmin1/oncoprotein18	-0.84	-4.96
NM_014736	81892	KIAA0101	KIAA0101geneproduct	-0.84	-6.18
NM_018440	266175	PAG	Phosphoproteinassociatedwithglycosphingolipid-enrichedmicrodomains	-0.83	-3.87
BC015050	116206	OIP5	Opa-interactingprotein5	-0.83	-4.53
NM_004815	70983	PARG1	PTPL1-associatedRhoGAP1	-0.82	-3.64
NM_001353	306098	AKR1C1	Aldo-ketoreductasefamily1,memberC1(dihydrodioldehydrogenase1;20-alpha(3-alpha)-hydroxyster	-0.82	-4.11
NM_014109	46677	ATAD2	PRO2000protein	-0.82	-4.31
NM_001452	44481	FOXF2	ForkheadboxF2	-0.82	-4.38
AB037771	101799	USP53	KIAA1350protein	-0.81	-4.4
NM_016048	11085	ISOC1	CGI-111protein	-0.79	-5.58
NM_012124	22857	CHORDC1	Cysteineandhistidine-richdomain(CHORD)-containing,zincbindingprotein1	-0.78	-3.97
NM_024911	250746	C1orf139	HypotheticalproteinFLJ23091	-0.78	-5.19
NM_017718	21126	DOCK10	HypotheticalproteinFLJ20220	-0.78	-6.21
AK024217	227280	LSM5	U6snRNA-associatedSm-likeprotein	-0.77	-3.95
AF070524	13410	CNIH3	Homosapiensclone24453mRNAsequence	-0.77	-4.71

AL390172	317432	BCAT1	HomosapienscDNA:FLJ21270fis,cloneCOL01749	-0.76	-3.9
AL390079	26765	LOC58489	HypotheticalproteinfromEUROIMAGE588495	-0.76	-4.36
NM_015957	104058	APIP	CGI-29protein	-0.75	-3.75
NM_002915	115474	RFC3	ReplicationfactorC(activator1)3(38kD)	-0.75	-4.84
AK055793	70704	C20orf129	Chromosome20openreadingframe129	-0.74	-3.99
NM_005192	84113	CDKN3	Cyclin-dependentkinaseinhibitor3(CDK2-associateddualspecificityphosphatase)	-0.74	-4.45
NM_032565	298490	EBPL	Emopamilbindingrelatedprotein,delta8-delta7sterolisomeraserelatedprotein	-0.74	-6.2
NM_006644	36927	HSPH1	Heatshock105kD	-0.73	-3.62
NM_001677	78629	ATP1B1	ATPase,Na+/K+transporting,beta1polypeptide	-0.73	-3.67
NM_001946	180383	DUSP6	Dualspecificityphosphatase6	-0.73	-3.84
NM_018131	14559	C10orf3	HypotheticalproteinFLJ10540	-0.73	-4.34
NM_024053	208912	C22orf18	HypotheticalproteinMGC861	-0.73	-4.44
AJ420528	34665	DCBLD1	HomosapiensmRNAfulllengthinsertcDNAcloneEUROIMAGE2098341	-0.72	-4.21
NM_002106	119192	H2AFZ	H2Ahistonefamily,memberZ	-0.72	-5.49
NM_002882	24763	RANBP1	RANbindingprotein1	-0.72	-5.59
NM_006597	180414	HSPA8	Heatshock70kDprotein8	-0.71	-3.81
NM_012145	79006	DTYMK	Deoxythymidylatekinase(thymidylatekinase)	-0.71	-5.36
NM_004811	49587	LPXN	Leupaxin	-0.7	-4.42
NM_006463	12479	STAMPB	AssociatedmoleculewiththeSH3domainofSTAM	-0.7	-5.9
NM_003600	250822	STK6	Serine/threoninekinase15	-0.7	-6.53

TABELLA 6

Citrate cycle (TCA cycle)

- 1431 CS; citrate synthase [EC:2.3.3.1] [SP:CISY_HUMAN]
- 2271 FH; fumarate hydratase [EC:4.2.1.2] [SP:FUMH_HUMAN]
- 3419 IDH3A; isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha [EC:1.1.1.41] [SP:IDH3A_HUMAN]

Fructose and mannose metabolism

- 2683 B4GALT1, GGTB2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 [EC:2.4.1.- 2.4.1.22 2.4.1.90 2.4.1.38] [SP:B4GT1_HUMAN]
- 55276 PGM2; phosphoglucomutase 2 [EC:5.4.2.8]
- 8707 B3GALT2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2 [EC:2.4.1.-]

Urea cycle and metabolism of amino groups

- 435 ASL; argininosuccinate lyase [EC:4.3.2.1] [SP:ARLY_HUMAN]
- 445 ASS; argininosuccinate synthetase [EC:6.3.4.5] [SP:ASSY_HUMAN]
- 4953 ODC1; ornithine decarboxylase 1 [EC:4.1.1.17] [SP:DCOR_HUMAN]

Purine metabolism

- 100 ADA; adenosine deaminase [EC:3.5.4.4] [SP:ADA_HUMAN]
- 113 ADCY7; adenylate cyclase 7 [EC:4.6.1.1] [SP:ADCY7_HUMAN]
- 205 AK3; adenylate kinase 3 [EC:2.7.4.3] [SP:KAD4_HUMAN]
- 3614 IMPDH1; IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1 [EC:1.1.1.205] [SP:IMDH1_HUMAN]
- 5168 ENPP2; ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin) [EC:3.1.4.1 3.6.1.9]
- 51728 POLR3K; polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa [EC:2.7.7.6] [SP:RPC11_HUMAN]
- 5557 PRIM1; primase, polypeptide 1, 49kDa [EC:2.7.7.-] [SP:PRI1_HUMAN]
- 5558 PRIM2A; primase, polypeptide 2A, 58kDa [EC:2.7.7.-] [SP:PRI2_HUMAN]
- 57804 POLD4; polymerase (DNA-directed), delta 4 [EC:2.7.7.7] [SP:DPOD4_HUMAN]
- 6240 RRM1; ribonucleotide reductase M1 polypeptide [EC:1.17.4.1] [SP:RIR1_HUMAN]
- 6241 RRM2; ribonucleotide reductase M2 polypeptide [EC:1.17.4.1] [SP:RIR2_HUMAN]

Pyrimidine metabolism

1841 DTYMK; deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase) [EC:2.7.4.9]
51728 POLR3K; polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa [EC:2.7.7.6] [SP:RPC11_HUMAN]
5557 PRIM1; primase, polypeptide 1, 49kDa [EC:2.7.7.-] [SP:PRI1_HUMAN]
5558 PRIM2A; primase, polypeptide 2A, 58kDa [EC:2.7.7.-] [SP:PRI2_HUMAN]
57804 POLD4; polymerase (DNA-directed), delta 4 [EC:2.7.7.7] [SP:DPOD4_HUMAN]
6240 RRM1; ribonucleotide reductase M1 polypeptide [EC:1.17.4.1] [SP:RIR1_HUMAN]
6241 RRM2; ribonucleotide reductase M2 polypeptide [EC:1.17.4.1] [SP:RIR2_HUMAN]
7083 TK1; thymidine kinase 1, soluble [EC:2.7.1.21] [SP:KITH_HUMAN]
7298 TYMS, TS; thymidylate synthetase [EC:2.1.1.45] [SP:TYSY_HUMAN]
790 CAD; carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase [EC:6.3.5.5 2.1.3.2 3.5.2.3] [SP:PYR1_HUMAN]

Glutamate metabolism

2806 GOT2; glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2) [EC:2.6.1.1] [SP:AATM_HUMAN]
790 CAD; carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase [EC:6.3.5.5 2.1.3.2 3.5.2.3] [SP:PYR1_HUMAN]

Alanine and aspartate metabolism

2806 GOT2; glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2) [EC:2.6.1.1] [SP:AATM_HUMAN]
435 ASL; argininosuccinate lyase [EC:4.3.2.1] [SP:ARLY_HUMAN]
445 ASS; argininosuccinate synthetase [EC:6.3.4.5] [SP:ASSY_HUMAN]
790 CAD; carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase [EC:6.3.5.5 2.1.3.2 3.5.2.3] [SP:PYR1_HUMAN]

Valine, leucine and isoleucine degradation

219 ALDH1B1; aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1 [EC:1.2.1.3] [SP:AL1B1_HUMAN]
51100 SH3GLB1; SH3-domain GRB2-like endophilin B1 [EC:2.3.1.-]
586 BCAT1; branched chain aminotransferase 1, cytosolic [EC:2.6.1.42 2.6.1.26] [SP:BCAT1_HUMAN]

Arginine and proline metabolism

219 ALDH1B1; aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1 [EC:1.2.1.3] [SP:AL1B1_HUMAN]

262 AMD1; adenosylmethionine decarboxylase 1 [EC:4.1.1.50] [SP:DCAM_HUMAN]
2806 GOT2; glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2) [EC:2.6.1.1] [SP:AATM_HUMAN]
4016 LOXL1; lysyl oxidase-like 1 [EC:1.4.3.-] [SP:LOXL1_HUMAN]
435 ASL; argininosuccinate lyase [EC:4.3.2.1] [SP:ARLY_HUMAN]
445 ASS; argininosuccinate synthetase [EC:6.3.4.5] [SP:ASSY_HUMAN]
4953 ODC1; ornithine decarboxylase 1 [EC:4.1.1.17] [SP:DCOR_HUMAN]
5033 P4HA1; procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I [EC:1.14.11.2]

N-Glycan biosynthesis

2683 B4GALT1, GGTB2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 [EC:2.4.1.- 2.4.1.22 2.4.1.90 2.4.1.38] [SP:B4GT1_HUMAN]
79053 ALG8; asparagine-linked glycosylation 8 homolog (yeast, alpha-1,3-glucosyltransferase) [EC:2.4.1.-] [SP:ALG8_HUMAN]
8707 B3GALT2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2 [EC:2.4.1.-]

O-Glycan biosynthesis

11227 GALNT5; UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5) [EC:2.4.1.41]
2683 B4GALT1, GGTB2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 [EC:2.4.1.- 2.4.1.22 2.4.1.90 2.4.1.38] [SP:B4GT1_HUMAN]
8707 B3GALT2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2 [EC:2.4.1.-]

High-mannose type N-glycan biosynthesis

2683 B4GALT1, GGTB2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 [EC:2.4.1.- 2.4.1.22 2.4.1.90 2.4.1.38] [SP:B4GT1_HUMAN]
8707 B3GALT2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2 [EC:2.4.1.-]

Glycerolipid metabolism

219 ALDH1B1; aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1 [EC:1.2.1.3] [SP:AL1B1_HUMAN]
2683 B4GALT1, GGTB2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 [EC:2.4.1.- 2.4.1.22 2.4.1.90 2.4.1.38] [SP:B4GT1_HUMAN]

56895 AGPAT4; 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta) [EC:2.3.1.51]
[SP:PLCD_HUMAN]
8613 PPAP2B; phosphatidic acid phosphatase type 2B [EC:3.1.3.4]
8707 B3GALT2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2 [EC:2.4.1.-]

Inositol phosphate metabolism

5332 PLCB4; phospholipase C, beta 4 [EC:3.1.4.11]
8821 INPP4B; inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa [EC:3.1.3.66]
8871 SYNJ2; synaptojanin 2 [EC:3.1.3.36]

Glycerophospholipid metabolism

51100 SH3GLB1; SH3-domain GRB2-like endophilin B1 [EC:2.3.1.-]
56895 AGPAT4; 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta) [EC:2.3.1.51]
[SP:PLCD_HUMAN]
8613 PPAP2B; phosphatidic acid phosphatase type 2B [EC:3.1.3.4]

Glycosphingolipid metabolism

2683 B4GALT1, GGTB2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 [EC:2.4.1.- 2.4.1.22 2.4.1.90
2.4.1.38] [SP:B4GT1_HUMAN]
8613 PPAP2B; phosphatidic acid phosphatase type 2B [EC:3.1.3.4]
8707 B3GALT2; UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2 [EC:2.4.1.-]

Nicotinate and nicotinamide metabolism

27163 ASAHL; N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like [EC:3.5.1.-]
4837 NNMT; nicotinamide N-methyltransferase [EC:2.1.1.1] [SP:NNMT_HUMAN]
5168 ENPP2; ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin) [EC:3.1.4.1 3.6.1.9]

Pantothenate and CoA biosynthesis

27163 ASAHL; N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like [EC:3.5.1.-]
5168 ENPP2; ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin) [EC:3.1.4.1 3.6.1.9]
586 BCAT1; branched chain aminotransferase 1, cytosolic [EC:2.6.1.42 2.6.1.26] [SP:BCAT1_HUMAN]

Cell Communication

- 10052 GJA7; gap junction protein, alpha 7, 45kDa (connexin 45) [SP:CXA7_HUMAN]
- 1277 COL1A1; collagen, type I, alpha 1 [SP:CO1A1_HUMAN]
- 1281 COL3A1; collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant) [SP:CO3A1_HUMAN]
- 1289 COL5A1; collagen, type V, alpha 1 [SP:CO5A1_HUMAN]
- 1290 COL5A2; collagen, type V, alpha 2 [SP:CO5A2_HUMAN]
- 1301 COL11A1; collagen, type XI, alpha 1
- 3855 KRT7; keratin 7 [SP:K2C7_HUMAN]
- 3875 KRT18; keratin 18 [SP:K1C18_HUMAN]
- 3880 KRT19; keratin 19 [SP:K1C19_HUMAN]
- 3885 KRTHA4; keratin, hair, acidic, 4
- 84823 LMNB2, LMN2; lamin B2

DNA polymerase

- 5557 PRIM1; primase, polypeptide 1, 49kDa [EC:2.7.7.-] [SP:PRI1_HUMAN]
- 5558 PRIM2A; primase, polypeptide 2A, 58kDa [EC:2.7.7.-] [SP:PRI2_HUMAN]
- 57804 POLD4; polymerase (DNA-directed), delta 4 [EC:2.7.7.7] [SP:DPOD4_HUMAN]

MAPK signaling pathway

- 1848 DUSP6; dual specificity phosphatase 6 [EC:3.1.3.48 3.1.3.16] [SP:DUS6_HUMAN]
- 2258 FGF13; fibroblast growth factor 13 [SP:FGF13_HUMAN]
- 2263 FGFR2, KGFR, BEK, CFD1, JWS; fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome) [EC:2.7.1.112]
- 2353 FOS; v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog [SP:FOS_HUMAN]
- 3312 HSPA8; heat shock 70kDa protein 8 [SP:HSP7C_HUMAN]
- 3316 HSPB2; heat shock 27kDa protein 2 [SP:HSPB2_HUMAN]
- 3925 STMN1, LAP18; stathmin 1/oncoprotein 18 [SP:STMN1_HUMAN]
- 4208 MEF2C; MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C) [SP:MEF2C_HUMAN]
- 4217 MAP3K5; mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 [EC:2.7.1.-] [SP:M3K5_HUMAN]
- 4616 GADD45B; growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
- 994 CDC25B; cell division cycle 25B [EC:3.1.3.48]

Calcium signaling pathway

- 113 ADCY7; adenylate cyclase 7 [EC:4.6.1.1] [SP:ADCY7_HUMAN]
- 185 AGTR1; angiotensin II receptor, type 1 [SP:AG2R_HUMAN]
- 2149 F2R; coagulation factor II (thrombin) receptor [SP:PAR1_HUMAN]
- 292 SLC25A5, ANT2; solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5 [SP:ADT2_HUMAN]
- 3710 ITPR3; inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3 [SP:ITPR3_HUMAN]
- 490 ATP2B1; ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 1 [EC:3.6.3.8]
- 5332 PLCB4; phospholipase C, beta 4 [EC:3.1.4.11]
- 5733 PTGER3; prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3) [SP:PE2R3_HUMAN]
- 891 CCNB1; cyclin B1 [SP:CCNB1_HUMAN]
- 983 CDC2; cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M [EC:2.7.1.37]

Cytokine-cytokine receptor interaction

- 11009 IL24; interleukin 24 [SP:IL24_HUMAN]
- 1231 CCR2; chemokine (C-C motif) receptor 2
- 3574 IL7; interleukin 7 [SP:IL7_HUMAN]
- 3575 IL7R; interleukin 7 receptor [SP:IL7RA_HUMAN]
- 3590 IL11RA; interleukin 11 receptor, alpha
- 4254 KITLG; KIT ligand
- 6372 CXCL6, SCYB6; chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2) [SP:SCYB6_HUMAN]
- 7424 VEGFC; vascular endothelial growth factor C [SP:VEGFC_HUMAN]

Phosphatidylinositol signaling system

- 3710 ITPR3; inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3 [SP:ITPR3_HUMAN]
- 5332 PLCB4; phospholipase C, beta 4 [EC:3.1.4.11]
- 8821 INPP4B; inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa [EC:3.1.3.66]
- 8871 SYNJ2; synaptojanin 2 [EC:3.1.3.36]

Cell cycle

10926 ASK; activator of S phase kinase
1111 CHEK1; CHK1 checkpoint homolog (S. pombe) [EC:2.7.1.37] [SP:CHK1_HUMAN]
4085 MAD2L1; MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) [SP:MD2L1_HUMAN]
4088 SMAD3, MADH3; SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila) [SP:SMA3_HUMAN]
4171 MCM2; MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (S. cerevisiae)
4172 MCM3; MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) [SP:MCM3_HUMAN]
4173 MCM4, CDC21; MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (S. cerevisiae)
4174 MCM5; MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae) [SP:MCM5_HUMAN]
4175 MCM6; MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae) [SP:MCM6_HUMAN]
4616 GADD45B; growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
5111 PCNA; proliferating cell nuclear antigen [SP:PCNA_HUMAN]
699 BUB1, BUB1L; BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast) [EC:2.7.1.37] [SP:BUB1_HUMAN]
701 BUB1B; BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast) [EC:2.7.1.37] [SP:BUB1B_HUMAN]
8243 SMC1L1; SMC1 structural maintenance of chromosomes 1-like 1 (yeast)
890 CCNA2; cyclin A2 [SP:CCNA2_HUMAN]
891 CCNB1; cyclin B1 [SP:CCNB1_HUMAN]
9088 PKMYT1; protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1 [EC:2.7.1.37]
9134 CCNE2; cyclin E2
9184 BUB3; BUB3 budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast) [SP:BUB3_HUMAN]
983 CDC2; cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M [EC:2.7.1.37]
990 CDC6; CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)
991 CDC20; CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
994 CDC25B; cell division cycle 25B [EC:3.1.3.48]

Ubiquitin mediated proteolysis

11065 UBE2C; ubiquitin-conjugating enzyme E2C [EC:6.3.2.19] [SP:UBE2C_HUMAN]
64750 SMURF2; SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 [EC:6.3.2.-] [SP:SMURF2_HUMAN]
991 CDC20; CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)

Wnt signaling pathway

22943 DKK1; dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis) [SP:DKK1_HUMAN]
27123 DKK2; dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis) [SP:DKK2_HUMAN]

4088 SMAD3, MADH3; SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila) [SP:SMA3_HUMAN]
5332 PLCB4; phospholipase C, beta 4 [EC:3.1.4.11]
56998 CTNNBIP1; catenin, beta interacting protein 1
79718 TBL1XR1; transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1

Notch signaling pathway

2648 GCN5L2; GCN5 general control of amino-acid synthesis 5-like 2 (yeast) [EC:2.3.1.-] [SP:GCNL2_HUMAN]

TGF-beta signaling pathway

4088 SMAD3, MADH3; SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila) [SP:SMA3_HUMAN]
64750 SMURF2; SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 [EC:6.3.2.-] [SP:SMUF2_HUMAN]

Axon guidance

2043 EPHA4; EPH receptor A4 [EC:2.7.1.112] [SP:EPHA4_HUMAN]
3983 ABLIM1; actin binding LIM protein 1
3984 LIMK1; LIM domain kinase 1 [EC:2.7.1.37]
59277 NTN4; netrin 4

Focal adhesion

1277 COL1A1; collagen, type I, alpha 1 [SP:CO1A1_HUMAN]
1281 COL3A1; collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant) [SP:CO3A1_HUMAN]
1289 COL5A1; collagen, type V, alpha 1 [SP:CO5A1_HUMAN]
1290 COL5A2; collagen, type V, alpha 2 [SP:CO5A2_HUMAN]
1301 COL11A1; collagen, type XI, alpha 1
22801 ITGA11; integrin, alpha 11 [SP:ITA11_HUMAN]
3693 ITGB5; integrin, beta 5 [SP:ITB5_HUMAN]
7424 VEGFC; vascular endothelial growth factor C [SP:VEGFC_HUMAN]
8445 DYRK2; dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 [EC:2.7.1.112 2.7.1.37]

ECM-receptor interaction

1277 COL1A1; collagen, type I, alpha 1 [SP:CO1A1_HUMAN]

- 1281 COL3A1; collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant) [SP:CO3A1_HUMAN]
- 1289 COL5A1; collagen, type V, alpha 1 [SP:CO5A1_HUMAN]
- 1290 COL5A2; collagen, type V, alpha 2 [SP:CO5A2_HUMAN]
- 1301 COL11A1; collagen, type XI, alpha 1
- 22801 ITGA11; integrin, alpha 11 [SP:ITA11_HUMAN]
- 3161 HMMR; hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)
- 3693 ITGB5; integrin, beta 5 [SP:ITB5_HUMAN]
- 6383 SDC2; syndecan 2 (heparan sulfate proteoglycan 1, cell surface-associated, fibroglycan)
- 948 CD36; CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor) [SP:CD36_HUMAN]

Cell adhesion molecules (CAMs)

- 1462 CSPG2; chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
- 3105 HLA-A; major histocompatibility complex, class I, A [SP:1A01_HUMAN]
- 3107 HLA-C, HLA-JY3, D6S204; major histocompatibility complex, class I, C [SP:1C04_HUMAN]
- 3134 HLA-F; major histocompatibility complex, class I, F [SP:HLAF_HUMAN]
- 3135 HLA-G; HLA-G histocompatibility antigen, class I, G [SP:HLAG_HUMAN]
- 6383 SDC2; syndecan 2 (heparan sulfate proteoglycan 1, cell surface-associated, fibroglycan)

Gap junction

- 113 ADCY7; adenylate cyclase 7 [EC:4.6.1.1] [SP:ADCY7_HUMAN]
- 1902 EDG2; endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2 [SP:EDG2_HUMAN]
- 3710 ITPR3; inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3 [SP:ITPR3_HUMAN]
- 5332 PLCB4; phospholipase C, beta 4 [EC:3.1.4.11]
- 983 CDC2; cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M [EC:2.7.1.37]

Jak-STAT signaling pathway

- 10252 SPRY1; sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)
- 11009 IL24; interleukin 24 [SP:IL24_HUMAN]
- 3574 IL7; interleukin 7 [SP:IL7_HUMAN]
- 3575 IL7R; interleukin 7 receptor [SP:IL7RA_HUMAN]
- 3590 IL11RA; interleukin 11 receptor, alpha
- 8835 SOCS2; suppressor of cytokine signaling 2 [SP:SOCS2_HUMAN]

Regulation of actin cytoskeleton

- 2149 F2R; coagulation factor II (thrombin) receptor [SP:PAR1_HUMAN]
- 2258 FGF13; fibroblast growth factor 13 [SP:FGF13_HUMAN]
- 2263 FGFR2, KGFR, BEK, CFD1, JWS; fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome) [EC:2.7.1.112]
- 22801 ITGA11; integrin, alpha 11 [SP:ITA11_HUMAN]
- 3693 ITGB5; integrin, beta 5 [SP:ITB5_HUMAN]
- 3984 LIMK1; LIM domain kinase 1 [EC:2.7.1.37]
- 9459 ARHGEF6; Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6

Insulin signaling pathway

- 3667 IRS1; insulin receptor substrate 1 [SP:IRS1_HUMAN]
- 5507 PPP1R3C, PPP1R5; protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C
- 5577 PRKAR2B; protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta [SP:KAP3_HUMAN]
- 8835 SOCS2; suppressor of cytokine signaling 2 [SP:SOCS2_HUMAN]

Adipocytokine signaling pathway

- 3667 IRS1; insulin receptor substrate 1 [SP:IRS1_HUMAN]
- 948 CD36; CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor) [SP:CD36_HUMAN]

Type II diabetes mellitus

- 3667 IRS1; insulin receptor substrate 1 [SP:IRS1_HUMAN]
- 8835 SOCS2; suppressor of cytokine signaling 2 [SP:SOCS2_HUMAN]