

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-DIAGNOSTICHE E TERAPIE SPECIALI
SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE MEDICHE CLINICHE E
SPERIMENTALI
INDIRIZZO: METODOLOGIA CLINICA E SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE
XXIII CICLO

**IL SISTEMA DELL'OSSIDO NITRICO COME MEDIATORE DELLA
BIOGENESI MITOCONDRIALE E DELLA SENSIBILITA' INSULINICA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Supervisore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Dottoranda: Dott.ssa Elisabetta Trevelling

INDICE

ABSTRACT	6
INTRODUZIONE	10
Disordini metabolici e funzionalità mitocondriale	10
Mitocondri e biogenesi mitocondriale	14
Mitocondri in generale	14
Biogenesi mitocondriale	15
Esercizio fisico e attività mitocondriale	17
Effetti dell'ossido nitrico sulla biogenesi mitocondriale	20
Esercizio fisico e ossido nitrico	20
Ossido nitrico	20
Ossido nitrico, caratteristiche generali	20
Sintesi dell'ossido nitrico e regolazione della attività enzimatica	21
Ossido nitrico e mitocondri	22
□ Tessuto adiposo e biogenesi mitocondriale	23
Modello murino eNOS -/-	24
SCOPO DELLA TESI	28
Disegno sperimentale	28
MATERIALI E METODI	30
Animali e protocollo di allenamento	30
Prelievi di sangue e saggi biochimici	31
Test di tolleranza all'insulina ITT	31
Saggio di incorporazione tissutale del glucosio	31
Culture cellulari e somministrazione di DETA-NONOATO 100 μM	32
Estrazione dell'RNA	33
Trattamento con DNAsi	34

Retrotrascrizione	34
Real-Time PCR	34
[³H]-2-Deoxyglucose uptake	36
Small Interference RNA	36
Analisi dell' mtDNA	37
Colorazione mitocondriale con Mito-Tracker Green	37
Immunofluorescenza e quantificazione della traslocazione di GLUT4	38
Estrazione proteica e analisi Western blot	39
Transfezione delle cellule HL-1 con vettore p-CMV-GLUT4-myc	40
Immunofluorescenza e quantificazione della traslocazione dell'antigene myc in membrana	41
Analisi statistiche	42
RISULTATI	44
VARIAZIONI METABOLICHE INDOTTE DALL'ESERCIZIO FISICO	44
Peso corporeo e parametri endocrino-metabolici	44
RUOLO DI eNOS SULLA SENSIBILITÀ ALL'INSULINA E SULLA BIOGENESI MITOCONDRIALE NEL MUSCOLO	47
Espressione genica	47
Quantificazione del mtDNA	49
Glucose uptake	49
RUOLO DI eNOS SULLA SENSIBILITÀ ALL'INSULINA E SULLA BIOGENESI MITOCONDRIALE NEL CUORE	51
<i>STUDI IN VIVO</i>	51
Espressione genica e quantificazione del mtDNA	51
Glucose uptake	52
<i>STUDI IN VITRO SU CARDIOMIOCITI HL-1</i>	53
Espressione genica e quantificazione del mtDNA	53
siRNA di PGC-1α e Tfam	54
Glucose uptake	55
Fosforilazione di AKT in cellule HL-1	57
Traslocazione di GLUT4-myc in cellule HL-1	58
RUOLO DI eNOS SULLA SENSIBILITÀ ALL'INSULINA E SULLA	61

BIOGENESI MITOCONDRIALE NEL TESSUTO ADIPOSO

STUDI IN VIVO

Espressione genica e quantificazione del mtDNA 61

Glucose uptake 63

STUDI IN VITRO SU ADIPOCITI 3T3-L1

Espressione genica 65

Glucose uptake 66

**Microscopia a fluorescenza e valutazione della biogenesi
mitocondriale** 66

Traslocazione di GLUT4 69

DISCUSSIONE

Effetti a livello muscolare 72

Effetti a livello cardiaco 74

Effetti a livello del tessuto adiposo 76

Conclusioni 79

BIBLIOGRAFIA

80

ABSTRACT

Stato dell'arte e scopo della tesi: Tra i differenti meccanismi implicati nella patogenesi dell'obesità, della resistenza insulinica e della loro progressione verso il diabete di tipo 2 è stata ipotizzata l'esistenza di un danno della funzione mitocondriale. Inoltre l'insulino resistenza è associata ad un ridotto contenuto mitocondriale e ad una riduzione dell'attività dell'enzima eNOS che si presume essere il primo fattore implicato nella catena di signalling. Partendo dal presupposto che l'esercizio fisico aumenta la sensibilità insulinica e la produzione di ossido nitrico, e che l'ossido nitrico è in grado di stimolare la biogenesi mitocondriale si è voluto analizzare se l'aumento della sensibilità insulinica e della mitocondriogenesi mediato dall'esercizio fisico fosse correlato al metabolismo dell'ossido nitrico. Durante il mio dottorato di ricerca mi sono occupata dello studio degli effetti dell'esercizio fisico in alcuni tessuti di topi eNOS^{-/-} in seguito a un protocollo di allenamento cronico di tipo aerobico. Ho studiato questi effetti in termini di dosaggi plasmatici, espressione genica e aumento del DNA mitocondriale e capacità di captazione del glucosio in tessuto cardiaco, muscolare e adiposo. Mi sono inoltre occupata della valutazione degli effetti della somministrazione di ossido nitrico su cellule in coltura, cardiomiociti HL1 e adipociti 3T3-L1.

Materiali e Metodi: Ho eseguito analisi biochimiche mediante saggi enzimatici e misurazioni di parametri endocrino-metabolici, analisi di espressione genica, quantificazione di mtDNA e della capacità di captazione di glucosio in diversi tessuti ottenuti da topi eNOS^{-/-} e wild type dopo un periodo di 6 settimane di allenamento. Ho allestito un protocollo per il trattamento *in vitro* con un donatore di ossido nitrico (DETA-NONOato 100µM per 72 ore) su cellule HL-1 e 3T3-L1 e in seguito ho valutato l'espressione genica, la capacità di captazione del glucosio sia in condizioni basali che insulino stimolate, l'analisi in immunofluorescenza della biogenesi mitocondriale e la traslocazione del trasportatore GLUT4 di queste cellule.

Risultati e conclusioni: Ho osservato un aumento dell'espressione genica, del contenuto di mtDNA e della capacità di captazione del glucosio in diversi tessuti dei topi wild type ma non di quelli eNOS^{-/-} in seguito al periodo di allenamento. Nelle cellule trattate con DETA-NONOato ho osservato un aumento dell'espressione genica, della biogenesi mitocondriale, della capacità di captazione di glucosio sia basale che insulino-stimolata e della traslocazione di GLUT4 rispetto alle cellule di controllo che non erano state sottoposte al trattamento. Questi risultati suggeriscono che l'ossido nitrico abbia un ruolo chiave nella regolazione del bilancio energetico e del metabolismo del glucosio e confermano un suo coinvolgimento nell'attivazione della biogenesi mitocondriale. Saranno necessari ulteriori studi per indagare ulteriormente il suo ruolo nella patogenesi di complicanze cardiovascolari legate all'obesità e al diabete di tipo 2.

ABSTRACT

Background and aim: It has been hypothesized the existence of an impairment in mitochondrial function among the several effects that may be implicated in the pathogenesis of obesity, insulin resistance and their progression towards type 2 diabetes. Furthermore, insulin resistance is associated with a reduction in mitochondrial content and eNOS enzymatic activity. Physical exercise has been shown to induce important physiological adaptations, involving not only skeletal and cardiac muscle, but also vascular and metabolic systems. Two major events induced by physical activity are the induction of eNOS gene expression and the increase of tissue nitric oxide production, which in turn could influence mitochondrial biogenesis and glucose uptake. All these aspects suggest to further study the mechanisms involved in physical exercise-inducing mitochondrial biogenesis and nitric oxide production in order to better understand the cellular signalling and the gene expression regulation. I studied the effects of chronic aerobic exercise in different tissues obtained from eNOS^{-/-} mice in terms of evaluation of biochemical parameters, mitochondrial biogenesis and capability of glucose uptake and I studied the effects of the treatment with a nitric oxide donor (DETA-NONOate) on HL-1 and 3T3-L1 cells in terms of mitochondrial biogenesis and glucose uptake.

Materials and Methods: I performed a biochemical analysis, an expression analysis of genes involved in mitochondrial biogenesis, a mtDNA quantification and an analysis of the capability of glucose uptake in different tissues obtained from eNOS^{-/-} and wild type mice after a 6 weeks period of exercise training. I set up a protocol for an *in vitro* treatment with a nitric oxide donor (DETA-NONOate 100 μ M for 72 hours) of HL-1 cardiomyocytes and 3T3-L1 adipocytes and then I performed a gene expression analysis, a measurement of the capability of basal and insulin stimulated glucose uptake, an immunofluorescence analysis of mitochondrial biogenesis and a quantification of GLUT4 translocation after insulin stimulation.

Results and conclusions: I observed an increase in gene expression, mtDNA content and capability of both basal and insulin-stimulated glucose uptake in different tissues obtained from wild type but not eNOS^{-/-} mice after the exercise training protocol. In cells treated with DETA-NONOate I observed an increase in gene expression, mitochondrial biogenesis, capability of basal and insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation compared to those without treatment. These results suggest that nitric oxide is a key molecule in the regulation of energy balance and glucose metabolism, and it may be involved in the activation of mitochondrial function and biogenesis. Further studies are needed to better clarify the role of NO and mitochondrial biogenesis in the pathogenesis of cardiovascular abnormalities linked with obesity and type 2 diabetes.

INTRODUZIONE

Disordini metabolici e funzionalità mitocondriale

Il diabete di tipo 2 e le sue complicanze, quali ad esempio le malattie cardiovascolari, hanno assunto proporzioni epidemiche nei paesi industrializzati e rappresentano un severo problema di salute pubblica con preoccupanti implicazioni circa un trattamento medico. Lo stile di vita sedentario e la ridotta capacità fisica sono potenti predittori di mortalità, molto più di altri fattori di rischio comunemente associati allo sviluppo di malattie cardiovascolari [1, 2]. Le modifiche dello stile di vita ed in particolare i cambiamenti nelle abitudini alimentari e nell'attività fisica sono terapie ben consolidate sia per l'obesità e il diabete di tipo 2, che le loro complicanze [3] [4] [5]. La riduzione del trasporto di glucosio, della sua fosforilazione e della capacità di sintesi di glicogeno sono le principali alterazioni che insorgono nei soggetti diabetici.[6] A questi si aggiungono un aumento del metabolismo degli acidi grassi, dell'accumulo dei trigliceridi e una riduzione dell'ossidazione dei lipidi [7, 8].

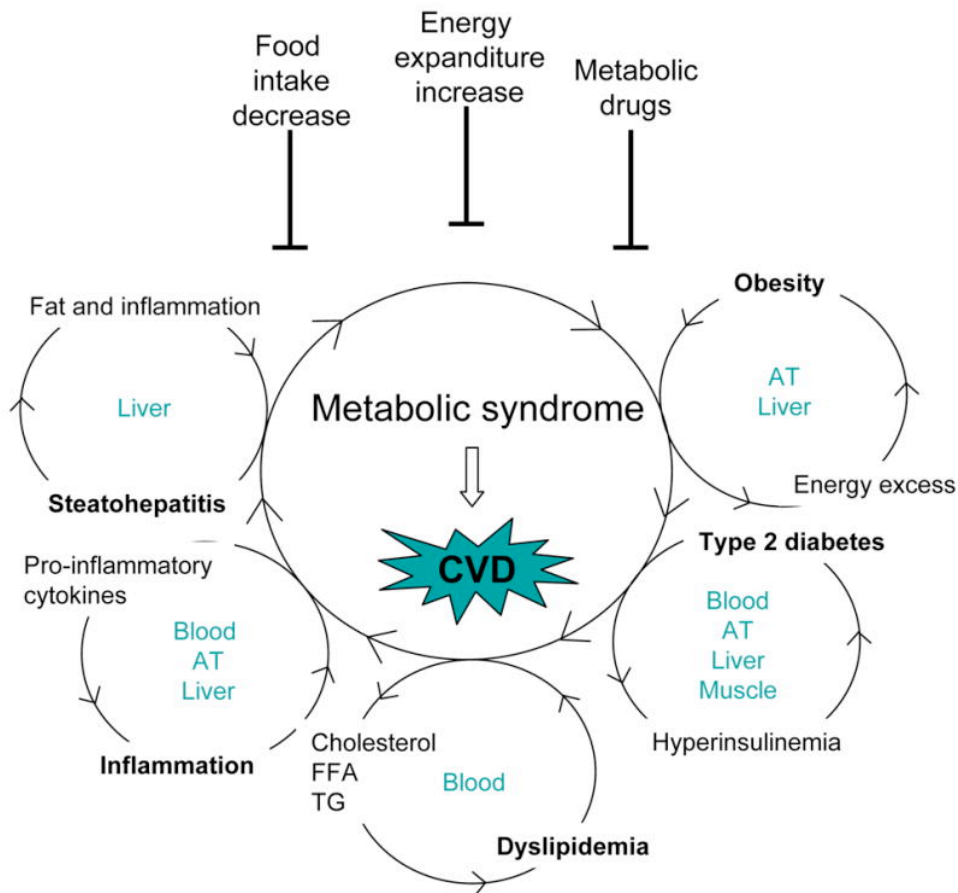


Figura 1. Sindrome metabolica. In questo schema semplificato l'obesità, il diabete di tipo 2, la dislipidemia, l'infiammazione e la steatosi epatica sono rappresentate come contribuenti alla sindrome metabolica inducendo lo sviluppo di malattie cardiovascolari (CVD). Ogni disordine metabolico è indotto da una principale alterazione come ad esempio un eccesso di intake calorico, l'iperinsulinemia, il colesterolo, gli acidi grassi liberi (FFA) e i trigliceridi (TG), le citochine proinfiammatorie, l'accumulo di grasso e l'infiammazione cronica. Dentro ciascun ciclo sono citati i principali organi o tessuti coinvolti in queste patologie che vanno tutte assieme sotto il nome di sindrome metabolica: il sangue, il tessuto adiposo (AT), il fegato e i muscoli. La restrizione calorica, il dispendio energetico e i farmaci che agiscono a livello metabolico sono strategie in grado di contrastare la sindrome metabolica.

I meccanismi che regolano l'insorgenza della resistenza insulinica non sono tuttavia del tutto chiari. Tra i differenti meccanismi implicati nella patogenesi dell'obesità, della resistenza insulinica e della loro progressione verso il diabete di tipo 2 è stata ipotizzata l'esistenza di un danno della funzione mitocondriale [9]. Inoltre l'insulino resistenza è associata ad un ridotto contenuto mitocondriale e ad una riduzione dell'attività dell'enzima eNOS che si presume essere il primo fattore implicato nella catena di signalling. Analisi sia funzionali che quantitative hanno rivelato che il contenuto mitocondriale è inferiore nei muscoli di soggetti obesi insulino-resistenti [10] e in pazienti con diabete di tipo 2 [11] e questo deficit può contribuire all'alterazione della trasduzione del segnale, del trasporto e dell'ossidazione dei substrati [8]. Inoltre dati recenti indicano che anche il ridotto quantitativo mitocondriale del tessuto adiposo può essere correlato all'insorgenza del diabete di tipo 2. [12].

La presenza di danno mitocondriale nella progenie insulino-resistente di pazienti affetti da diabete di tipo 2 ne ha suggerito un ruolo primario nella patogenesi in un importante studio [13]. Questi cambiamenti erano accompagnati dalla diminuzione sia nell'attività ossidativa mitocondriale che nella sintesi di ATP. Questi dati supportano l'ipotesi che l'insulino-resistenza negli uomini nasca da difetti nell'ossidazione, a livello mitocondriale, degli acidi grassi; questi stessi a loro volta conducono a incrementi dei propri metaboliti intracellulari (acil-CoA e diacilglicerolo) che influenzano negativamente le vie del segnale insulinico.

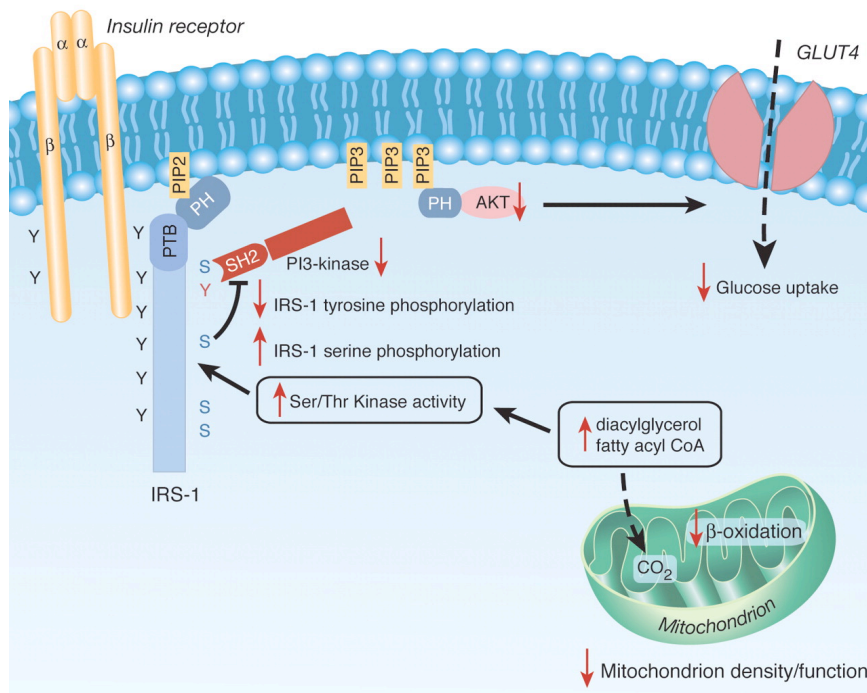


Figura 2. Modello di Lowell: potenziale meccanismo con cui la disfunzione mitocondriale potrebbe indurre l'insulino resistenza nei muscoli scheletrici. Una diminuzione dell'ossidazione degli acidi grassi, causata da una disfunzione dei mitocondri o da una diminuzione del loro contenuto all'interno della cellula, produce un aumento dei livelli di acetyl CoA e diacilglicerolo. Queste molecole attivano la protein chinasi C, che a sua volta attiva una cascata di serina chinasi che ha come esito finale la fosforilazione della serina dell'insulin receptor substrate 1 (IRS1). Quest'aumento della fosforilazione di IRS-1 blocca la possibilità di fosforilare IRS-1 nella tirosina da parte del recettore dell'insulina (IR) che a sua volta inibisce l'attività della fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3-kinase). Questa inibizione provoca una soppressione del trasporto del glucosio insulino-stimolato da parte delle cellule muscolari.

Altri studi hanno rivelato che soggetti insulino-resistenti hanno un rapporto più basso di fibre muscolari di tipo I rispetto alle fibre di tipo II. Le fibre di tipo I sono prevalentemente ossidative e contengono più mitocondri delle fibre muscolari di tipo II, con un'attività eminentemente glicolitica. Inoltre questi individui possono avere meno mitocondri muscolari, a causa forse della diminuzione dell'espressione dei geni nucleari che regolano la biogenesi mitocondriale, come PGC-1 α [14] e PGC-1 β [15]. Studi che sfruttano le potenzialità dei microarray supportano questa idea: gli obesi con una ridotta tolleranza al glucosio o diabete di tipo 2 mostrano una riduzione dei geni regolati da PGC-1 α [16]. PGC-1 α e PGC-1 β sono anch'essi down-regolati sia negli obesi diabetici che nei soggetti sovrappeso non diabetici [17].

Mitocondri e biogenesi mitocondriale

Mitocondri in generale

I mitocondri occupano una porzione sostanziale del volume citoplasmatico delle cellule eucariotiche e sono elementi essenziali per l'evoluzione degli animali complessi. I mitocondri sono di solito immaginati come strutture a forma di bastoncino allungato con un diametro di 0,5-1 μm , simili ai batteri. Tuttavia, ora sappiamo che i mitocondri sono organelli mobili e plastici, con una forma costantemente in cambiamento, in grado di fondersi uno con l'altro e di dividersi. Dal momento che i mitocondri si muovono nel citoplasma, sembra che siano associati con i microtubuli, i quali ne determinano l'orientamento e la distribuzione nei diversi tipi cellulari: essi sono organizzati come lunghi filamenti o catene in movimento. In alcuni tipi cellulari restano fermi in una posizione e forniscono energia direttamente ad un sito ad alto consumo di ATP, come in una cellula muscolare cardiaca, insaccati tra miofibrille adiacenti o in uno spermatozoo avvolti intorno al flagello.

Il mitocondrio effettua la gran maggioranza delle ossidazioni cellulari e produce la maggior parte dell'ATP delle cellule animali. La matrice mitocondriale contiene una grande varietà di enzimi, inclusi quelli che convertono il piruvato e gli acidi grassi ad acetil-CoA e quelli che ossidano l'acetil-CoA a CO_2 attraverso il ciclo dell'acido citrico. Grandi quantità di NADH e di FADH_2 sono prodotte da queste reazioni di ossidazione. La catena respiratoria nella membrana mitocondriale interna produce l'energia dalla combinazione dell'ossigeno molecolare con gli elettroni reattivi portati dal NADH e dal FADH_2 .

In particolare, la catena respiratoria pompa ioni H^+ fuori dalla matrice per creare un gradiente elettrochimico transmembrana, costituito sia dal potenziale di membrana che dalla differenza di pH. La grande quantità di energia libera rilasciata quando i protoni rifluiscono nella matrice passando attraverso la membrana interna, fornisce la base per la produzione di ATP, per mezzo di un macchinario proteico chiamato ATP sintasi. Il gradiente elettrochimico transmembrana viene sfruttato anche per guidare il trasporto attivo di metaboliti selezionati, attraverso la membrana mitocondriale interna, incluso lo scambio ATP-ADP tra il mitocondrio e il citoplasma che mantiene il pool di ATP della cellula ad alti livelli. Sebbene molte attività del mitocondrio, come la produzione di ATP,

siano comuni a tutte le cellule, un'indagine proteomica suggerisce che quasi la metà delle proteine mitocondriali sono tessuto specifiche [18].

Queste differenze proteiche si riflettono nella diversità che i differenti tipi cellulari mostrano nel numero, nelle dimensioni e nella forma dei loro mitocondri [19]. Il numero di mitocondri spazia da un singolo organello nelle cellule della retina a centinaia di organelli negli epatociti. Anche la morfologia dei mitocondri varia nei differenti tipi cellulari, da organelli a forma di tubulo osservabili in molti tipi cellulari a strutture a forma di foglio, di sacco o ovali.

Biogenesi mitocondriale

La divisione e la fusione dell'organello sono due processi che possono avere effetti diversi su come appare un mitocondrio. Tuttavia, studi sulle cellule di lievito indicano che la divisione e la fusione potrebbero effettivamente controllare il numero dei mitocondri, piuttosto che controllare strettamente la loro forma [20, 21]. I mitocondri nelle cellule di lievito, in crescita attiva, esistono come un reticolo dinamico lungo, sottile e ramificato di circa 5-10 tubuli. Nei mutanti difettivi nella fusione mitocondriale, la divisione produce numerosi piccoli mitocondri, mentre nelle cellule difettive nella fissione si osserva un singolo organello.

A sorpresa, i mutanti che mancano sia della attività di fusione che di fissione contengono mitocondri con una normale forma tubulare [20, 21] indicando che la forma è controllata da un meccanismo distinto.

I mitocondri si dividono durante la mitosi, fornendo alle cellule figlie un normale numero di essi. Oltre al caso in cui la divisione mitocondriale avviene durante il ciclo cellulare si possono citare esempi in cui essa si verifica al di fuori della mitosi. Per esempio i mitocondri del muscolo proliferano durante la biogenesi e in seguito all'esercizio fisico [22]. La divisione mitocondriale può essere indotta da un ampio spettro di sostanze incluse le benzodiazepine, inibitori della fosforilazione ossidativa, esteri del forbolo e flussi di calcio [23]. Nei vertebrati, il numero dei mitocondri, o piuttosto il volume della massa mitocondriale per cellula, è ulteriormente controllato dagli ormoni tiroidei (come T3), che influenzano ampiamente i tassi metabolici nei vertebrati e possono specificatamente indurre divisione mitocondriale. Inoltre l'esposizione di mammiferi a basse temperature per prolungati periodi di tempo induce

un marcato aumento nella massa mitocondriale negli adipociti bruni; questo fornisce un importante meccanismo per il mantenimento del bilancio energetico del corpo e della temperatura interna [24]. I mitocondri nelle cellule della maggior parte dei tessuti sono tubulari, ma cambiamenti dinamici nella morfologia sono prodotti dalla fissione, fusione e traslocazione [19]. I mitocondri possono ramificarsi, allungarsi, ritirarsi e assumere diverse forme. In ogni istante possono essere considerati in uno stato di transizione. Alcune prove suggerirebbero che esiste un'intricata relazione funzionale-strutturale tra la morfologia dei mitocondri e la loro attività di produzione di energia.

La sintesi mitocondriale richiede la cooperazione tra i genomi mitocondriale e nucleare. Un mitocondrio possiede copie multiple di una piccola molecola circolare di DNA (mtDNA) composta di 16,659 nucleotidi. Dalla trascrizione del mtDNA il mitocondrio ottiene 13 mRNA, 22 tRNA e 2 molecole che sono essenziali per la funzione mitocondriale. Le 13 molecole di mRNA codificano tutte le componenti proteiche della catena respiratoria, responsabili del trasporto di elettroni e della sintesi di ATP. Queste 13 componenti proteiche costituiscono soltanto una piccola frazione delle proteine della catena respiratoria. Alcune agiscono singolarmente, ma molte si combinano con proteine codificate dal nucleo per formare complessi proteici come COX o NADH deidrogenasi. La trascrizione e la replicazione dell' mtDNA richiedono l'importazione di prodotti del genoma nucleare, che agiscono come polimerasi o fattori di trascrizione. I due genomi agiscono in modo coordinato in risposta agli stimoli per fornire proteine alla biogenesi mitocondriale.

L' mtDNA può replicare in modo indipendente dal DNA nucleare, ed è presente in un alto numero di copie (un centinaio di copie). La sua replicazione richiede la presenza della DNA polimerasi γ , di proteine che legano il DNA a singola elica, Tfam, che inizia la trascrizione e genera primers per permettere la replicazione del DNA e una endonucleasi per processare l'RNA mitocondriale (RNase MRP)[25].

Esercizio fisico e attività mitocondriale

Il contenuto mitocondriale può essere misurato direttamente, usando stime morfometriche del volume degli organelli in relazione al volume cellulare totale. Più comunemente, è stimato *in vitro* dal cambiamento in attività massima di un tipico enzima marcatore come la citrato sintasi, o dal cambiamento in contenuto di una proteina simile al citocromo c [26]. Questo risulta valido nella maggior parte delle condizioni poiché i cambiamenti nei volumi mitocondriali stimati morfometricamente vanno in parallelo con i cambiamenti dei valori della velocità massima enzimatica[27]. La misura delle proteine singole o delle loro attività è stata utile per determinare il turnover mitocondriale, assumendo che il comportamento proteico riassume quello dell'organello intero. Questa assunzione deve essere considerata alla luce della crescente conoscenza che la composizione proteica mitocondriale può cambiare in risposta all'esercizio cronico [28] [29].

La misura di questi marcatori proteici permette di osservare che, in risposta a uno stimolo fisico costante, circa 6 settimane di allenamento intenso sono necessarie per giungere ad un nuovo, maggiore contenuto mitocondriale. Questo periodo di tempo è dipendente dal tipo di fibra che viene reclutata così come dalla durata, dalla frequenza e dall'intensità del periodo di esercizio [30]. Gli adattamenti mitocondriali non avvengono nelle cellule muscolari scheletriche che non sono reclutate durante il periodo di esercizio: lo stimolo per la biogenesi origina all'interno del muscolo che si contrae e in modo indipendente dalle influenze umorali. Il periodo di esercizio di circa 6 settimane comporta un nuovo contenuto mitocondriale, riflettendo gli eventi molecolari precoci che alla fine conducono ai cambiamenti morfologici misurabili. Infatti, i cambiamenti nel contenuto proteico mitocondriale possono essere visualizzati in momenti della durata dell'allenamento molto precoci. Le proteine mitocondriali si rinnovano con un'emivita di circa una settimana dopo l'inizio di un nuovo periodo di attività contrattile [26, 31]. Questo significa che è richiesto un continuo stimolo fisico per mantenere il contenuto mitocondriale al livello elevato conseguente al periodo di esercizio; altrimenti, si arriverà ad una perdita di capacità ossidativa e di resistenza allo sforzo.

Il marcato miglioramento nelle performance da sforzo intenso che risulta dalla biogenesi mitocondriale è una conseguenza dei cambiamenti nel metabolismo muscolare durante l'esercizio. Usando il modello della stimolazione cronica muscolare per indurre la biogenesi mitocondriale, è stato visto che i livelli di trascritti mitocondriali correlano con

variazioni nel mtDNA [32]. Una stretta relazione tra l' mtDNA e l'RNA mitocondriale è stata trovata quando vengono comparati muscoli di individui allenati e non allenati e in pazienti con una significativa delezione di mtDNA. Questi dati suggeriscono che la replicazione del mtDNA in copie multiple o la sua specifica conformazione all'interno della regione di controllo D-loop, regola il livello dell'espressione genica mitocondriale nelle cellule del muscolo scheletrico. L'incremento osservato nel numero di copie di mtDNA come risultato dell'attività contrattile cronica è accompagnato dall'aumento di espressione di SSB, la subunità di RNA di RNase MRP e Tfam ma non Pol- γ . Questi dati suggeriscono che Pol- γ è sufficientemente abbondante e non limitante nella trascrizione del mtDNA.

Tfam è stato studiato come il più importante fattore di trascrizione per il mtDNA. Il livello di Tfam correla con l'abbondanza del mtDNA e la sua perdita sia in pazienti con miopatie mitocondriali che in esperimenti di delezione genica risulta in una riduzione o una totale mancanza del mtDNA. Nel muscolo scheletrico, l'espressione e la funzione di Tfam è modificata dall'attività contrattile. Durante una stimolazione cronica di 3 ore al giorno per 7 giorni è stato dimostrato un incremento nell'mRNA di Tfam entro il 4 giorno. Questo incremento era seguito entro il quinto giorno dall'aumento del contenuto della proteina Tfam nel mitocondrio e da un concomitante aumento di legame al DNA. Quest'ultimo evento era accompagnato da incrementi nell'mRNA di COX III e dell'attività dell'enzima COX IV. Questi dati suggeriscono che l'espressione di Tfam è ben correlata con alterazioni nell'attivazione trascrizionale e nella capacità ossidativa [33].

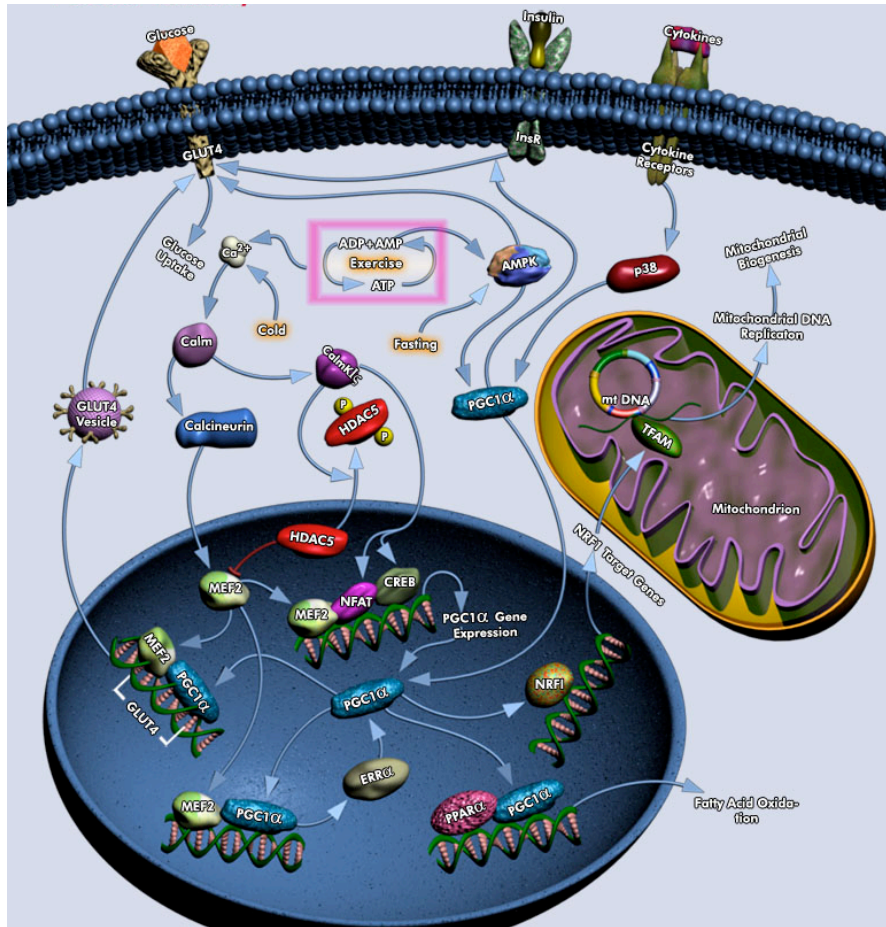


Figura 3. Biogenesi mitocondriale. La biogenesi mitocondriale è un fenomeno che richiede l'attivazione di numerosi meccanismi. Primo tra tutti l'attivazione del peroxisome proliferator-activated receptor γ coattivator 1 α (PGC-1 α), un fattore di trascrizione in grado a sua volta di attivare il nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) e successivamente il mitochondrial transcription factor A (Tfam), promotore quest'ultimo della replicazione del DNA mitocondriale e del conseguente aumento della massa mitocondriale della cellula.

Effetti dell'ossido nitrico sulla biogenesi mitocondriale

Esercizio fisico e ossido nitrico

L'esercizio fisico è associato con importanti adattamenti fisiologici che coinvolgono in primis il muscolo scheletrico, il muscolo cardiaco e molti altri sistemi sia vascolari che metabolici. Un adattamento particolarmente interessante è l'incremento dell'espressione del gene della sintasi dell'ossido nitrico endoteliale (eNOS) e la conseguente produzione di ossido nitrico (NO) negli organi coinvolti durante l'attività fisica. L'ossido nitrico è una molecola radicalica gassosa con emivita breve che diffonde passivamente attraverso la membrana plasmatica ed è coinvolto in diversi meccanismi cellulari. E' stato visto che l'ossido nitrico può influenzare direttamente o indirettamente la funzione dei mitocondri ed è stato possibile ipotizzare che un difetto primario nel metabolismo di questa molecola esiti in un'alterazione della funzionalità mitocondriale [34].

Ossido nitrico

Ossido nitrico, caratteristiche generali

L'ossido nitrico (NO) è una molecola radicalica gassosa prodotta da diversi tipi cellulari. Esso gioca un ruolo critico in svariate funzioni corporee incluse la vasodilatazione della muscolatura liscia, la neurotrasmissione, nella cicatrizzazione delle ferite e nella regolazione delle difese immunitarie [35]. A causa della sua emivita molto breve l'NO è in grado di agire solo in prossimità delle cellule che lo producono e per questo motivo si ritiene che questo gas debba essere considerato un fattore autocrino e paracrino.

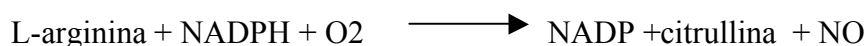
A causa delle sue piccole dimensioni e poiché non è portatore di carica, l'NO diffonde liberamente attraverso le membrane, escludendo il bisogno di un sistema di trasporto. L'NO è relativamente poco reattivo per una specie radicalica, così può diffondere da una cellula in cui è prodotto verso le cellule vicine senza essere distrutto prima che raggiunga i suoi bersagli. Poiché in condizioni fisiologiche l'NO è ossidato a NO^{-2} e NO^{-3} , non è

richiesto nessun meccanismo separato per la sua distruzione [36]; tuttavia, a basse concentrazioni di NO e in assenza di proteine e metalli che contribuiscano alla sua distruzione, la sua decomposizione sarà lenta [37].

Sintesi dell'ossido nitrico e regolazione della attività enzimatica

Il meccanismo di sintesi dell'ossido nitrico richiede la presenza di un enzima denominato sintasi dell'ossido nitrico (NOS). Esistono tre isoforme sintetizzate da altrettanti geni: l'isoforma eNOS (endothelial nitric oxide synthase), nNOS (neuronal nitric oxide synthase) e iNOS (inducible nitric oxide synthase). L'esistenza di una quarta isoforma localizzata nel mitocondrio è tuttora dibattuta. I tre geni NOS umani mostrano una struttura simile e conservata. La struttura è bidominica con un dominio ossigenasico e un dominio reduttasico. Il dominio N-terminale è quello ossigenasico e contiene siti di legame per l'eme, la tetrabioperidina (BH₄), (BH₄ è fondamentale per l'espressione dell'attività di NOS) e L-arginina. Il dominio ossigenasico è legato al dominio reduttasico C-terminale attraverso un sito di riconoscimento della calmodulina (CaM). Il dominio reduttasico porta siti di legame per flavinadenindinucleotide (FAD), flavinmononucleotide (FMN) e nicotinamin-deadenindinucleotide fosfato (NADPH). Inoltre pare che in tutte le isoforme NOS sia presente un centro di legame dello zinco che agirebbe nella stabilizzazione del dimero e senza effetti sulla attività enzimatica. E' da notare inoltre che il monomero è inattivo. La dimerizzazione di NOS avviene tra i domini ossigenasici. Pare che tutti i fattori di legame di NOS sopra citati abbiano una funzione nel migliorare la stabilità del dimero.

L'enzima catalizza la seguente reazione:



Il ruolo dei cofattori flavinici è di accettare gli elettroni dal NADPH e di cederli all'eme. Probabilmente questo è il punto di controllo su cui agisce la CaM attraverso un effetto cinetico. L'eme è il punto finale di cessione degli elettroni. La CaM è necessaria per

L'attività enzimatica di tutte le isoforme di NOS. La dipendenza dal calcio della sintesi di NO distingue le tre isoforme di NO: nNOS ed eNOS hanno una richiesta di calcio molto più grande di quella di iNOS. Il legame della CaM aumenta la velocità di trasferimento degli elettroni dal NADPH alle flavine del dominio reduttasico e dal centro reduttasico all'eme. Un altro sistema di regolazione dell'enzima ossido nitrico sintasi è la fosforilazione. La fosforilazione di nNOS ed eNOS ha un effetto sull'attività enzimatica. In eNOS l'attività aumenta con la fosforilazione mentre in nNOS l'attività diminuisce. L'attività delle sintasi dell'ossido nitrico viene regolata da altre proteine come Hsp90, la quale incrementa l'attività di eNOS, probabilmente in modo allosterico, mentre non ha effetto sull'attività di nNOS. eNOS viene miristoilato in modo irreversibile e palmitoilato in modo reversibile. La doppia acilazione è richiesta per una efficiente localizzazione sulle caveolae del plasmalemma. La palmitoilazione è regolata attraverso cambiamenti del calcio intracellulare.

Ossido nitrico e mitocondri

L'ossido nitrico può agire sulla funzionalità mitocondriale a diversi livelli. A causa delle sue proprietà vasodilatatrici, regola il flusso di sangue ai tessuti; così, indirettamente, fornisce substrati respiratori ai mitocondri e ridistribuisce il calore generato dalla respirazione mitocondriale. Inoltre, l'NO regola direttamente il legame dell'O₂ e il suo rilascio dall'emoglobina [38], e in questo modo il rifornimento di O₂ ai mitocondri. L'NO regola anche la funzione mitocondriale legandosi all'enzima citocromo c ossidasi, l'enzima terminale della catena di trasporto degli elettroni, competendo con l'O₂ e inibendo quindi l'attività dell'enzima [39, 40]. In questo modo regola negativamente la fosforilazione ossidativa, particolarmente alle basse concentrazioni di O₂ in cui si trovano i tessuti [41].

Il trattamento di varie cellule con donatori di NO aumenta il loro contenuto di mtDNA. Questo effetto si ottiene attraverso l'aumento dell'espressione di PGC-1 α , il principale regolatore della biogenesi mitocondriale, NRF-1, NRF-2 e Tfam [42]. L'effetto

viene mediato dal secondo messaggero cGMP, attraverso cui NO agisce. La biogenesi mitocondriale dipendente da NO si riscontra in numerosi tipi cellulari, non è ristretta a specifiche linee cellulari o a determinate specie e genera mitocondri funzionalmente attivi capaci di generare ATP attraverso la fosforilazione ossidativa [43]. E' risaputo che l'attività mitocondriale gioca un ruolo cruciale in vari processi: transizione delle fibre muscolari scheletriche con metabolismo glicolitico a quello ossidativo, rigenerazione dei muscoli cardiaco e scheletrico; inoltre numerosi articoli mettono in evidenza come l'NO sia in grado di aumentare il trasporto di glucosio nel muscolo scheletrico [44].

I meccanismi responsabili della stimolazione del trasporto di glucosio mediata da AMPK sono ancora in parte sconosciuti, ma potrebbero coinvolgere l'interazione con altri percorsi di segnalazione o avere effetti diretti sul traffico vescicolare di GLUT4. Un potenziale mediatore che si trova a valle della via di segnalazione di AMPK è l'NO.

Tessuto adiposo e biogenesi mitocondriale

Studi effettuati su cellule muscolari e cardiache dimostrano che l'aumentata produzione di ossido nitrico influisce positivamente sulla mitocondriogenesi (attraverso la trascrizione di geni che attivano la mitocondriogenesi) e sulla captazione di glucosio (aumentando la capacità di captazione del glucosio insulino-stimolata)[45]. Tuttavia, nonostante sia stato ben documentato che i mitocondri del muscolo sia scheletrico che cardiaco rispondono all'esercizio fisico prolungato, i meccanismi regolatori della trascrizione e dei sistemi di trasduzione del segnale cellulari coinvolti nel controllo della biogenesi mitocondriale non sono ancora stati ben definiti.

E' ormai noto che il tessuto adiposo svolge un ruolo attivo nei meccanismi di regolazione e adattamento all'esercizio fisico e numerosi studi sulla fisiologia degli adipociti hanno smentito l'idea iniziale che il tessuto adiposo fungesse passivamente da deposito energetico. L'aumento della produzione di ossido nitrico conseguente all'attività fisica è stato dimostrato avere un'azione positiva nella stimolazione della lipolisi a livello del tessuto adiposo e nella diminuzione dell'accumulo di grasso nella frazione di tessuto

adiposo sottocutaneo addominale [46]. Lo studio degli effetti dell'ossido nitrico sulle cellule del tessuto adiposo risulta ora di cruciale importanza per valutare l'azione di questa molecola sulla mitocondriogenesi e sulla capacità di glucose uptake. L'azione positiva dell'esercizio fisico sui tessuti bersaglio è noto essere una strategia terapeutica nella prevenzione di diabete e obesità, ma i meccanismi attraverso i quali il tessuto adiposo viene influenzato da tali cambiamenti fisiologici non sono ancora del tutto chiari.

Modello murino eNOS -/-

La biogenesi mitocondriale risulta severamente compromessa in topi knock-out per il gene dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS -/-), mostrando un ridotto rate metabolico con conseguente aumento di peso rispetto ai topi wild-type. Questi animali presentano infatti le caratteristiche tipiche della sindrome metabolica quali ipertensione, dislipidemia, tendenza all'obesità e insulino resistenza. Inoltre, se sottoposti a dieta ipocalorica con un conseguente calo ponderale, i topi eNOS -/- non mostrano un aumento della biogenesi mitocondriale e della stimolazione di ATP in numerosi tessuti, al contrario dei topi wild type in cui peraltro lo stesso trattamento migliora la sensibilità insulinica [47].

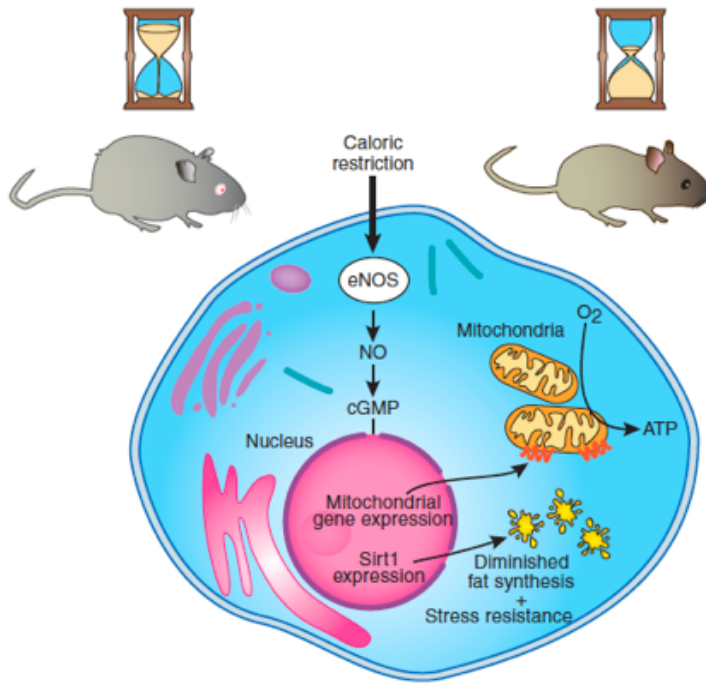


Fig 4. L'ossido nitrico come link tra la restrizione calorica e mitocondri. Nel tessuto adiposo e nella maggior parte dei tessuti la restrizione calorica induce la produzione di cGMP attraverso l'aumento dei livelli di eNOS. Anche l'espressione di geni mitocondriali e di Sirt1 è aumentata dalla restrizione calorica, inducendo l'aumento della biogenesi mitocondriale, la produzione di ATP e la promozione longevità Sirt1 mediata.

Questa alterazione correla con la riduzione dell'infusion rate di glucosio durante il clamp euglicemico nei topi eNOS^{-/-} rispetto ai wild type. Inoltre le consolidate osservazioni che l'espressione di eNOS è ridotta, nel tessuto adiposo sia bianco che bruno di diversi modelli animali di obesità e diabete, suggeriscono che possa esistere un link tra la disfunzione mitocondriale e l'insorgenza del diabete di tipo 2.

Studi su topi eNOS^{-/-} hanno dimostrato che il tessuto adiposo bruno è funzionalmente inattivo, e che l'esposizione degli animali al freddo non produce biogenesi mitocondriale inducendo una brusca diminuzione della temperatura corporea [48]. Inoltre, l'inattivazione del gene eNOS è sufficiente a ridurre la massa mitocondriale perfino nei tessuti che hanno livelli di espressione di nNOS basali, e probabilmente anche di iNOS, come il cervello, il fegato, il muscolo scheletrico e il cuore. Questo è accompagnato da una riduzione sia nel consumo basale di ossigeno che nei livelli a riposo di ATP, sia nei

tessuti con un metabolismo ossidativo che nei tessuti glicolitici, indicando che l'effetto è un fenomeno generale.

I topi eNOS^{-/-} rappresentano quindi un consolidato modello *in vivo* adatto a studiare fenomeni metabolici e di adattamento fisiologico in presenza delle tipiche alterazioni che caratterizzano la sindrome metabolica e di una ridotta funzionalità mitocondriale nei diversi tessuti.

SCOPO DELLA TESI

Durante il mio dottorato di ricerca mi sono occupata dello studio degli effetti dell'esercizio fisico in alcuni tessuti di topi eNOS^{-/-} in seguito a un protocollo di allenamento cronico di tipo aerobico. Ho studiato questi effetti in termini di dosaggi plasmatici, espressione genica e aumento del DNA mitocondriale in tessuto cardiaco, muscolare e adiposo. Mi sono inoltre occupata della valutazione degli effetti della somministrazione di ossido nitrico su cellule in coltura, HL1 e 3T3-L1. Partendo dal presupposto che l'esercizio fisico aumenta la sensibilità insulinica e la produzione di ossido nitrico, e che l'ossido nitrico è in grado di stimolare la biogenesi mitocondriale si è voluto analizzare se l'aumento della sensibilità insulinica e della mitocondriogenesi mediato dall'esercizio fisico fosse correlato al metabolismo dell'ossido nitrico. Inoltre si è voluto analizzare se le alterazioni che si osservano in vivo nel tessuto muscolare e nel tessuto cardiaco dei topi in termini di adattamento all'esercizio fisico prolungato, si verificano anche nel tessuto adiposo.

Disegno sperimentale

I topi eNOS^{-/-} rappresentano un modello *in vivo* in cui la biogenesi e la funzionalità mitocondriale risultano marcatamente ridotte nei diversi tessuti. Applicando a questi topi un protocollo di allenamento cronico è stato possibile studiare i meccanismi di adattamento dei loro tessuti all'esercizio fisico, nell'ipotesi che un'efficiente funzionalità mitocondriale sia un elemento chiave per una corretta risposta all'esercizio fisico in termini di metabolismo del glucosio e sensibilità insulinica. Le cellule HL-1 sono una linea cellulare stabilizzata di cardiomiociti murini ottenuta tramite isolamento da tumore atriale, che grazie alle sue particolari caratteristiche offre un modello per lo studio dei processi fisiologici che avvengono *in vivo* nel muscolo cardiaco. Esse infatti sono caratterizzate dall'espressione di geni specifici per il tessuto cardiaco e hanno la capacità di contrarsi spontaneamente e ritmicamente una

volta raggiunta la confluenza. Le cellule 3T3-L1 sono una linea di fibroblasti murini (Swiss albino) ottenuta per isolamento clonale da embrione di topo. In coltura con Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) addizionato con siero bovino fetale (FBS) 10% e penicillina-streptomicina 1%, hanno la morfologia di fibroblasti; in presenza di isobutilmetilxantina (IBMX), desametasone (DEXA) e insulina, le cellule 3T3-L1 possono essere indotte a un cambiamento sia morfologico che metabolico con deposizione di vacuoli lipidici, differenziando così in cellule adipocitiche e fornendo un modello *in vitro* per lo studio dei meccanismi fisiologici del tessuto adiposo.

Per studiare gli effetti dell'ossido nitrico sui processi metabolici di queste cellule ho messo a punto un protocollo di coltura cellulare che prevede la somministrazione cronica di una soluzione di DETA-NONOATO, una sostanza in grado di liberare ossido nitrico gassoso nel terreno di coltura. In seguito a tale somministrazione ho valutato alcuni parametri per comprendere gli effetti di tale sostanza sui processi metabolici cellulari. In particolare ho valutato la capacità di captazione del glucosio mediante [³H]-2-Deoxyglucose uptake e l'attivazione della mitocondriogenesi mediante l'analisi di espressione genica con Real Time PCR di alcuni geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale quali PGC-1 α , Tfam, NRF1, COX IV. Per investigare ulteriormente questi meccanismi regolatori ho messo a punto un protocollo di silenziamento di due geni coinvolti nella mitocondriogenesi (PGC-1 α e Tfam) per osservare gli effetti della riduzione dell'espressione di questi geni sulla capacità di captazione del glucosio sia in presenza che in assenza di DETA-NONOATO. Inoltre ho valutato la morfologia mitocondriale mediante immunofluorescenza per verificare se la somministrazione di ossido nitrico implicasse delle modificazioni nella struttura o nell'organizzazione dei mitocondri. Ho valutato i parametri di area e di elongazione mitocondriale e infine ho valutato e quantificato la traslocazione in membrana del trasportatore di glucosio GLUT4 mediante immunofluorescenza.

MATERIALI E METODI

Animali e protocollo di allenamento

Gli esperimenti sono stati condotti su 24 topi wild type e 24 topi eNOS^{-/-}. Gli animali sono stati gentilmente donati dal dottor Salvador Moncada del Wolfson Institute for Biomedical Research dell'University College di Londra. Durante il protocollo sperimentale sono stati stabulati 6 animali per gabbia ed è stato fornito loro cibo standard per roditori e acqua *ad libitum*. Le variazioni ponderali e la quantità di cibo assunta giornalmente sono stati attentamente monitorati per tutto il periodo dell'esperimento. Tutti gli esperimenti sono stati approvati dal comitato etico della nostra istituzione e sono stati condotti rispettando gli accordi di Helsinki per il trattamento umano degli animali da laboratorio.

Il programma di allenamento fisico è stato condotto in un profondo contenitore di plastica riempito d'acqua mantenuta ad una temperatura compresa tra i 33°C e i 35°C . L'esercizio fisico a cui sono stati sottoposti gli animali è costituito in un periodo di nuoto di 90 minuti al giorno, per 5 giorni alla settimana, per 6 settimane. Le sessioni di nuoto sono state attentamente supervisionate per evitare il galleggiamento passivo e il numero di topi in vasca per sessione è stato mantenuto basso per evitare che il gang swimming diminuisse lo sforzo di ciascun topo. I topi sono stati accuratamente asciugati dopo ogni sessione di nuoto. I prelievi di sangue per la determinazione dei parametri biochimici sono stati effettuati dalla vena della coda. Gli animali sono stati sacrificati alla fine del periodo di allenamento e sono stati asportati i diversi tessuti, immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al loro processamento.

Prelievi di sangue e saggi biochimici

Il sangue è stato prelevato dalla vena caudale di ciascun topo, mediante l'utilizzo di capillari eparinizzati (Vitrex). Il siero, ottenuto dalla centrifugazione dei campioni di sangue a 6000 rpm per 5 min a temperatura ambiente, è stato utilizzato per la determinazione dei parametri biochimici. I livelli sierici di insulina sono stati misurati con metodo RIA (Linco Research). I livelli di glicemia e i livelli di acidi grassi liberi sono stati misurati con Glucose Analyzer (Beckman Coulter Inc. CA, USA) o con il kit NEFA-C (Wako Chemicals), rispettivamente.

Test di tolleranza all'insulina (ITT)

Dopo un digiuno di circa 8 ore è stato inserito un catetere nella giugulare destra di ciascun animale per permettere l'infusione di insulina e glucosio e la temperatura del corpo è stata mantenuta a 37°C. È stata infusa una soluzione di insulina (Actrapid, Novo, Bagsvaerd, Denmark) alla concentrazione di $15\text{mIU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ e 20% di glucosio per mantenere il plasma entro un valore euglicemico. Sono stati effettuati prelievi di sangue dalla vena caudale al tempo 0, e dopo 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 minuti dall'infusione con insulina per il monitoraggio della glicemia.

Saggio di incorporazione tissutale del glucosio

$10\mu\text{Ci}$ di glucosio marcato radioattivamente (2-Deossi- ^3H]-glucosio, Amersham Biosciences) e diluito in 200 μl di soluzione fisiologica sterile è stato iniettato nella vena della coda dei topi alla fine del periodo di training o di sedentarietà. In metà degli animali in studio, 5 minuti dopo il bolo di glucosio marcato, è stata iniettata intraperitoneo una soluzione di insulina umana (Lilly Research Laboratories; 0.5U/Kg di peso corporeo) I topi sono stati sacrificati, i tessuti sono stati raccolti e congelati istantaneamente in azoto liquido. Per determinare l'accumulo tissutale di 2-Deossi- ^3H]-glucosio sotto forma di 2 DG-6-fosfato si è sfruttato la sua insolubilità nel sistema reagente Somogy. Una quantità di tessuto di circa 50 mg è stata omogeneizzata in 500 μl di NaOH (1N) a 80°C; i campioni sono stati neutralizzati con 500 μl di HCl (1N). In seguito due aliquote della soluzione neutralizzata sono state addizionate rispettivamente a 1 ml di HClO_4 (1M) e a 1 ml di $\text{ZnSO}_4/\text{BaOH}_2$. La radioattività è stata

misurata nel sovranatante con conta al β -counter (Wallac-PerkinElmer, MA, U.S.A.) dopo aver centrifugato le due aliquote, differientemente trattate.

Colture cellulari e somministrazione di DETA-NONOATO 100 μ M

Le cellule HL1 sono state mantenute in coltura con terreno Claycomb Medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS) completato con siero fetale bovino al 10%, L-glutammina 2 mmol/L e norepinefrina 0.1 mmol/L. Le piastre e le fiasche in cui sono state seminate le cellule erano state precedentemente trattate con gelatina e fibronectina allo 0.02% per un'ora a 37° C prima della semina. Le cellule sono state poi mantenute in coltura in incubatore sterile a 37° C e in presenza di 5% CO₂.

Le cellule 3T3 sono state inizialmente piastrate in multi-well da 24 pozzetti e coltivate in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) addizionato con siero bovino fetale (FBS) 10% e penicillina-streptomicina 1%. Per indurre il differenziamento delle cellule 3T3-L1 in adipociti sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

. *isobutilmetilxantina (IBMX)*: ha il compito di aumentare il turn over del cAMP attraverso l'inibizione dell'enzima deputato alla sua degradazione, l'AMP ciclico fosfodiesterasi. L'innalzamento del cAMP determina l'attivazione del fattore di trascrizione C/EBPd;

. *desametasone (DEXA)*: è un glucorticoide ed è in grado di stimolare i processi differenziativi attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione C/EBPb;

. *insulina*: è in grado di stimolare il differenziamento in adipociti attraverso l'induzione dell'attività di cascate fosfo-chinasiche.

La differenziazione delle cellule NIH 3T3-L1 viene fatta partire dal giorno successivo a quello in cui le cellule sono a completa confluenza. Le cellule vengono coltivate in medium DMEM, addizionato a FBS 10% e a IBMX 500 mM, DEXA 1 mM, INSULINA 2 mM. Questo è considerato il primo giorno di differenziamento. L'utilizzo di questo cocktail ormonale determina il rientro delle cellule nel ciclo replicativi, per cui subiscono dagli uno ai

due cicli di duplicazione . Dopo tre giorni il medium di coltura viene sostituito con terreno fresco nel quale viene eliminato IBMX, mentre DEXA e insulina continuano ad essere aggiunti al DMEM. Il terreno fresco viene sostituito fino al 11°-12° giorno quando la differenziazione è completa. Già a partire dal terzo giorno è possibile rilevare i primi cambiamenti morfologici che si accentuano via via fino a raggiungere il fenotipo completamente differenziato.

La somministrazione di DETA-NONOATO (Sigma Aldrich) è avvenuta sciogliendo il composto liofilizzato al momento della somministrazione (per evitare la compromissione della sua attività di liberazione di NO gassoso) in PBS 1X sterile e aggiungendolo direttamente ai pozzetti delle cellule ad una concentrazione finale 100 μ M.

Estrazione dell'RNA

L'RNA delle cellule e dei tessuti prelevati dai topi è stato estratto mediante l'uso di colonnine del RNeasy MiniKit (QIAGEN, Hilden, Germany). I tessuti sono stati precedentemente lisati in QIAzol Lysis Reagent (50mg di tessuto in 1ml di lisante) mediante omogenizzazione con TissueLyser (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Le cellule sono state precedentemente lisate in 300 μ l di RLT Buffer. Ai campioni è stato aggiunto un uguale volume di etanolo al 70%, quindi ogni campione è stato trasferito in una provetta contenente una RNeasy Spin Column. Dopo aver centrifugato a 10000 rpm per 15 secondi a T° ambiente il liquido depositatosi sul fondo della provetta è stato scartato, la membrana che trattiene l'RNA è stata lavata con due diversi buffer, quindi l'RNA è stato recuperato aggiungendo 30 μ l di acqua RNase-free. L'RNA estratto è stato analizzato al Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL, USA) per determinarne la concentrazione e la qualità.

Trattamento con DNAsi

Per eliminare un'eventuale contaminazione da DNA i campioni sono stati trattati con DNAsi utilizzando il kit Turbo DNA-free (Ambion, Austin, TX, USA). Sono stati prelevati 2 µg di RNA per ogni campione, al quale sono stati aggiunti 3 µl di buffer di reazione contenuto nel kit e 1 µl di DNAsi, quindi il volume è stato portato a 30 µl aggiungendo acqua RNase-free. I campioni sono stati posti in un termociclatore a 37°C per 30 minuti. Sono stati aggiunti 3 µl di agente inattivante, che è stato fatto agire per 2 minuti a temperatura ambiente, quindi i campioni sono stati centrifugati a 10.000g per 90 secondi. L'RNA (30 µl) è stato trasferito in una nuova provetta per essere sottoposto a retrotrascrizione.

Retrotrascrizione

Ai campioni di RNA trattato con DNAsi sono stati aggiunti 150 ng di random primers (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e 4,5 µl di acqua RNase-free. I campioni sono stati posti a 70 °C per 5 minuti, in seguito la temperatura è stata abbassata a 4°C. A questo punto alla miscela di reazione sono stati aggiunti 10 µl di M-MLV RT Buffer (Promega), 0.5 mmol/l di dNTPs (Promega), 200 U di M-MLV RT(Promega) e 20 U di Rnasin (Promega). Il volume finale della reazione è di 50 µl. I campioni stati posti a 37°C per un'ora. Quindi la temperatura è stata innalzata a 95°C per 2 minuti.

Il cDNA sintetizzato è stato conservato a -20°C.

Real-Time PCR

Il cDNA è stato utilizzato per compiere studi di espressione genica per i geni implicati nella mitocondriogenesi (PGC-1 α , TFAM, NRF1, COX IV). Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando DNA Engine Opticon TM 2 Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research, Waltham, MA, USA). Ciascuna reazione è stata effettuata in un volume finale di 20

µl contenenti 5µl di cDNA alla concentrazione di 2 ng/µl, 10µl di Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life-Technologies, Paisley, UK), 5µl di una soluzione contenente i primers forward e reverse concentrati 4X rispetto alle concentrazioni finali. Ogni reazione prevedeva il seguente protocollo: 95°C per 2 minuti, 45 cicli a 95°C x 15 secondi, T. annealing x 30 secondi, 72°C x 30 secondi. La curva standard è stata realizzata utilizzando cDNA di un campione positivo alla concentrazione di 10ng/µl diluito serialmente (1:10) in modo da ottenere 5 campioni che sono stati utilizzati per la quantificazione relativa in Unità Arbitrarie. Al termine di ciascuna amplificazione è stata eseguita l'analisi della curva di melting per verificare la specificità della reazione.

I risultati ottenuti sono stati normalizzati dividendo le unità arbitrarie di mRNA di ciascun gene di interesse per la quantità di rRNA della subunità 18s presente nello stesso campione. Ogni campione è stato analizzato in duplicato e un controllo negativo è stato incluso in ogni reazione.

Sono stati utilizzati primers intron-spanning specifici e le caratteristiche di ciascuna coppia di primer sono riassunte nella seguente tabella:

PRIMER	SEQUENZA	bp	Ta °
PGC-1α	F:CCACTACAGACACCGCACACACC R:TTCATCCCTCTTGAGCCTTTCG	145	57
NRF	F:TATCCGAAAGAGACAGCAGACAC R:CTTGAAGACAGGGTTGGGTTTGG	130	62
TFAM	F:AAGACCTCGTTCAGCATATACATT R:TTTTCCAAGCCTCATTTATCAAGC	105	55
COXIV	F:TTCAGTTGTACCGCATCCAG R:GGATGGGGCCATACACATAG	153	55
AMPK	F:CAGGTGATCAGCACTCCGACAG R:GGGCATCCAGCAGCACATTC	208	60
ATPs	F:AACATTGTTGGCAATGAGCA R:ATGTGACCCGTGAAGACCTC	203	55
SIRT1	F:GACGCTGTGGCAGATTGTTA R:GGAATCCCACAGGAGACAGA	150	57
18S	F:CGGCTACCACATCCAAGGAA R:GCTGGAATTACCGCGGCT	187	60

Tabella 1. Primer per Real-Time PCR. Sono indicati, per ciascun primer: nome, sequenza forward, sequenza reverse, lunghezza dell'amplificato in paia di basi e temperatura di annealing in gradi centigradi.

[³H]-2-Deoxyglucose uptake

Prima di iniziare gli esperimenti, le cellule sono state lasciate per 6 ore in coltura con terreno privo siero, quindi sono state stimolate per 30 minuti in incubatore sterile a 37° C con insulina 300 nM (per quanto riguarda le cellule HL-1) e 2µM (per quanto riguarda le cellule 3T3-L1) in PBS 1X. In seguito sono state lavate rapidamente con PBS 1X e la captazione del glucosio è stata avviata aggiungendo nel terreno di coltura il 2-deossi-[³H]D-glucosio (Amersham-Biosciences, Piscataway, NJ, USA) alla concentrazione di 1.5 µCi/ml e glucosio freddo alla concentrazione di 50 µM. Le cellule sono state quindi incubate per 15 min a 37°C. La reazione è stata poi bloccata ponendo le piastre in ghiaccio e lavando rapidamente 2 volte le piastre con PBS freddo (~4°C). Le cellule sono state solubilizzate con l'aggiunta di una soluzione di NaOH 0.5M e la radioattività è stata misurata con conta al β-counter (Wallac-PerkinElmer, MA, U.S.A.).

Small Interference RNA

Le cellule sono state seminate e coltivate fino al raggiungimento di una confluenza di circa il 60%. Al terreno di coltura normale è stata aggiunta la miscela di trasfezione contenente il costrutto silenziante per il gene specifico. E' stato utilizzato il protocollo di trasfezione Thermo Scientific Dharmacon DharmaFECT siRNA Transfection Protocol (Dharmacon). Brevemente l'oligo RNA silenziante (50nM concentrazione finale) viene incubato per 5 minuti a temperatura ambiente assieme al terreno serum free OPTI-MEM (GIBCO Invitrogen) e in una provetta separata viene incubato il transfettante DHARMAFECT assieme anch'esso a OPTI-MEM serum free. Una volta trascorsi i 5 minuti le due miscele vengono mescolate e incubate nuovamente a temperatura ambiente per 20 minuti. In seguito la miscela silenziante così ottenuta viene aggiunta al terreno di coltura con

cui sono già seminate le cellule e lasciata in incubazione sterile a 37° C e 5% CO₂ per almeno 72 ore. In seguito l'RNA viene estratto come precedentemente descritto e l'espressione genica viene analizzata in Real Time PCR per verificare l'avvenuto silenziamento specifico del gene desiderato. Questo protocollo è stato messo a punto per i geni PGC1 PGC-1 α e TFAM.

Analisi dell' mtDNA

I mitocondri sono stati estratti dai diversi tessuti come descritto in [a]. L'estrazione e la purificazione del DNA mitocondriale dai mitocondri lisati sono state eseguite come riportato in [b]. Aliquote di mtDNA sono state caricate in gel di agarosio (1,2%) colorato con bromuro di etidio e analizzato usando il densitometro QuickImage (Packard). I livelli di mtDNA sono stati normalizzati per il contenuto proteico, che è stato misurato usando la tecnica del saggio proteico con l'acido bicinconinico (Perbio, Benzos, France).

Colorazione mitocondriale con Mito-Tracker Green

Prima dell'osservazione al microscopio le cellule sono state lavate dal medium di coltura con PBS 1X e incubate con una soluzione 100nM di Mitotracker Green FM (Molecular Probes) per 30 minuti a 37°C e 5% di CO₂.

Il Mitotracker Green FM è stato visualizzato eccitando i campioni a una lunghezza d'onda pari a 488nm, mentre la lunghezza di emissione è di circa 550- 700nm.

Le immagini sono state acquisite tramite microscopia in epifluorescenza con un microscopio invertito (TE-2000E, Nikon), obiettivo 60X PlanApo 1.45 NA, cubo dicroico passabanda FITC (emissione 515-555 nm), camera monocromatica CCD Nikon DS-2MBwc. Sono state selezionate 10 cellule per condizione ed è stata eseguita la scansione di un singolo

piano focale. Le immagini raccolte sono state elaborate tramite il software di analisi di immagini Image-pro Plus 6.0 al fine di ridurre il rumore generato dai piani focali adiacenti a quello selezionato. Vengono applicati nell'ordine Linear Contrast Stretching, Flatten filter, HiGauss filter e Median filter. Le immagini così ottenute sono state elaborate per mezzo del software di acquisizione ed elaborazione immagini NIS-Elements AR 2.30, procedendo ad una binarizzazione dell'immagine tramite sogliatura, avendo cura che la morfologia mitocondriale fosse conservata al massimo. Si è proceduto quindi alla restrizione degli oggetti individuati dal software escludendo oggetti di area inferiore a $25 \mu\text{m}^2$ e superiori ai $2000 \mu\text{m}^2$. Gli oggetti risultanti vengono raggruppati e suddivisi in classi per i parametri area ed elongazione (rapporto tra massimo e minimo diametro Feret).

Immunofluorescenza e quantificazione della traslocazione di GLUT4

Le cellule 3T3-L1 sono state coltivate facendole aderire su vetrini sterili. Prima di iniziare gli esperimenti, le cellule sono state lasciate per 2 ore in coltura con DMEM/F12 privo siero, quindi sono state stimolate per 30 minuti in incubatore sterile a 37° con insulina $2 \mu\text{M}$ (in PBS 1X). Dopo la stimolazione le cellule sono state immediatamente fissate in paraformaldeide al 4% in PBS 1X a 37°C per dieci minuti. I vetrini sono stati saturati in PBS 1% con Horse Serum al 5% e BSA al 5% per un'ora e sottoposti al seguente protocollo di colorazione per Glut4. Si eseguono due lavaggi in PBS 1X di 3 minuti ciascuno e si procede con l'ibridazione all'anticorpo primario. I vetrini vengono incubati con l'anticorpo Goat polyclonal anti-Glut4 (N-20) sc-1606 (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:200 in PBS 1X per un'ora, poi si eseguono due lavaggi in PBS 1X di 3 minuti ciascuno e i vetrini vengono incubati con l'anticorpo secondario Rabbit Anti-Goat IgG Alexa fluor 488 (Molecular probes, Invitrogen) diluito 1:500 in PBS 1X per un'ora. Si eseguono tre lavaggi in PBS 1X di 3 minuti ciascuno, i vetrini vengono incubati per 5 minuti con Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate (Molecular Probes,

Invitrogen) diluito 1,5 mg/ml, si esegue un lavaggio veloce in acqua distillata e si montano i vetrini su un vetrino portaoggetto con ProLong® Gold antifade mounting medium (Molecular Probes, Invitrogen). I vetrini così preparati sono stati analizzati per valutare la localizzazione della fluorescenza con un microscopio confocale a scanning laser Leica (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Germany). Le immagini sono state acquisite selezionando lo stack maggiormente rappresentativo del centro della cellula fissata e nelle cellule positive per la colorazione con anti-GLUT4 è stata calcolata la localizzazione della fluorescenza quantificando il segnale fluorescente proveniente dalle diverse aree della cellula utilizzando il software ImageJ.

Estrazione proteica e analisi Western blot

Dopo il trattamento le cellule sono state lavate in PBS 1X e stimolate con o senza insulina 300 nM per 5 minuti a 37°C. Le cellule sono state quindi immediatamente solubilizzate con un tampone di estrazione per proteine (Tris pH 7.5 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, EGTA 2mM, Triton 0.5%) contenente inibitori per fosfatasi e proteasi (PhosSTOP e Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) e gli estratti sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Per ogni campione, 30 µg di proteine sono state separate tramite corsa elettroforetica SDS-PAGE e blottate su membrana in PVDF con tecnica semi-dry tramite il TRANS-BLOT® SD di Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Le membrane blottate sono state usate per l'ibridazione con gli anticorpi. L'Akt totale e la phospho-Akt Ser⁴⁷³ sono state rivelate rispettivamente con gli anticorpi di Cell Signalling Technology #9272 e #4060 (Cell Signaling Technology, Beverly MA). Come anticorpi secondari sono stati usati gli anticorpi anti-rabbit e anti-mouse coniugati a perossidasi di

rafano prodotti dal Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Tutti gli anticorpi sono stati opportunamente diluiti seguendo le istruzioni riportate dalle ditte produttrici.

Una volta ibridate con l'anticorpo secondario, le membrane sono state lavate e incubate per 5 min con il substrato ECL (enhanced chemoluminescence) Immobilon® Western HRP (Millipore Corporate, Billerica, MA, USA) ed esposte alla lastra Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Una volta sviluppate le lastre è stata effettuata l'analisi densitometrica delle bande immunoreattive con il software "Molecular Analyst" (Bio-Rad Laboratoris, Inc., Marnes La Coquette, France).

Transfezione delle cellule HL-1 con vettore p-CMV-GLUT4-myc

Le cellule HL-1 sono state opportunamente contate seminate in piastre da 24-well a una densità di 160000 cellule per pozzetto in terreno di coltura Claycomb Medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS) privo di antibiotici. 24 ore dopo la semina le cellule sono state trasfettate utilizzando il protocollo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) che prevede l'incubazione per 8 ore con una miscela di trasfezione costituita da 1,5 µg di plasmide pCMV-GLUT4myc e 2µl di Lipofectamine 2000 (Invitrogen) diluiti in 100µl di Opti-MEM® I Reduced Serum Media (GIBCO, Invitrogen). In seguito all'incubazione con la miscela transfettante il terreno è stato sostituito con Claycomb Medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS) completo e le cellule sono state sottoposte al protocollo di trattamento con DETA-NO. La somministrazione di DETA-NONOATO (Sigma Aldrich) è avvenuta sciogliendo il composto liofilizzato al momento della somministrazione (per evitare la compromissione della sua attività di liberazione di NO gassoso) in PBS 1X sterile e aggiungendolo direttamente ai pozzetti delle cellule ad una concentrazione finale 100 µM.

Immunofluorescenza e quantificazione della traslocazione dell'antigene myc in membrana

Le cellule sono state coltivate facendole aderire su vetrini sterili opportunamente trattati con gelatina e fibronectina per permetterne l'adesione. Prima di iniziare gli esperimenti, le cellule sono state lasciate per 2 ore in coltura con DMEM/F12 privo siero, quindi sono state stimulate per 30 minuti in incubatore sterile a 37° con insulina 300 nM (in PBS 1X). Dopo la stimolazione le cellule sono state immediatamente fissate in paraformaldeide al 4% in PBS 1X a 37°C per dieci minuti. I vetrini sono stati saturati in PBS 1% con Horse Serum al 5% e BSA al 5% per un'ora e sono stati sottoposti al seguente trattamento per la colorazione di myc. Si eseguono due lavaggi in PBS 1X di 3 minuti ciascuno e si procede con l'ibridazione all'anticorpo primario. I vetrini vengono incubati con l'anticorpo Myc-Tag (9B11) Mouse mAb (Cell Signaling Technology, Inc.) diluito 1:200 in PBS 1X per un'ora, poi si eseguono due lavaggi in PBS 1X di 3 minuti ciascuno e i vetrini vengono incubati con l'anticorpo secondario Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG (Molecular probes, Invitrogen) diluito 1:500 in PBS 1X per un'ora. Si eseguono tre lavaggi in PBS 1X di 3 minuti ciascuno, i vetrini vengono incubati per 5 minuti con Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate (Molecular Probes, Invitrogen) diluito 1,5 mg/ml, si esegue un lavaggio veloce in acqua distillata e si montano i vetrini su un vetrino portaoggetto con ProLong® Gold antifade mounting medium (Molecular Probes, Invitrogen). I vetrini così preparati sono stati analizzati per valutare la localizzazione della fluorescenza con un microscopio confocale a scanning laser Leica (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Germany). Le immagini sono state acquisite selezionando lo stack maggiormente rappresentativo del centro della cellula fissata. Nelle cellule positive per la colorazione con anti-myc è stata calcolata la localizzazione della

fluorescenza quantificando il segnale fluorescente proveniente dalle diverse aree della cellula utilizzando il software ImageJ.

Analisi statistiche

Tutte le analisi sono state effettuate almeno in duplicato. Le differenze sono state analizzate mediante test T di Student a due code e sono state considerate le significatività $p < 0,05$ (*; †) e $p < 0,001$ (***)).

- a. Pallotti, F. and G. Lenaz, *Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines*. Methods Cell Biol, 2001. **65**: p. 1-35.
- b. Nisoli, E., et al., *Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide*. Science, 2003. **299**(5608): p. 896-9.

RISULTATI

VARIAZIONI METABOLICHE INDOTTE DALL'ESERCIZIO FISICO

Peso corporeo e parametri endocrino-metabolici

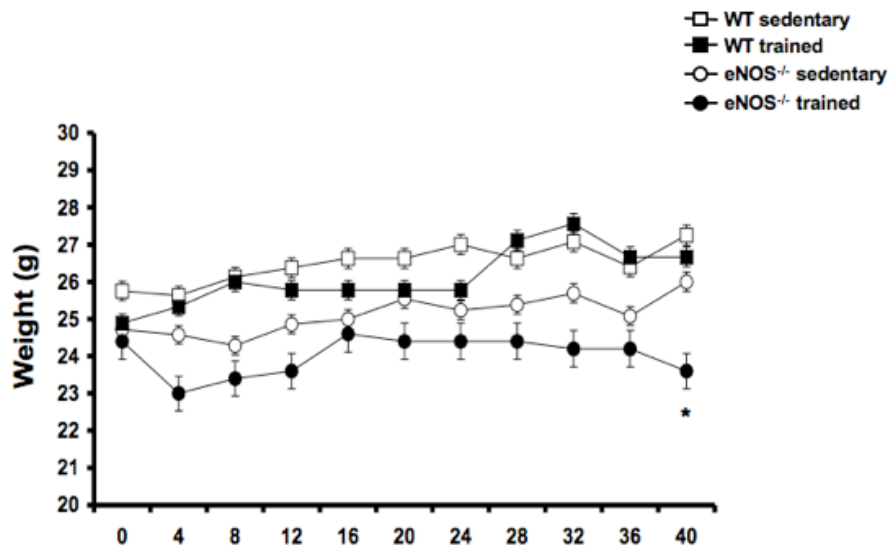
Non si sono osservate significative variazioni ponderali in condizioni basali tra i due ceppi di animali, dopo il periodo di training non si sono rilevate sostanziali modificazioni del peso corporeo nei topi WT. Gli eNOS -/- mostrano sempre un peso di poco inferiore ai WT e questa differenza si fa più pronunciata alla fine del programma di training. Alla fine dell'esercizio il peso nei topi eNOS-/- allenati è risultato significativamente inferiore rispetto ai topi WT allenati.

I livelli plasmatici di glucosio non differivano, in condizioni basali, tra i diversi gruppi di topi. L'esercizio fisico non è in grado nel topo eNOS -/- di produrre un aumento della sensibilità all'insulina, infatti la caduta glicemica dopo i.p. ITT è risultata significativamente più pronunciata nei topi WT sottoposti al programma di training rispetto agli eNOS -/- sottoposti allo stesso programma di allenamento.

I livelli di insulina nel plasma sono risultati aumentati nei topi eNOS-/- rispetto ai WT sia in condizioni di sedentarietà (ove tale differenza è risultata significativa), che in seguito ad allenamento.

Per quanto riguarda i livelli di FFA si è osservato che, in condizioni di sedentarietà, i valori plasmatici di acidi grassi erano tendenzialmente aumentati nel ceppo eNOS-/- rispetto ai WT sebbene non in maniera significativa. Tale differenza ha assunto un rilievo statisticamente significativo tra i due ceppi al termine del periodo di allenamento. L'analisi statistica dei differenti livelli plasmatici di FFA all'interno dello stesso ceppo tra allenati e sedentari non è risultata significativa né nel caso dei topi eNOS -/-, né per i WT. Dopo insulina i.p si è riscontrata una significativa riduzione dei livelli di FFA nei topi WT dopo allenamento, mentre la riduzione dei livelli di FFA è risultata meno evidente negli animali eNOS -/- sottoposti ad esercizio.

A



B

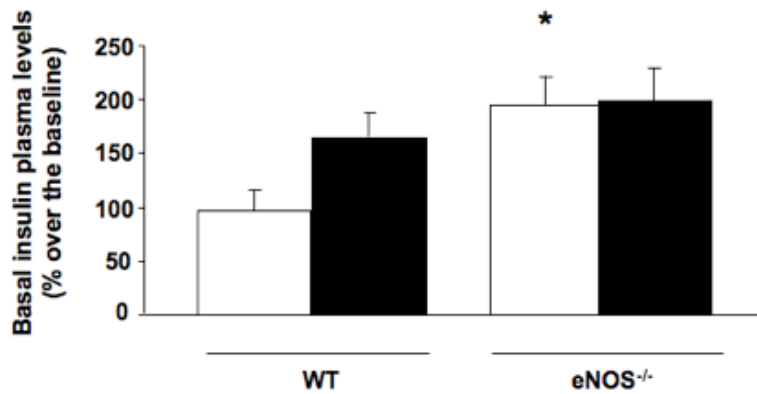
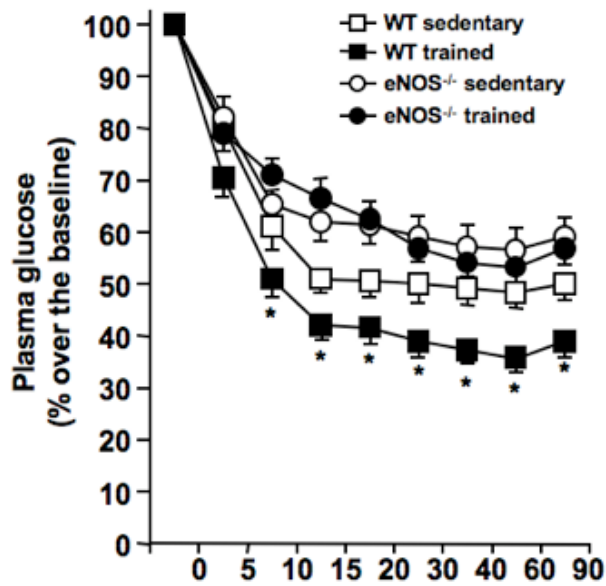


Tavola 1. Variazioni del peso corporeo e dosaggio di insulina plasmatica. Sono stati misurati ad intervalli regolari di 5 giorni i pesi corporei (A) degli animali. Al termine del periodo di allenamento sono stati misurati anche i livelli plasmatici di insulina ne plasma (B).

A



B

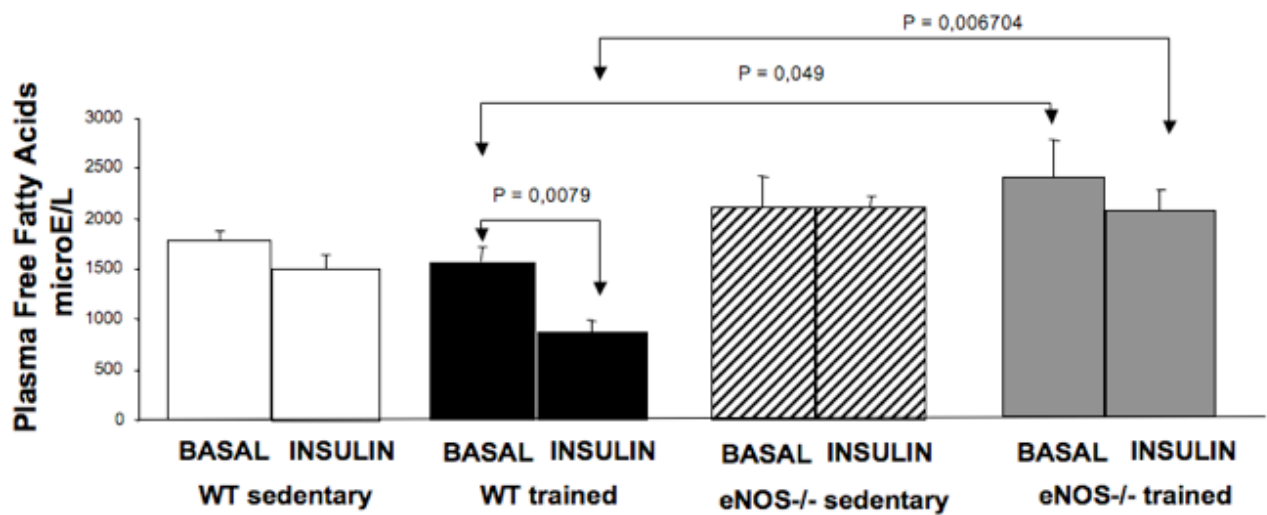


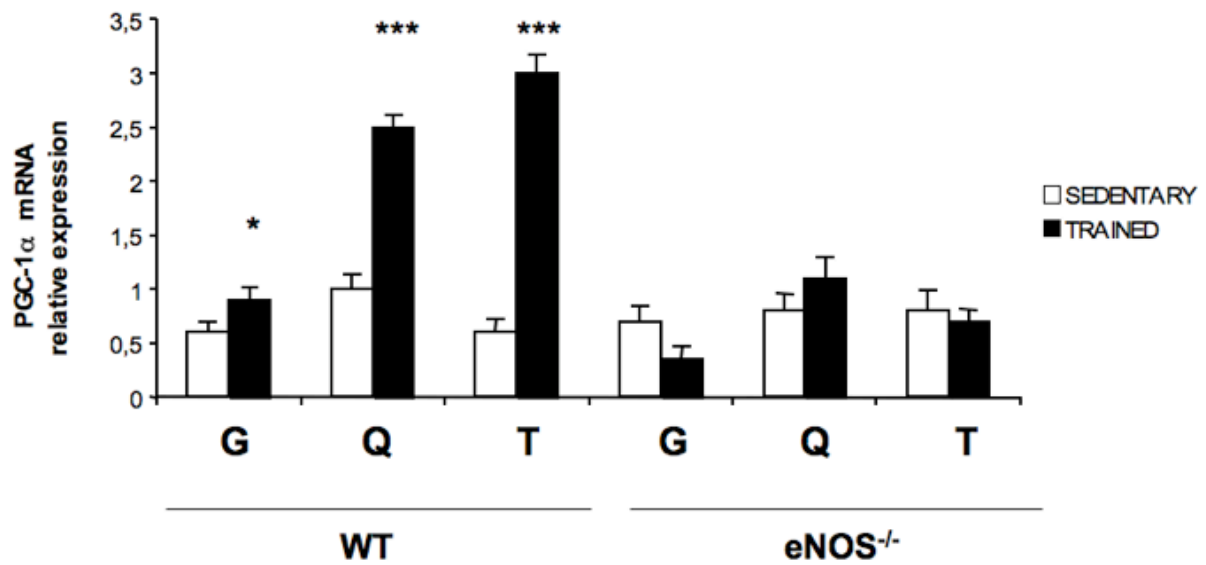
Tavola 2. Saggio ITT e dosaggio di acidi grassi liberi nel plasma. Al termine del periodo di allenamento sono stati misurati ad intervalli regolari (in ascissa il tempo espresso in minuti) i livelli plasmatici di glucosio in condizioni di infusione di insulina (A). Sono stati misurati anche i livelli plasmatici di acidi grassi liberi nel siero, sia in condizioni basali che in seguito ad iniezione con insulina (B).

RUOLO DI eNOS SULLA SENSIBILITÀ ALL'INSULINA E SULLA BIOGENESI MITOCONDRIALE NEL MUSCOLO

Espressione genica

La biogenesi mitocondriale, valutata attraverso la quantificazione dell'mRNA di specifici geni coinvolti in tale processo nei muscoli di topi sedentari o sottoposti al protocollo di allenamento, ha mostrato nell'animale eNOS $-/-$ una depressione del fenomeno in risposta all'esercizio. Infatti i livelli di espressione di PGC-1 α nel topo eNOS $-/-$ allenato sono significativamente più bassi rispetto a quanto avviene nel WT, che risponde all'esercizio prolungato raddoppiando e triplicando rispettivamente i livelli di espressione basale a livello del quadricipite e del tibiale. Per quanto riguarda AMPK e SIRT-1 l'allenamento aumenta l'espressione genica nei muscoli dei topi wild type mentre nei muscoli dei topi eNOS $-/-$ non si verifica questa induzione in seguito all'allenamento.

A



B

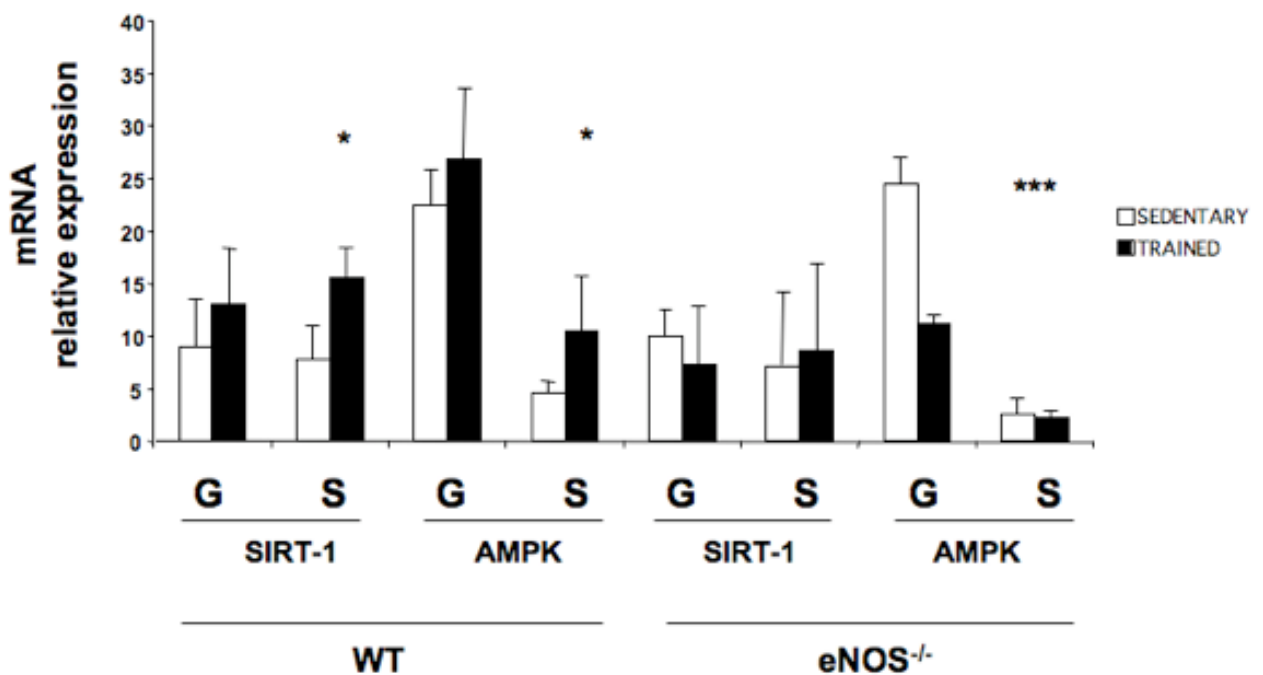


Tavola 3. Espressione genica in muscolo. A. Sono stati misurati i livelli di espressione genica di PGC-1 α in gastrocnemio (G) e quadricipite (Q). B. Sono stati misurati i livelli di espressione genica di SIRT-1 e AMPK in gastrocnemio (G) e soleo (S)

Quantificazione del mtDNA

E' stato quantificato il DNA mitocondriale nei diversi muscoli estratti dai topi in seguito all'allenamento e si è osservato che l'allenamento ha indotto un aumento significativo nel contenuto di mtDNA in muscoli gastrocnemio, diaframma e tibiale dei topi WT, mentre ciò non è evidente nei topi eNOS $-/-$ eccetto che per una lieve, anche se significativa elevazione del mtDNA del diaframma.

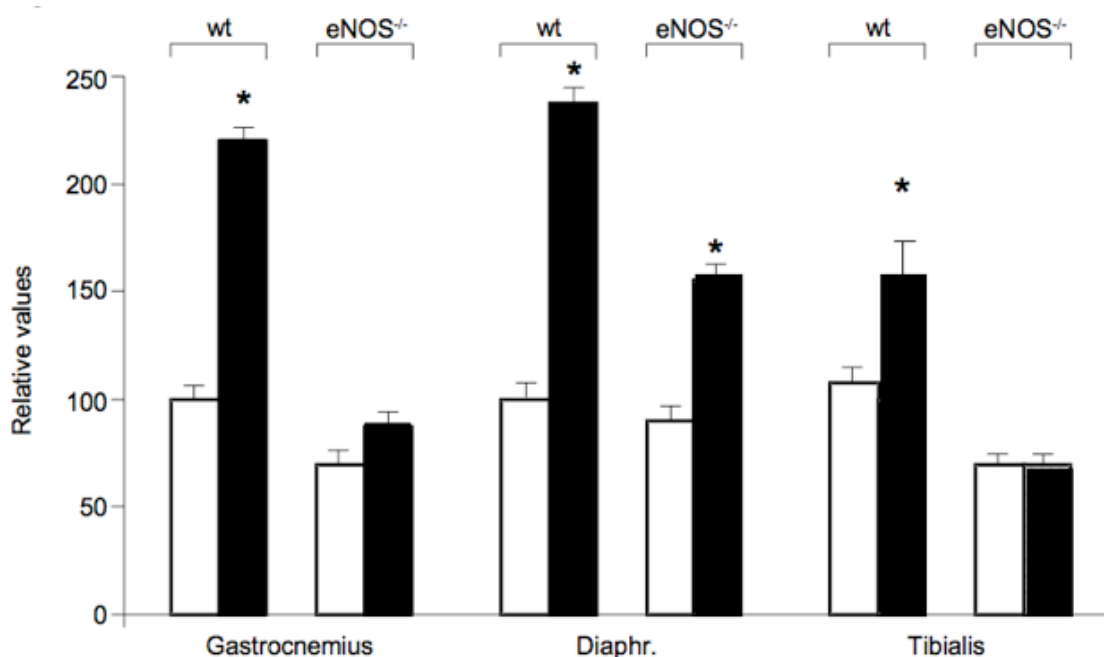
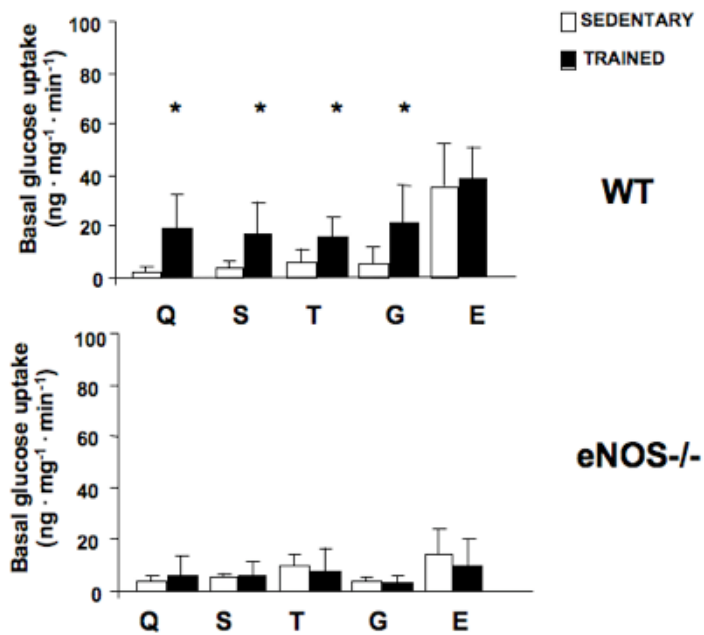


Tavola 4. Quantificazione del mtDNA in muscolo. E' stato quantificato il mtDNA nei muscoli gastrocnemio, diaframma e tibiale di topi WT ed eNOS $-/-$ in condizioni di sedentarietà (colonne bianche) o in seguito ad allenamento (colonne nere). I livelli sono espressi considerando come 100% il livello misurato in topi WT sedentari.

Glucose uptake

Il saggio di incorporazione tissutale del 2-deossi [³H]D-glucosio ha mostrato una capacità di captazione del glucosio superiore nei muscoli dei topi wild type rispetto ai topi eNOS $-/-$, sia in condizioni basali che insulino-stimate. Capacità che aumentava ulteriormente nei topi WT (ma non negli eNOS $-/-$) in seguito al protocollo di allenamento.

A.



B.

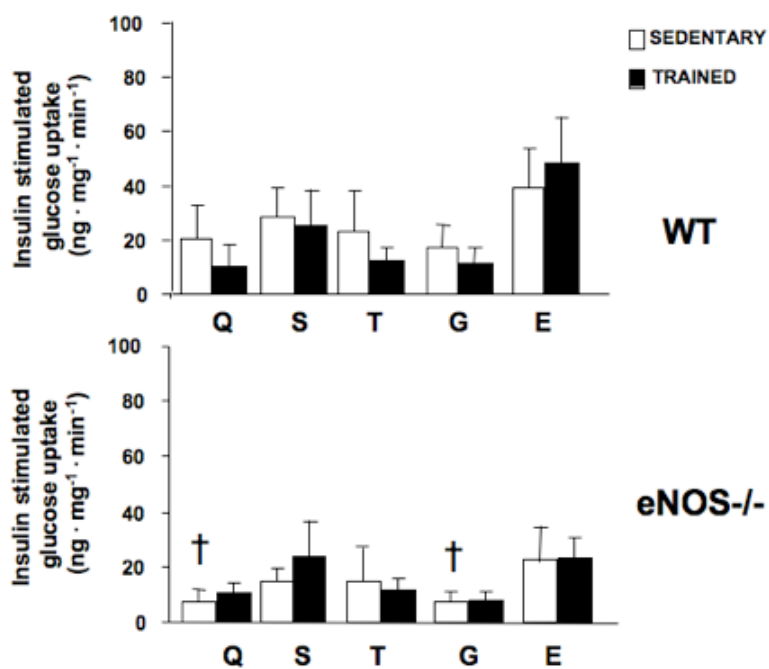


Tavola 5. Glucose uptake in muscolo. E' stata misurata la capacità di captazione tissutale di glucosio in muscoli quadricipite (Q), soleo (S), tibiale (T), gastrocnemio (G) ed EDL (E) sia in condizioni basali (A) che in seguito a iniezione i.p. di insulina (B)

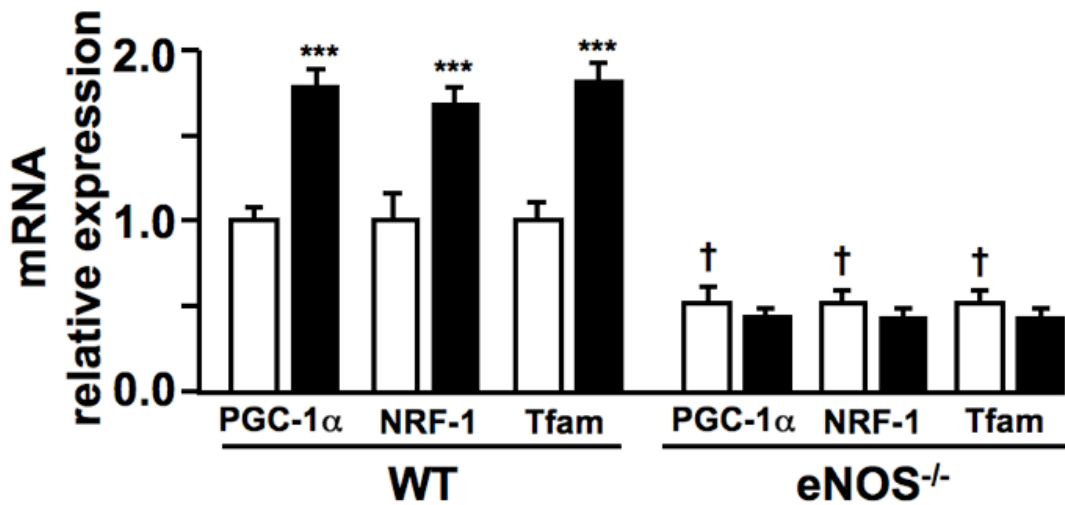
RUOLO DI eNOS SULLA SENSIBILITÀ ALL'INSULINA E SULLA BIOGENESI MITOCONDRIALE NEL CUORE

STUDI IN VIVO

Espressione genica e quantificazione del mtDNA

L'analisi dell'espressione genica sui cuori estratti dai topi sottoposti all'allenamento ha mostrato un significativamente ridotto livello di espressione genica di PGC-1 α , NRF-1 e Tfam nei topi eNOS $-/-$ rispetto ai WT anche in condizioni di sedentarietà. Dopo il programma di esercizio fisico i livelli di espressione di questi tre geni sono drasticamente aumentati solo nel cuore dei topi WT mentre nei cuori dei topi eNOS $-/-$ i livelli sono rimasti simili a quelli dei topi non allenati. La quantificazione del mtDNA ha mostrato un ridotto contenuto di mtDNA nei cuori dei topi eNOS $-/-$ rispetto ai wild type anche in condizioni di sedentarietà, differenza che si è drasticamente accentuata in seguito all'allenamento che ha indotto un significativo aumento del mtDNA solo nei cuori dei topi WT.

A



B

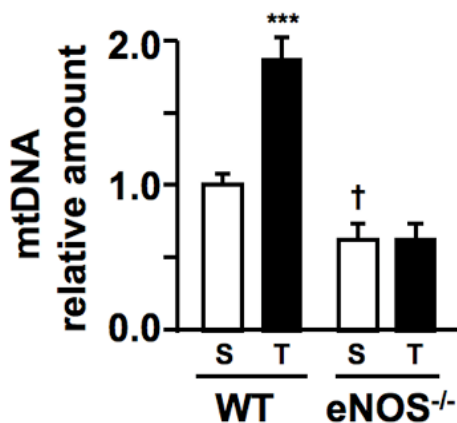


Tavola 6. Espressione genica e quantificazione del mtDNA nel tessuto cardiaco. A. Sono stati misurati i livelli di espressione genica di PGC-1α, NRF-1 e Tfam nei cuori dei topi WT ed eNOS^{-/-} sedentari (colonne bianche) e allenati (colonne nere). B. E' stato quantificato il mtDNA nei cuori dei topi considerando come valore unitario il livello misurato in topi WT sedentari.

Glucose uptake

La captazione di 2-deossi-[³H]D-glucosio è stata misurata sia in condizioni basali che durante iperinsulinemia prolungata. Abbiamo osservato una più alta e significativa captazione del tracciante nei cuori dei topi wild type rispetto ai topi eNOS^{-/-}, sia a livello basale che in condizioni insulino-stimolate. I cuori dei topi eNOS^{-/-} hanno poi mostrato una totale incapacità di adattamento all'esercizio fisico in termini di glucose uptake e sensibilità insulinica, risultando la loro capacità di incorporazione del glucosio addirittura diminuita in

seguito al protocollo di allenamento, al contrario dei topi WT che invece hanno mostrato un significativo miglioramento.

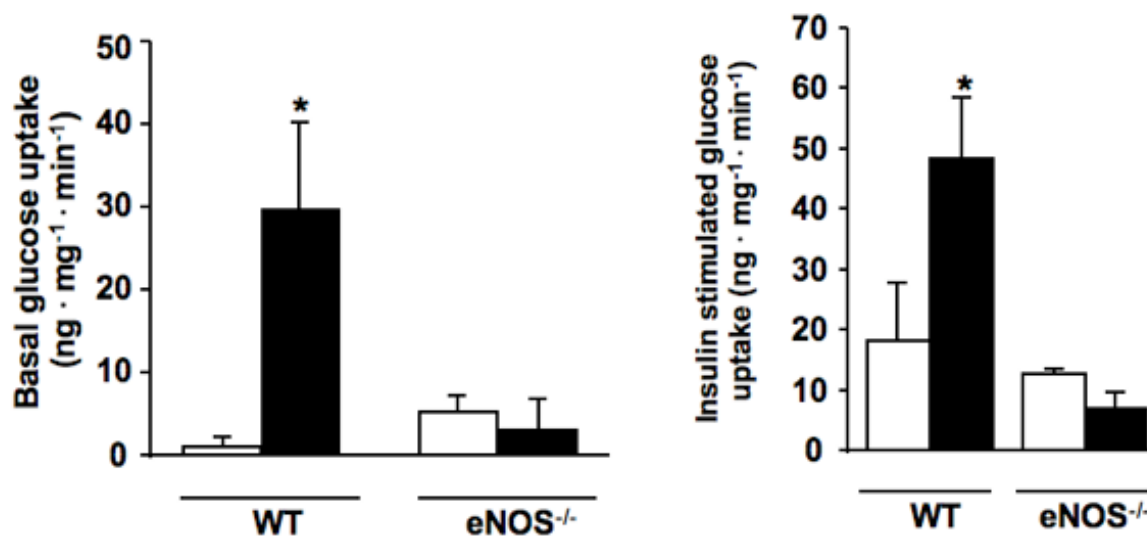


Tavola 7. Glucose uptake in cuore. E' stata misurata la capacità di captazione tissutale nei cuori dei topi WT ed eNOS^{-/-} in condizioni di sedentarietà (colonne bianche) e in seguito a protocollo di allenamento (colonne nere) sia in condizioni basali che in seguito a iniezione i.p. di insulina

STUDI IN VITRO SU CARDIOMIOCITI HL-1

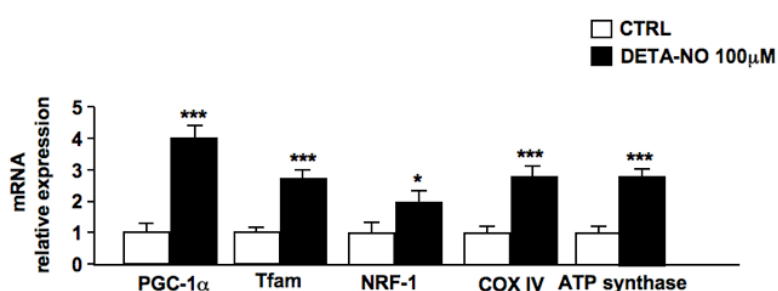
Espressione genica e quantificazione del mtDNA

L'analisi dell'espressione genica dei geni coinvolti nella mitocondriogenesi ha rivelato un aumento dei livelli di espressione di PGC-1 α , NRF-1, Tfam, COX IV e ATP-sintasi nelle

cellule che erano state sottoposte al trattamento con DETA-NONOATO 100 μ M rispetto alle cellule che non erano state trattate.

La quantificazione di mtDNA ha rivelato un aumento significativo del contenuto di DNA mitocondriale nelle cellule che erano state sottoposte al trattamento con DETA-NONOATO 100 μ M rispetto alle cellule che non erano state trattate.

A



B

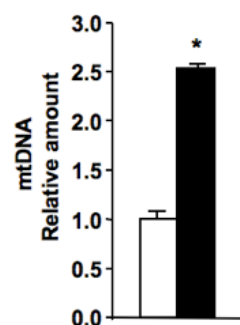


Tavola 8. Espressione genica e quantificazione del mtDNA in cellule HL1. A. Sono stati misurati i livelli di espressione genica di PGC-1 α , Tfam, NRF-1, Tfam, COX IV e ATP sintasi in cellule HL1 non trattate (colonne bianche) o trattate (colonne nere) con DETA-NO100 μ M. B. E' stato quantificato il mtDNA in cellule HL1 non trattate (colonne bianche) o trattate (colonne nere) con DETA-NO 100 μ M.

siRNA di PGC-1 α e Tfam

Il protocollo di silenziamento genico mediante Small Interference RNA è stato messo a punto seguendo le indicazioni fornite dalla ditta e la concentrazione ottimale trovata è di 50nM di RNA silenziante. Gli esperimenti sono stati allestiti su cellule non trattate, su cellule esposte solo alla miscela trasfettante DHARMAFECT ma priva di RNA specifico, su cellule trattate con un oligo aspecifico di RNA che funge da controllo negativo per valutare la specificità del silenziamento (Scrambled siRNA) e su cellule trattate con l'oligo specifico di RNA per silenziare PGC-1 α o Tfam (rispettivamente siRNA PGC-1 α e siRNA Tfam). Gli esperimenti hanno dimostrato che, con questo tipo di protocollo, si riesce a spegnere

selettivamente e specificamente l'espressione del gene PGC-1 α del 70% circa e per quanto riguarda Tfam si riesce a raggiungere più dell'80%. L'esperimento di controllo con le cellule trattate con la miscela silenziante aspecifica ha mostrato come l'espressione basale dei geni non venga influenzata e come il trattamento con il donatore di ossido nitrico induca l'aumento dell'espressione genica a conferma dei dati precedentemente osservati, fornendo un'ulteriore conferma della bontà del protocollo sperimentale.

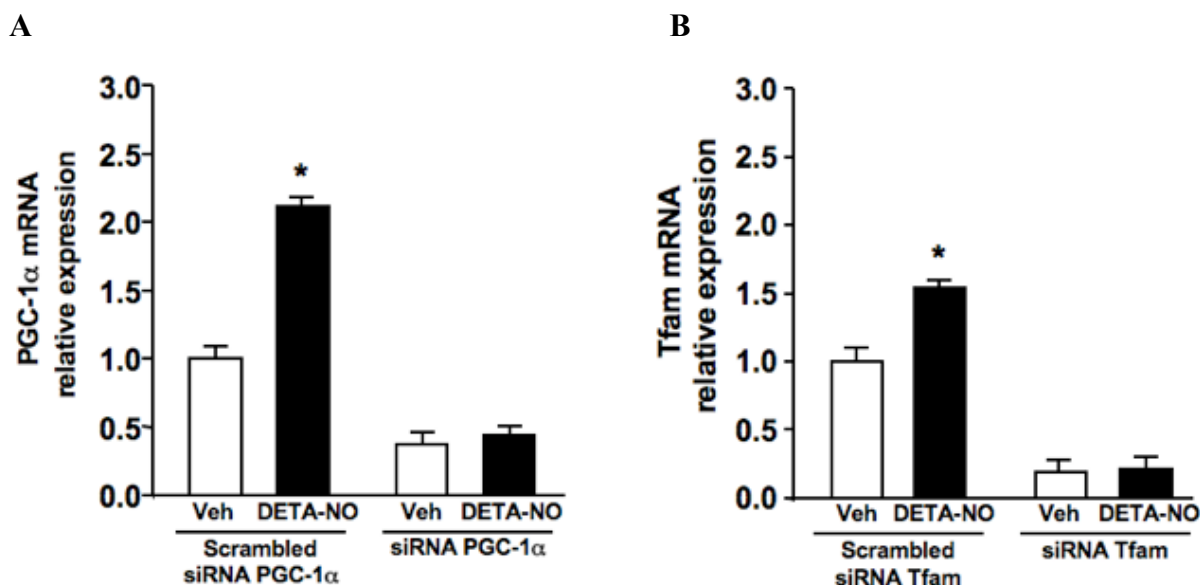


Tavola 9. Silenziamento genico di PGC-1 α e Tfam. In grafico sono mostrati i livelli di espressione genica dei geni PGC-1 α (A) e Tfam (B) in cellule HL-1 sia in assenza (Veh) che in presenza di trattamento con DETA-NO 100 μ M. Le cellule sono state trattate sia con una miscela trasfettante aspecifica (Scrambled siRNA) che con le miscele specifiche per il silenziamento (siRNA PGC-1 α e siRNA Tfam).

Glucose uptake

L'analisi della capacità di captazione di glucosio è stata inizialmente valutata in cellule sottoposte a trattamento con DETA-NONOATO 100 μ M per 72 ore rispetto a cellule controllo non trattate. I risultati ottenuti dimostrano che la somministrazione cronica di ossido nitrico alle cellule ne aumenta la capacità di captazione di glucosio sia in condizioni basali che in seguito a stimolazione con insulina.

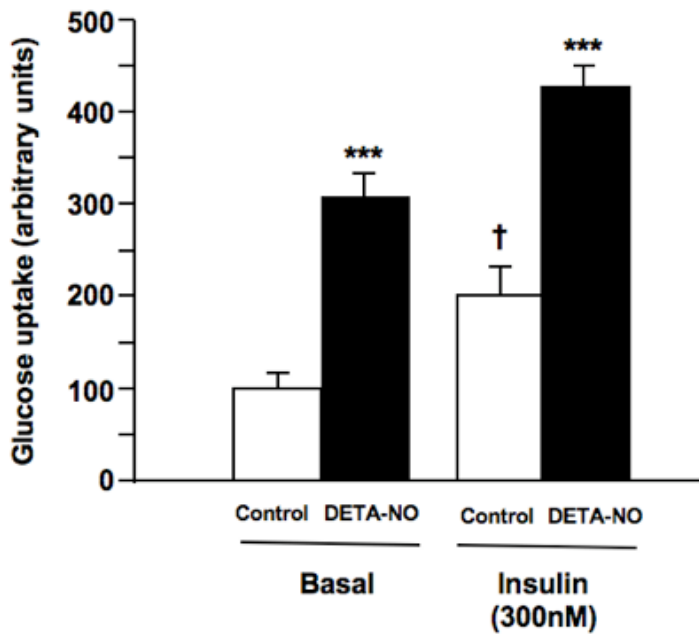


Tavola 10. Glucose uptake in cellule HL-1. Captazione del glucosio in cellule HL-1 non trattate (Control) o trattate (DETA-NO) con DETA-NONOATO in condizioni basali (colonne bianche) e in seguito a stimolo di 30 minuti con insulina 300nM (colonne nere). La variazione di glucose uptake è stata misurata considerando come 100% il valore misurato nelle cellule di controllo, in condizioni basali.

Si è poi misurata la capacità di captazione del glucosio, sia in condizioni basali che insulino-stimolate, delle cellule HL-1 che erano state sottoposte a protocollo di silenziamento per PGC-1 α o Tfam. Il trattamento con DETA-NONOATO sembra indurre un miglioramento della captazione del glucosio sia in condizioni basali che insulino stimolate anche nelle cellule silenziate per i geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale. Tuttavia questo miglioramento risulta non significativo e di gran lunga inferiore a quello osservato nelle cellule di controllo in cui non era stato effettuato silenziamento genico, suggerendo che una corretta funzionalità mitocondriale risulta un elemento cruciale affinché l'ossido nitrico agisca positivamente sulla capacità di captazione del glucosio.

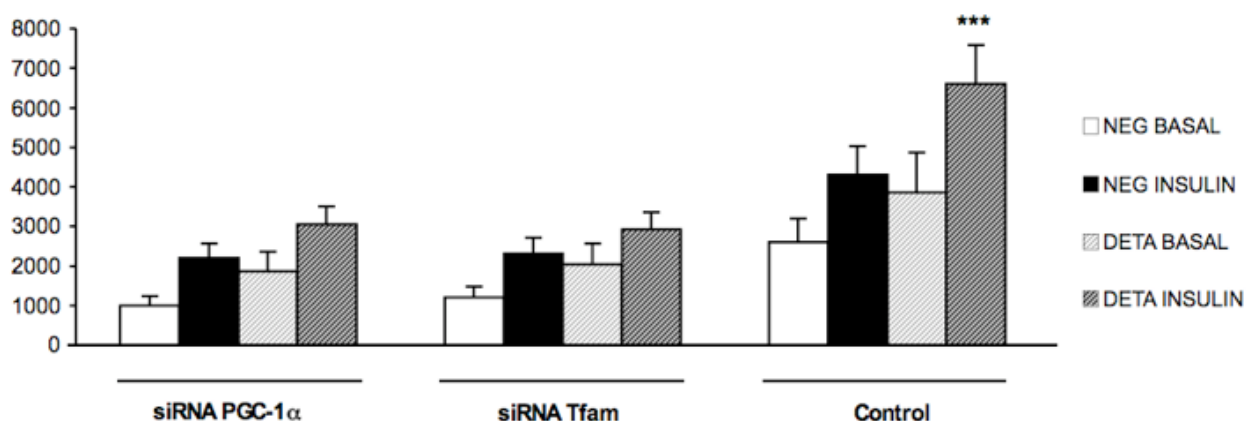


Tavola 11. Glucose uptake in cellule HL-1 silenziate per PGC-1 α o Tfam. Captazione del glucosio in cellule HL-1 non trattate (NEG) o trattate (DETA) con DETA-NONOATO in condizioni basali e in seguito a stimolo di 30 minuti con insulina 300nM. Le CPM (conte per minuto) misurate per ciascun pozzetto di cellule sono state convertite in unità arbitrarie.

Fosforilazione di AKT in cellule HL-1

Le cellule HL-1 hanno mostrato un aumento della capacità di captazione del glucosio in seguito a trattamento con DETA-NO e si è voluta analizzare la fosforilazione di AKT, proteina direttamente coinvolta nel signalling di incorporazione del glucosio stimolata da insulina. Le cellule HL-1 presentano una frazione di AKT fosforilata anche in condizioni basali, che però non è significativamente maggiore in quelle trattate con DETA-NO rispetto alle cellule controllo. In seguito a stimolazione con insulina la fosforilazione di AKT risulta invece maggiore nelle cellule trattate con DETA-NO rispetto al controllo.

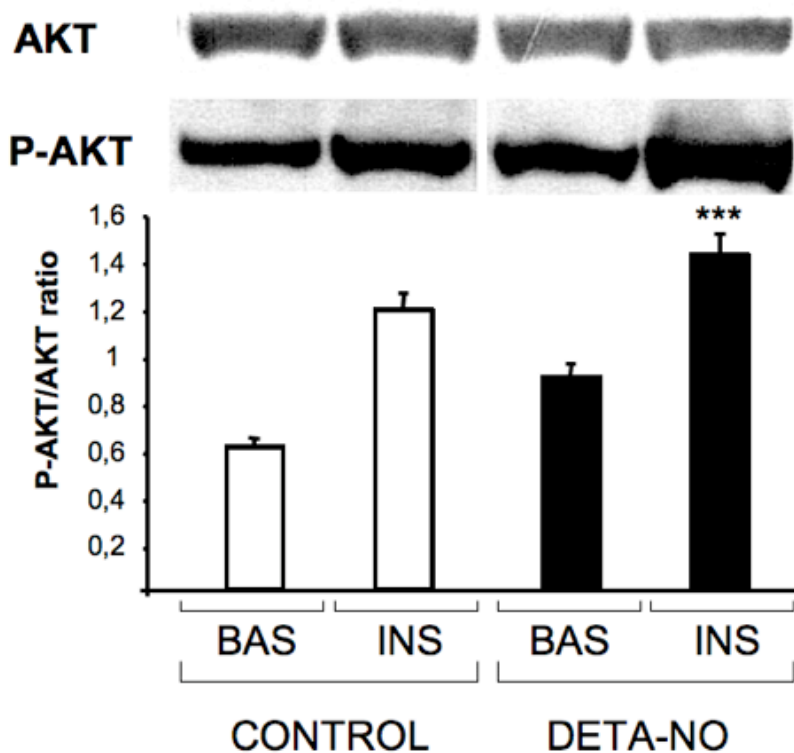


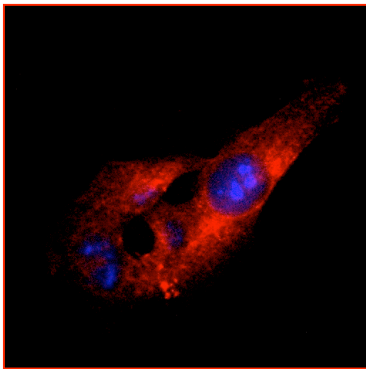
Tavola 12. Western Blot della proteina AKT e AKT fosforilata (Ser 473). Sono rappresentate le bande ottenute mediante Western Blot per la proteina AKT e la sua forma fosforilata in Ser 473. Sotto in grafico la quantificazione relativa del segnale di ciascuna banda. Il rapporto tra proteina fosforilata e non fosforilata è significativamente aumentato nelle cellule trattate con DETA-NO in seguito a stimolazione con insulina (300nM).

Traslocazione di GLUT4-myc in cellule HL-1

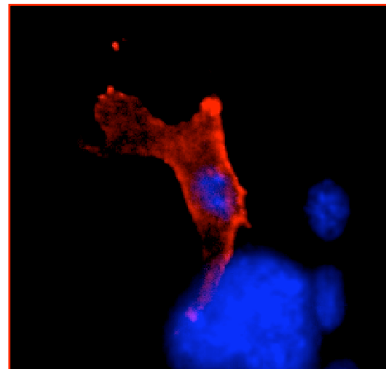
La visualizzazione del trasportatore GLUT4 traslocato in membrana nelle cellule HL-1 è risultata più problematica sia perché lo esprimono a livelli inferiori rispetto agli adipociti, sia perché avendo un corredo di vescicole miste composte sia da GLUT4 che da GLUT1 il segnale specifico per GLUT4 è ulteriormente attenuato dalla componente dell'altro trasportatore, che trasloca anch'esso in seguito a stimolazione con insulina. È stato messo quindi a punto un protocollo di trasfezione cellulare che prevede la trasfezione con il plasmide pCMV-GLUT4-myc, in grado di codificare per la proteina GLUT4, unita all'antigene myc. Questo sistema permette di produrre più copie del trasportatore e seguirne la localizzazione in maniera più

precisa e univoca grazie al riconoscimento dell'antigene myc in immunofluorescenza. Grazie alla messa a punto di questo protocollo è stato possibile visualizzare la traslocazione insulino-stimolata di myc (e conseguentemente del trasportatore GLUT4, di cui myc costituisce il tag) sulla membrana cellulare delle cellule HL-1. In condizioni basali sembra che la colorazione per GLUT4-myc (che localizza all'interno del citoplasma) sia più accentuata nelle cellule trattate con DETA-NO rispetto alle cellule controllo e che vi sia già una parziale traslocazione del trasportatore. In seguito a stimolazione con insulina è possibile vedere la traslocazione di GLUT4 sulla membrana sia nelle cellule trattate che in quelle di controllo.

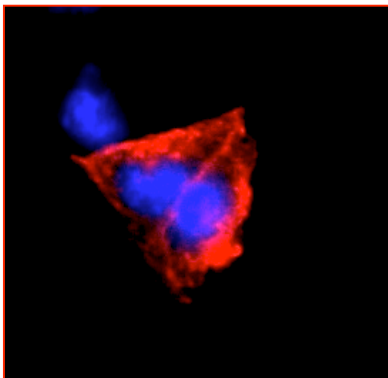
A



B



C



D

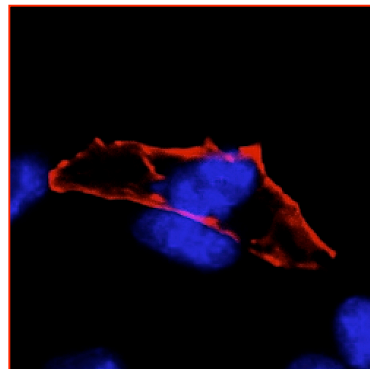


Tavola 13. Immunofluorescenza anti-myc su cellule HL-1 trasfettate con pCMV-GLUT4-myc. Le cellule sono state colorate con anti-myc (rosso) e i nuclei sono stati controcolorati con Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate (blu) dapprima nelle cellule trasfettate ma in assenza di trattamento con DETA-NO, in condizioni basali (A) e in seguito a stimolo con insulina 300nM (B). La stessa colorazione è poi stata eseguita su cellule trasfettate che erano state sottoposte a trattamento con DETA-NO, in condizioni basali (C) e in seguito a stimolo con insulina 300 nM (D).

Eseguendo un'analisi a posteriori sulle immagini acquisite è stato possibile quantificare la frazione di GLUT4-myc traslocato in membrana facendo il rapporto dei valori di fluorescenza provenienti dalle diverse zone della cellula. E' stato possibile apprezzare una più abbondante traslocazione già in condizioni basali, nelle cellule che erano state sottoposte al trattamento con DETA-NO rispetto alle cellule non trattate. La traslocazione si accentua drasticamente in presenza di stimolo con insulina (300nM), che nelle cellule trattate con DETA-NO induce una traslocazione quasi totale della proteina verso la membrana.

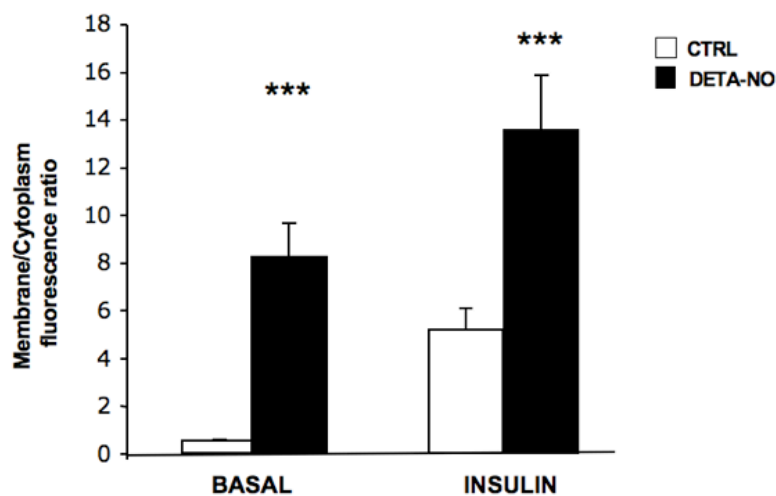


Tavola 14. Quantificazione della frazione di GLUT4 traslocata in membrana in cellule HL-1 trasfettate con pCMV-GLUT4-myc. Nel grafico sono riportati i rapporti tra i valori di fluorescenza per GLUT4-myc misurati a livello della membrana citoplasmatica e i valori misurati nella frazione citoplasmatica delle cellule.

RUOLO DI eNOS SULLA SENSIBILITÀ ALL'INSULINA E SULLA BIOGENESI MITOCONDRIALE NEL TESSUTO ADIPOSO

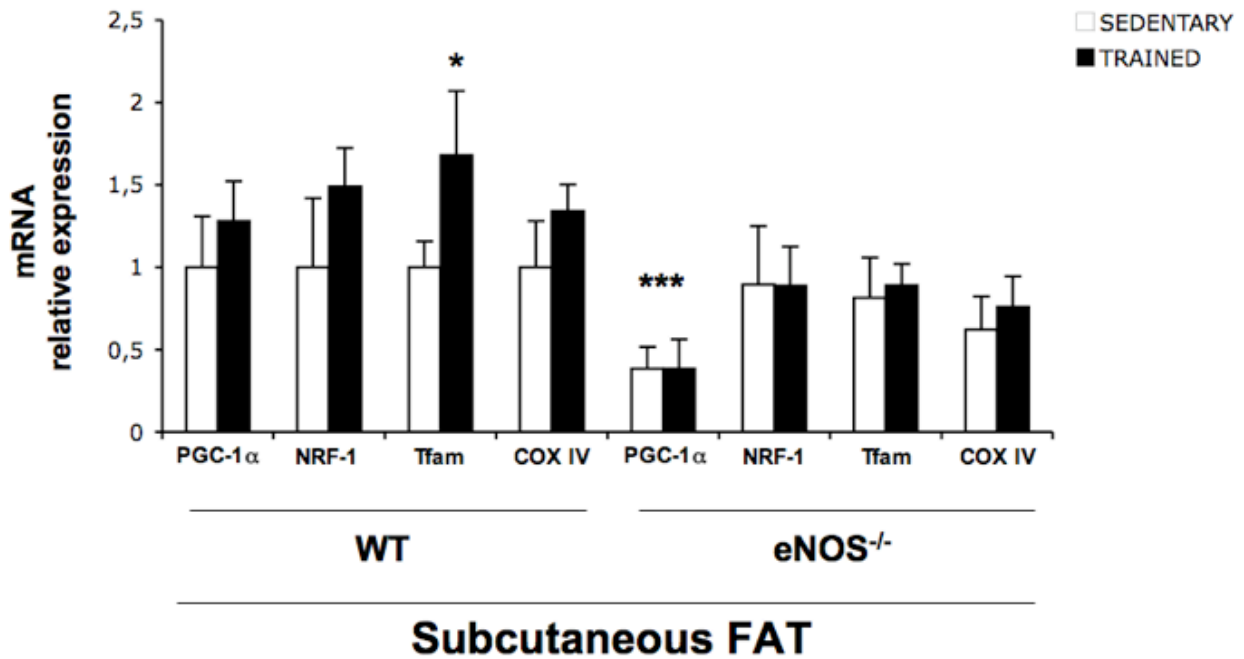
STUDI IN VIVO

Espressione genica e quantificazione del mtDNA

L'analisi dell'espressione genica sul tessuto adiposo sottocutaneo estratto dai topi sottoposti all'allenamento ha mostrato un significativamente ridotto livello di espressione genica di PGC-1 α nei topi eNOS -/- rispetto ai wild type anche in condizioni di sedentarietà. L'esercizio fisico ha indotto un aumento dei livelli di espressione di PGC-1 α , NRF-1, Tfam e COX IV solo nel tessuto adiposo dei topi wild type (nel caso di Tfam questo aumento è statisticamente significativo) mentre nel tessuto adiposo dei topi eNOS -/- i livelli sono rimasti simili a quelli dei topi non allenati.

La quantificazione del mtDNA è stata effettuata su campioni di tessuto adiposo viscerale e ha mostrato come anche in questo distretto l'allenamento induca un aumento del contenuto di DNA mitocondriale solo nei topi wild type ma non nei topi eNOS -/-.

A



B

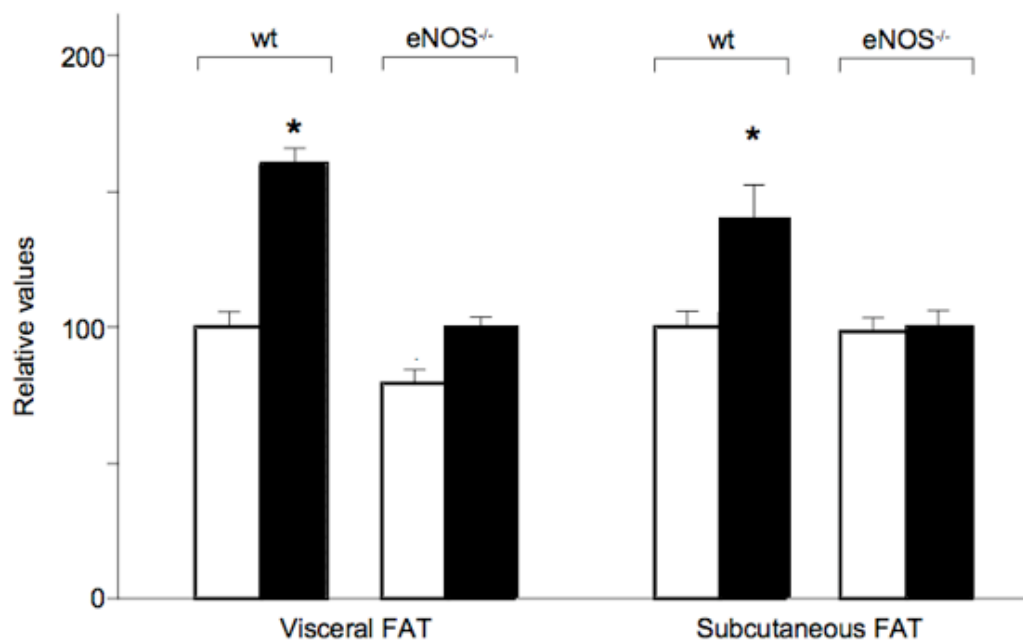


Tavola 15. Espressione genica e quantificazione del mtDNA nel tessuto adiposo. A. Sono stati misurati i livelli di espressione genica di PGC-1 α , NRF-1, Tfam e COX IV nel tessuto adiposo sottocutaneo dei topi WT ed eNOS^{-/-} sedentari e allenati. B. E' stato quantificato il mtDNA nel tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo dei topi, considerando come 100% del contenuto il livello misurato in topi WT sedentari.

Glucose uptake

La misura della capacità di incorporazione tissutale di glucosio nel tessuto adiposo bruno, sottocutaneo e viscerale di topi WT e eNOS^{-/-} al termine del protocollo di allenamento (sia in condizioni basali che in seguito ad iniezione intraperitoneale di insulina 0,5U/Kg) ha mostrato una maggiore capacità di glucose uptake da parte dei topi WT rispetto agli eNOS^{-/-} che migliorava ulteriormente in seguito all'esercizio fisico, rispecchiando ciò che si è visto accadere nei muscoli e nel cuore.

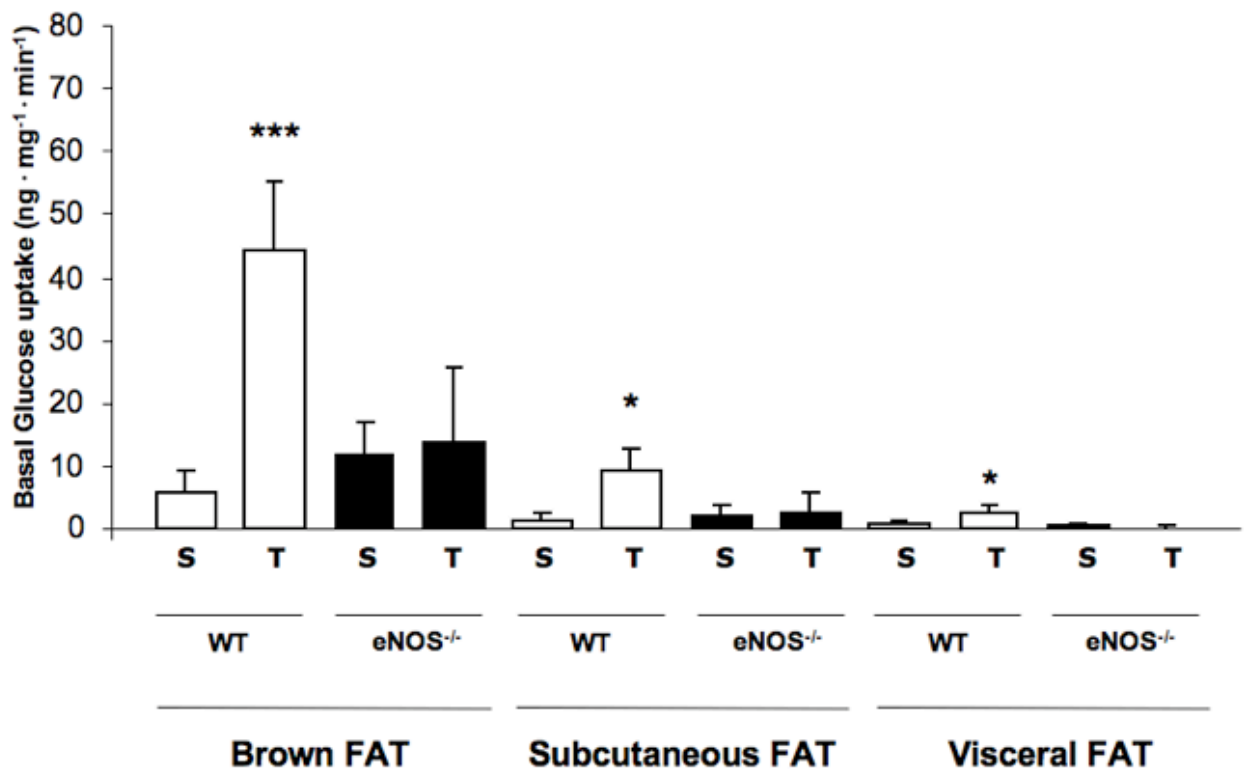


Tavola 16. Glucose uptake basale in tessuto adiposo bruno intrascapolare, bianco sottocutaneo e bianco viscerale. Saggio di incorporazione basale di 2-deossi-[³H]D-glucosio eseguito sul tessuto adiposo di topi wild type ed eNOS^{-/-} in condizioni di sedentarietà (S) e in seguito ad esercizio fisico (T)

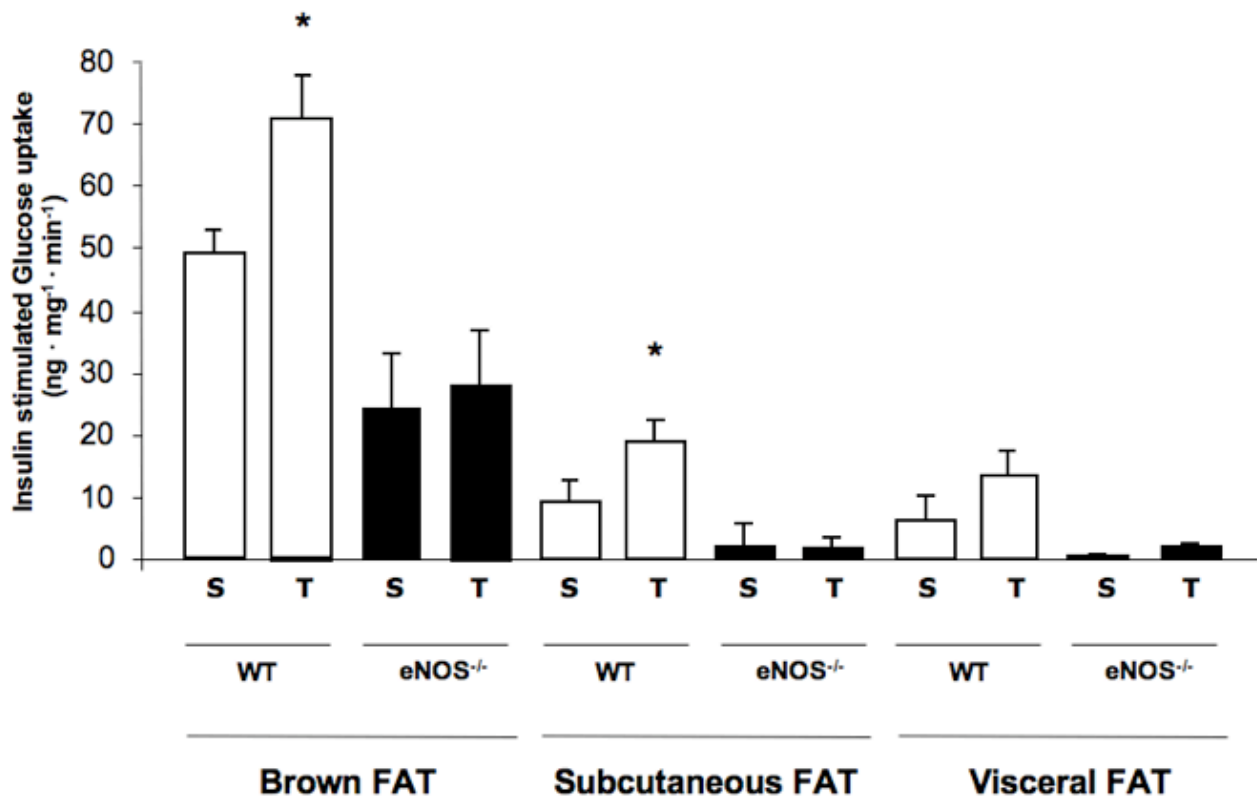


Tavola 17. Glucose uptake insulino-stimolato in tessuto adiposo bruno intrascapolare, bianco sottocutaneo e bianco viscerale. Saggio di incorporazione di 2-deossi-[³H]D-glucosio in seguito a stimolo con insulina (0,5 U/Kg) eseguito sul tessuto adiposo di topi wild type ed eNOS ^{-/-} in condizioni di sedentarietà (S) e in seguito ad esercizio fisico (T).

STUDI IN VITRO SU ADIPOCITI 3T3-L1

Espressione genica

L'analisi dell'espressione genica dei geni coinvolti nella mitocondriogenesi ha rivelato un aumento della trascrizione di PGC-1 α , TFAM, NRF1 e COX VI nelle cellule 3T3-L1 che erano state sottoposte al trattamento con DETA-NONOATO rispetto alle cellule che non erano state trattate.

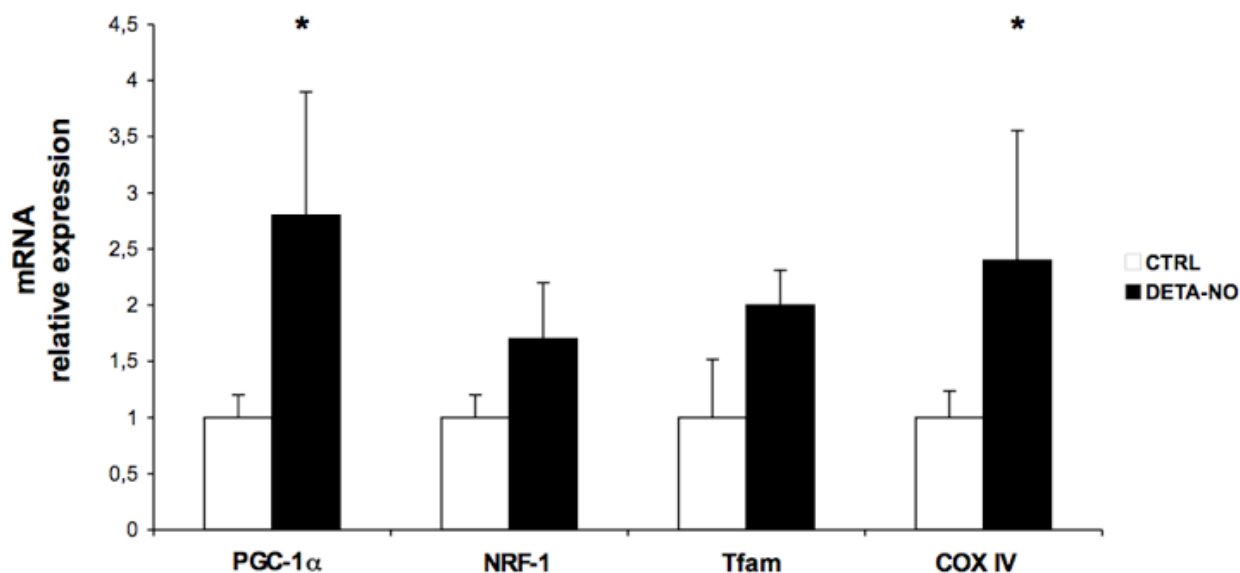


Tavola 18. Espressione genica in cellule 3T3-L1. A. Sono stati misurati i livelli di espressione genica di PGC-1 α , Tfam, NRF-1, Tfam e COX IV e ATP in adipociti 3T3-L1 non trattati (colonne bianche) o trattati (colonne nere) con DETA-NO 100 μ M.

Glucose uptake

L'analisi della capacità di captazione di glucosio è stata valutata in cellule 3T3-L1 portate a completo differenziamento adipogenico e sottoposte a trattamento con DETA-NONOATO 100 μ M per 72 ore rispetto a cellule controllo non trattate. I risultati ottenuti dimostrano che la somministrazione cronica di ossido nitrico alle cellule ne aumenta la capacità di captazione di glucosio, sia basale che insulino-stimolata.

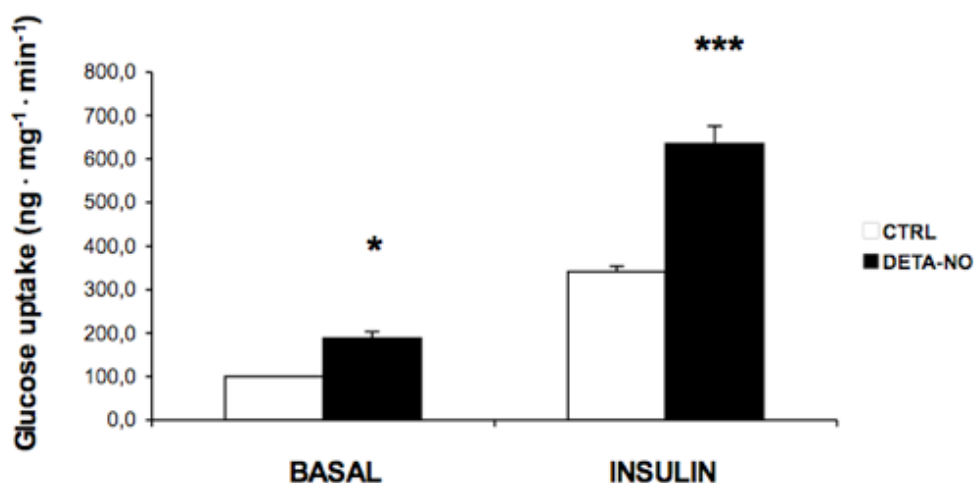


Tavola 19. Glucose uptake in adipociti 3T3-L1. Captazione del glucosio in cellule 3T3-L1 differenziate completamente in adipociti non trattate (Ctrl) o trattate (DETA-NO) con DETA-NONOATO, sia in condizioni basali che in seguito a stimolo di 30 minuti con insulina 2 μ M. La variazione di glucose uptake è stata misurata considerando come 100% il valore misurato nelle cellule di controllo, in condizioni basali.

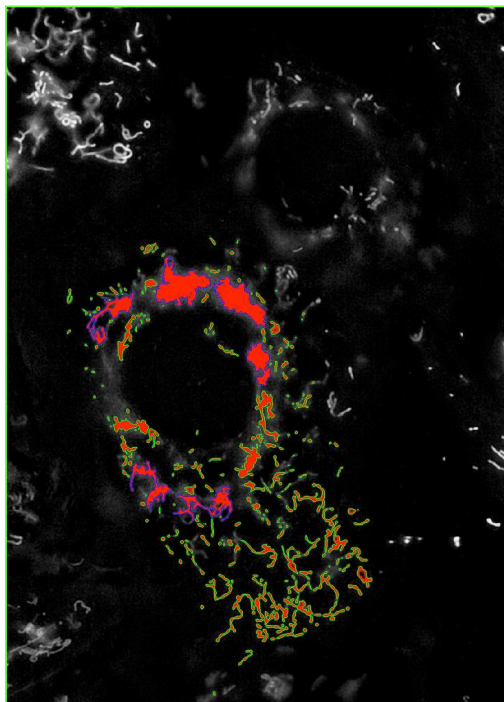
Microscopia a fluorescenza e valutazione della biogenesi mitocondriale

La morfologia e la funzione dei mitocondri sono stati valutate con MitoTracker Green (MTG).

I Mitotracker sono dei coloranti fluorescenti selettivi: diffondono passivamente attraverso la membrana plasmatica, sono permeabili alla membrana mitocondriale, non sono fluorescenti in

soluzione acquosa, lo diventano solo qualora si accumulano nello strato lipidico della membrana mitocondriale. Quando entrano nelle cellule vive i clorometilati presenti nei Mitotracker reagiscono con i gruppi tiolici delle proteine delle membrane mitocondriali formando dei composti fluorescenti. Colorano i mitocondri in modo indipendente dal potenziale di membrana e permettono così di visualizzare l'intera massa mitocondriale. Per l'analisi morfometrica le immagini sono state acquisite in epifluorescenza, sottoposte a filtri grafici di imaging processing e sottoposte a sogliatura per il riconoscimento e la categorizzazione semi-automatica di parametri indicatori del processo di mitocondriogenesi. Le immagini acquisite mostrano un aumento della massa mitocondriale rispetto alla massa totale della cellula in seguito al trattamento con ossido nitrico.

A



B

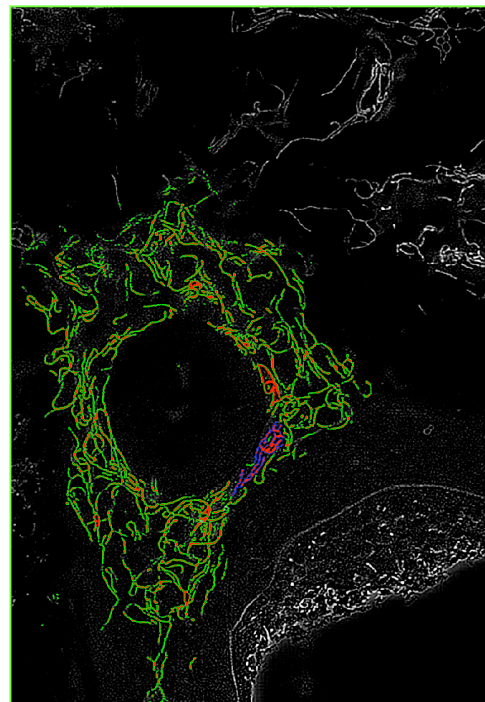
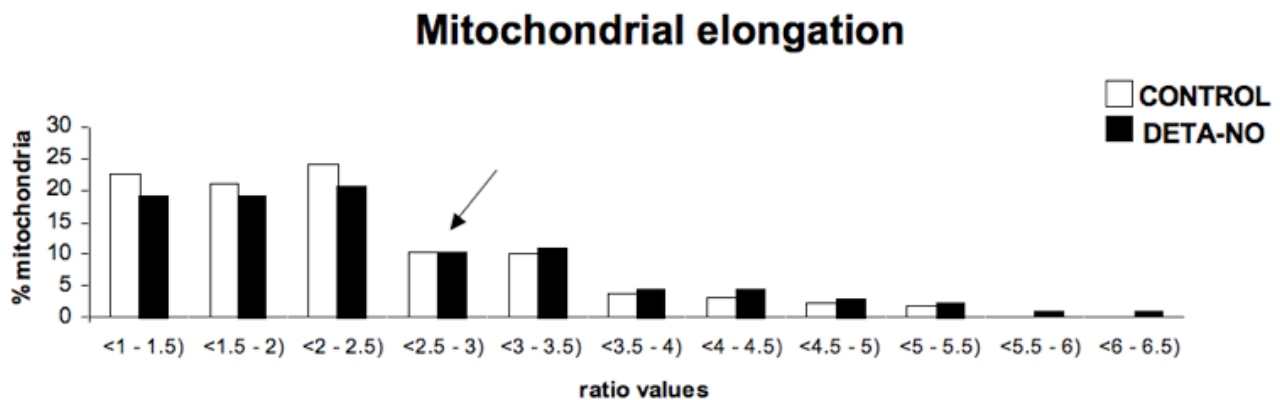


Tavola 19. Analisi della morfologia mitocondriale su adipociti 3T3-L1 con Mito-Tracker Green. Le immagini acquisite in seguito alla colorazione con Mito-Tracker Green vengono elaborate dal software, che associa a un colore tanto più tendente verso il rosso i mitocondri più corti (maggiormente presenti nelle cellule non trattate nell'immagine A) e un colore tanto più tendente verso il verde ai mitocondri più lunghi (maggiormente presenti nelle cellule trattate con DETA-NO nell'immagine B).

L'analisi effettuata ha poi rivelato un aumento del parametro di elongazione, indice dell'incremento della mitocondriogenesi, nelle cellule trattate con DETA-NO rispetto alle

cellule non trattate. Inoltre, all'aumentare del rapporto tra le medie dei valori di massa totale della cellula e massa mitocondriale, la percentuale di mitocondri con più alto valore aumenta nelle cellule trattate rispetto a quella nelle cellule non trattate.

A



B

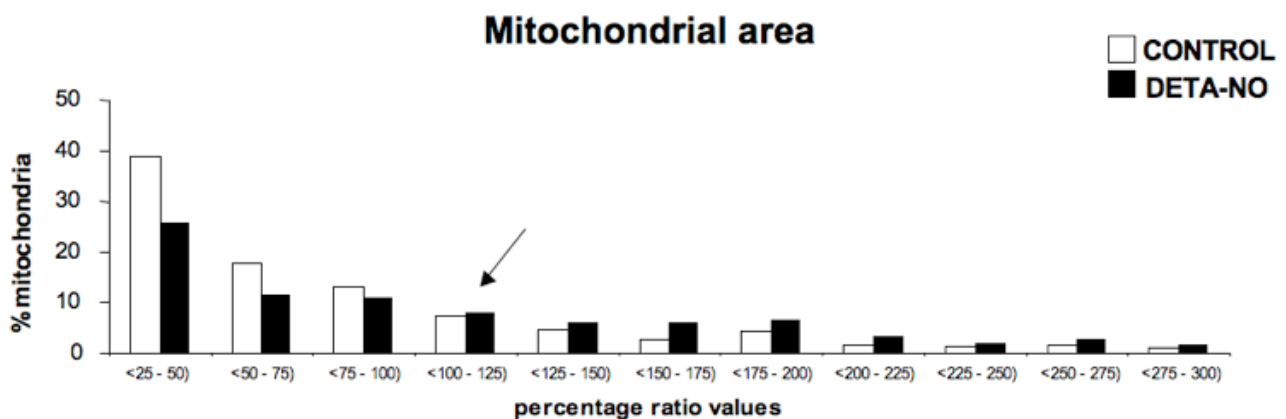


Tavola 20. Elongazione e area mitocondriale. Sono state misurate le percentuali di mitocondri presenti nelle cellule analizzate in base ai loro valori di elongazione (A) e area (B). All'aumentare del valore di elongazione mitocondriale (riportato in ascissa) cresce la percentuale di mitocondri nelle cellule trattate con DETA-NO (colonne nere) rispetto alle cellule non trattate di controllo (colonne bianche). Allo stesso modo all'aumentare del valore di area mitocondriale, rapportato all'area totale della cellula cresce la percentuale di mitocondri nelle cellule trattate con DETA-NO (colonne nere) rispetto alle cellule non trattate di controllo (colonne bianche). Le frecce nere indicano l'inversione di tendenza di tali percentuali.

Traslocazione di GLUT4

L'immunofluorescenza per GLUT4 sulle cellule 3T3-L1 ha permesso di valutare la localizzazione del trasportatore sia a livello citoplasmatico che sulla membrana cellulare. La somministrazione di DETA-NONOATO 100 μM per 72 ore è in grado di aumentare la localizzazione in membrana del trasportatore. Già in condizioni basali vi è un'aumento della presenza di GLUT4 all'interno delle cellule trattate con DETA-NONOATO rispetto a quelle non trattate e questo aumento si mantiene anche in seguito alla stimolazione con insulina 2 μM .

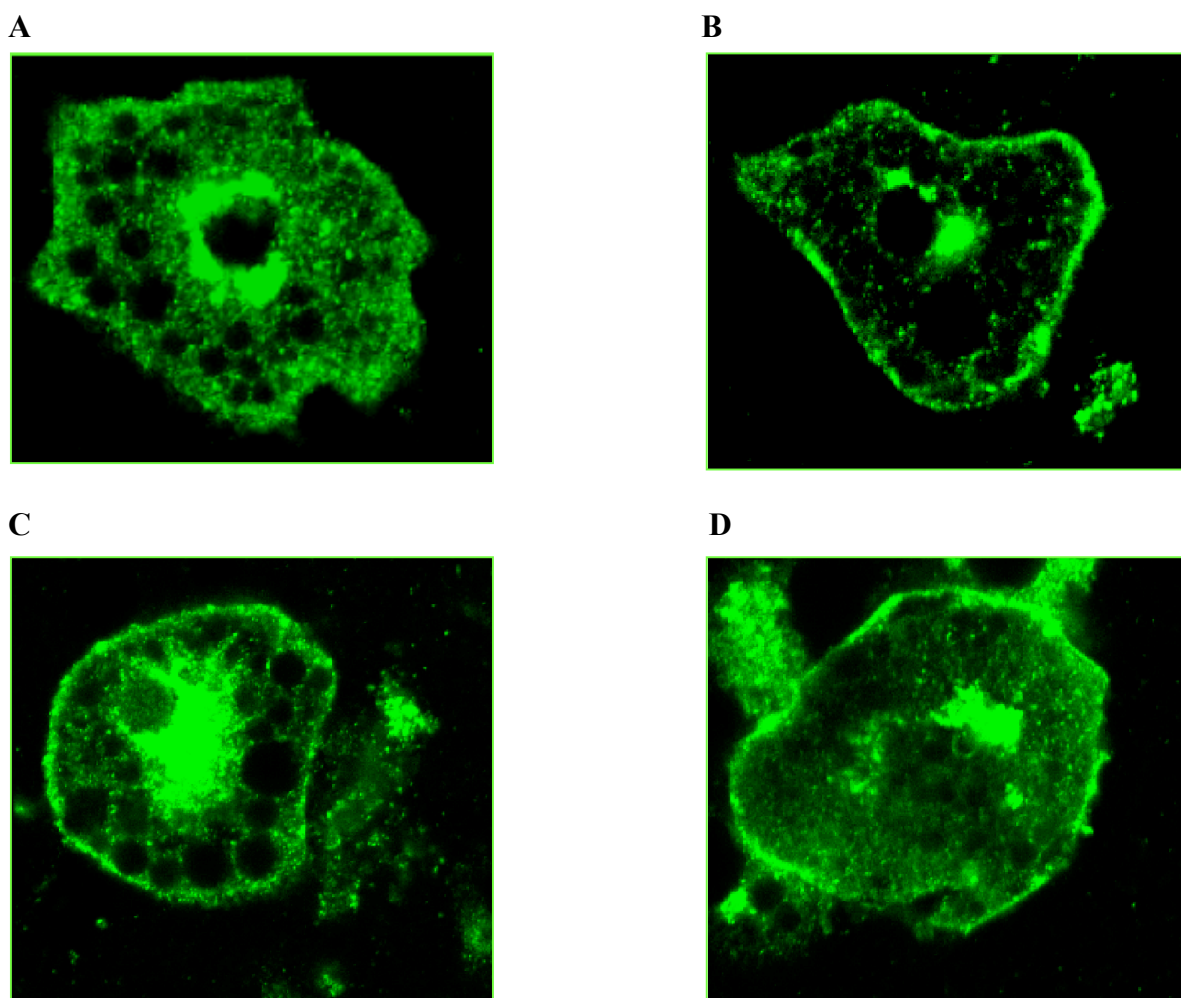


Tavola 21. Immunofluorescenza anti-GLUT4 su cellule 3T3-L1. Le cellule sono state colorate con anti-GLUT4 in assenza di trattamento con DETA-NO, in condizioni basali (A) e in seguito a stimolo con Insulina 2 μM (B). La stessa colorazione è poi stata eseguita su cellule che erano state sottoposte a trattamento con DETA-NO, in condizioni basali (C) e in seguito a stimolo con insulina 2 μM (D).

Eseguendo un'analisi a posteriori sulle immagini acquisite è stato possibile quantificare la frazione di trasportatore traslocato in membrana facendo il rapporto dei valori di fluorescenza provenienti dalle diverse zone della cellula. Già in condizioni basali vi è un' aumentata presenza della proteina sia nella frazione citoplasmatica che in quella traslocata nelle cellule trattate con DETA-NONOATO. In seguito alla stimolazione con Insulina la traslocazione tende a mantenersi aumentata nelle cellule trattate rispetto a quelle di controllo.

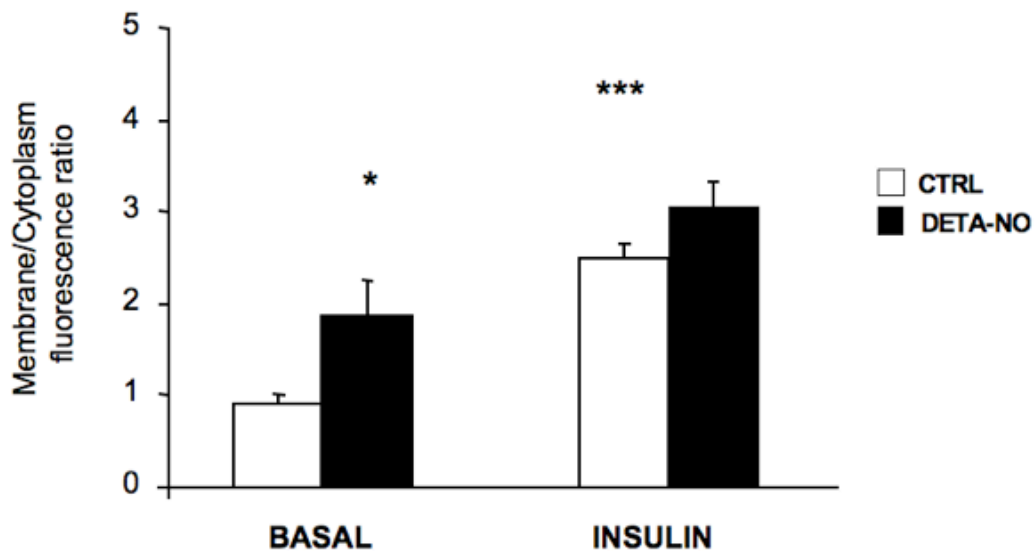


Tavola 22. Quantificazione della frazione di GLUT4 traslocata in membrana in cellule 3T3-L1. Nel grafico sono riportati i rapporti tra i valori di fluorescenza per GLUT4 misurati a livello della membrana citoplasmatica e i valori misurati nella frazione citoplasmatica delle cellule.

DISCUSSIONE

I risultati di questi studi mostrano che l'integrità del sistema eNOS-NO-cGMP è requisito fondamentale per ottenere una adeguata biogenesi mitocondriale in risposta all'allenamento fisico. Essi dimostrano inoltre che tale processo coinvolge diversi tessuti compresi quelli non direttamente coinvolti nella meccanica dell'esercizio come il tessuto adiposo. La normale risposta del sistema eNOS-NO-cGMP all'esercizio fisico è inoltre di cruciale importanza nel condizionare la sensibilità all'insulina sia in condizioni basali che in risposta all'esercizio fisico in alcuni distretti tra cui il cuore e il tessuto adiposo. I nostri studi portano una chiara evidenza a favore del fatto che l'effetto del sistema dell'ossido nitrico sulla mitocondriogenesi e sulla sensibilità all'insulina è un evento diretto e non mediato da altri sistemi che possono influenzare in vivo l'attività mitocondriale o l'azione dell'insulina a livello tissutale quali ad esempio l'aumentato tono adrenergico. Infine, essi suggeriscono con forza lo stretto legame tra biogenesi mitocondriale e sensibilità all'insulina almeno in alcuni tessuti tra cui, per rilevanza fisiopatologica, il cuore.

In particolare, è importante sottolineare che il modello murino eNOS^{-/-} presenta uno stato di insulino-resistenza come evidenziato dai livelli elevati di insulinemia e glicemia rispetto al topo wild type. Inoltre i livelli più elevati di acidi grassi liberi sia in condizioni basali, che dopo esercizio fisico, nei topi eNOS^{-/-} e la loro scarsa risposta all'azione antilipolitica dell'insulina suggeriscono ancora una volta la possibilità di una ridotta sensibilità all'insulina presente anche a livello del tessuto adiposo.

Lo stato di minor insulino sensibilità nei topi eNOS^{-/-} viene ulteriormente confermato dal i.p. ITT ed è degno di nota il fallimento di un programma di attività fisica nel produrre un aumento della sensibilità all'insulina nei topi deficitari del sistema dell'eNOS.

L'esplorazione del contributo individuale di ogni singolo tessuto allo stato complessivo di insulino-resistenza studiato mediante tecnica la tecnica dell'incorporazione del 2-Deossi-[³H]-glucosio in condizioni basali o in condizioni di iperinsulinemia ha potuto evidenziare la presenza di alterazioni dell'uptake del glucosio sia nei topi eNOS^{-/-} sedentari che nei topi eNOS^{-/-} sottoposti ad un programma di esercizio fisico, anche se esiste una ampia variabilità nel comportamento di ogni singolo distretto tissutale.

Effetti a livello muscolare

E' risaputo che l'esercizio fisico produce nel tempo cambiamenti fisiologici, biochimici e molecolari nelle cellule del muscolo e del cuore. L'entità di questi cambiamenti dipende dall'intensità e dalla durata dello stimolo aerobico e la sequenza di eventi che ne consegue provoca un aumento della biogenesi mitocondriale e cambiamenti di tipo ossidativo nelle fibre muscolari [49]. La biogenesi mitocondriale richiede il controllo coordinato di geni nucleari e mitocondriali che codificano per proteine attive a livello mitocondriale. PGC-1 α gioca un ruolo critico nelle interazioni tra geni nucleari e geni mitocondriali. Effettuando misurazioni sull'mtDNA è stato visto che risulta significativamente aumentato nei muscoli dei topi allenati a conferma del fatto che l'allenamento induce la biogenesi mitocondriale nel muscolo. L'esercizio fisico induce biogenesi mitocondriale perché vi è un aumento della richiesta energetica [50] e l'espressione di PGC-1 α risulta cruciale in questo processo poiché innesca la proliferazione mitocondriale e la formazione di fibre muscolari di tipo "lento" ricche di mitocondri e con un'elevata attività ossidativa. [51] Inoltre, l'aumento dell'utilizzo di acidi grassi liberi può contribuire ulteriormente all'aumento della biogenesi mitocondriale poiché l'incapacità di ossidare più FFAs da parte dei mitocondri, in risposta alla somministrazione di lipidi, sia in animali transgenici che in cellule in coltura è stata associata a una ridotta espressione di PGC-1 α . A questo si aggiunge l'osservazione che aumentando l'attività di PGC-1 α (*in vivo* con l'allenamento fisico e nei miociti in coltura tramite

l'infezione con adenovirus ricombinanti) si favorisce la completa ossidazione degli acidi grassi in CO₂ [52]. Quindi, oltre al consolidato ruolo di PGC-1 α nel controllo della biogenesi mitocondriale esiste anche un legame significativo tra PGC-1 α e un'efficiente ossidazione degli acidi grassi liberi da parte dei mitocondri. Nei nostri esperimenti l'espressione di PGC-1 α non è risultata aumentata nella maggior parte di muscoli dei topi eNOS -/-, al contrario dei topi wild type, in risposta all'esercizio fisico. Questa osservazione correla con il mancato aumento della replicazione del DNA mitocondriale di alcuni muscoli dei topi eNOS -/-, suggerendo un'alterazione della risposta all'esercizio fisico in termini di biogenesi mitocondriale.

AMPK e SIRT1 sono due sensori dello stato energetico che sono stati messi in relazione con l'insuccesso del processo di biogenesi mitocondriale e con l'aumento dei processi ossidativi [53, 54]. L'esercizio fisico induce un aumento dell'espressione di AMPK e di SIRT1 che si allinea con l'aumento dei parametri diretti di biogenesi mitocondriale quali la quantità di mtDNA. Il deficit del sistema eNOS comporta una incapacità di indurre in maniera adeguata l'attivazione di questi geni nel muscolo allenato. Ciò è sostanzialmente in accordo con quanto descritto in letteratura ed enfatizza ancora una volta il ruolo di SIRT1 come elemento chiave nell'induzione della mitocondriogenesi anche in situazioni fisiologiche quali l'attività fisica.

Effetti a livello cardiaco

Per quanto riguarda il cuore i risultati ottenuti dimostrano che l'esercizio fisico promuove la biogenesi mitocondriale anche nel muscolo cardiaco. Tale organo deve adattarsi alle maggiori richieste energetiche ed emodinamiche, infatti i livelli di mtDNA e di espressione genica di PGC-1 α , NRF1 e Tfam sono aumentati nei topi wild type in seguito

all'allenamento. Al contrario, i topi eNOS $-/-$ non hanno mostrato un incremento di questi due parametri. Anche la sensibilità all'insulina viene positivamente influenzata nei cuori dei topi WT sottoposti ad allenamento mentre i cuori dei topi eNOS $-/-$ falliscono nella risposta all'esercizio in termini di capacità di captazione del glucosio.

Questi dati indicano che l'enzima eNOS è cruciale per l'adattamento all'esercizio fisico in termini di biogenesi mitocondriale e sensibilità all'insulina sia nel tessuto muscolare che in quello cardiaco. Tuttavia i meccanismi cellulari che potrebbero intervenire in vivo in questi fenomeni di adattamento potrebbero coinvolgere sistemi diversi da quello di eNOS-NO-cGMP e l'effetto finale osservato potrebbe essere determinato da vari pathway di attivazione che non coinvolgono direttamente l'ossido nitrico e la biogenesi mitocondriale.

Per investigare più approfonditamente il signalling cellulare che regola i fenomeni osservati in vivo è stato messo a punto un protocollo *in vitro* di somministrazione di ossido nitrico mediante il trattamento col donatore DETA-NONOATO in cardiomiociti HL1, al fine di mimare l'aumento della produzione di tale molecola che si ottiene in vivo in seguito all'esercizio fisico. Gli effetti che si sono osservati in seguito al trattamento hanno rispecchiato quelli osservati in vivo nel cuore dei topi allenati, infatti le cellule che sono state sottoposte al trattamento con NO hanno mostrato un aumento dell'espressione di geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale e della capacità di captazione del glucosio (sia basale che insulino-stimolata) rispetto a quelle non trattate. Inoltre è stato messo a punto un protocollo di silenziamento che si è dimostrato efficace nel reprimere i geni responsabili della biogenesi mitocondriale, e si è osservato che i fenomeni di adattamento alla somministrazione di NO in termini di sensibilità insulinica vengono soppressi nelle cellule in cui la funzionalità mitocondriale è stata selettivamente repressa. E' stata fornita quindi la prova di un diretto coinvolgimento rispettivamente dell'ossido nitrico (mediante il trattamento con DETA-NONOATO) e della biogenesi mitocondriale (mediante il silencing) nell'aumento della

sensibilità insulinica, suggerendo che l'integrità della cascata di eventi che va dall'ossido nitrico alla biogenesi mitocondriale è fondamentale per consentire un aumento consensuale della sensibilità all'insulina in queste cellule.

Effetti a livello del tessuto adiposo

Uno dei risultati più innovativi è stata l'attivazione del processo della biogenesi mitocondriale a livello del tessuto adiposo bianco nei topi sottoposti al programma di attività fisica, in termini di espressione genica e di contenuto relativo di mtDNA sia a livello del tessuto adiposo sottocutaneo che viscerale. I nostri risultati mostrano che nel tessuto adiposo l'aumento della biogenesi mitocondriale in seguito all'allenamento si evidenzia nei topi wild type, ma non nei topi eNOS^{-/-} che presentano valori sia di espressione genica che di mtDNA inferiori anche in condizioni di sedentarietà. Un interessante risultato è derivato dalla misura della capacità di incorporazione tissutale di glucosio. Anche in questo distretto l'allenamento ha migliorato la capacità di trasporto del glucosio, sia in condizioni basali che insulino stimulate, confermando dunque che anche il tessuto adiposo è un organo che risponde attivamente all'esercizio fisico in termini di utilizzazione di glucosio. Il fatto che questo adattamento non si verifichi nei topi eNOS^{-/-} suggerisce inoltre che anche nel tessuto adiposo un'alterata funzionalità mitocondriale potrebbe essere alla base di un meccanismo di insulino resistenza come già ipotizzato per cuore e muscolo. Tale fatto appare a prima vista contraddittorio rispetto al ruolo svolto dal tessuto adiposo durante l'esercizio fisico che è primariamente quello di offrire un adeguato rifornimento energetico sotto forma di acidi grassi destinati al muscolo in movimento e al cuore.

L'aumentata mitocondriogenesi farebbe pensare ad un ipotetico aumento dell'ossidazione degli FFA all'interno dell'adipocita, fenomeno apparentemente

antieconomico ai fini energetici. Anche l'aumento dell'attività mitocondriogenetica evidenziata a livello del tessuto adiposo bruno, che va di pari passo con l'aumento dell'avidità per il glucosio circolante a seguito dell'intensa e prolungata attività fisica, sembrerebbe altrettanto antieconomico suggerendo la possibilità di un incremento dell'attività termogenetica del tessuto adiposo bruno durante l'esercizio, per cui substrati ossidabili verrebbero sequestrati al muscolo per le necessità relative all'attività contrattile. È evidente che durante l'attività fisica l'aumento della capacità ossidativa del muscolo e del cuore rappresentano un chiaro vantaggio in termini energetici per gli scopi relativi alla funzione specifica di questi due organi durante l'attività fisica. Più difficile risulta la spiegazione per giustificare un fenomeno analogo a livello del tessuto adiposo bianco e bruno. Vanno peraltro considerate ipotesi diverse per offrire una spiegazione ai fenomeni da noi osservati ed in particolare deve essere presa in considerazione l'ipotesi che i meccanismi attivanti la mitocondriogenesi e l'insulino sensibilità potrebbero essere diversi da quelli connessi al sistema eNOS-NO-cGMP. Ad esempio, si è visto che l'aumento di adrenalina prodotta dall'allenamento influisce positivamente sulla biogenesi mitocondriale nel tessuto adiposo aumentando la trascrizione di PGC-1 α [55]. Quindi gli effetti osservati in vivo potrebbero non essere stati causati direttamente dall'ossido nitrico e dalla funzionalità mitocondriale ad esso correlata.

Per valutare il diretto coinvolgimento di questo pathway cellulare è stato proposto il trattamento *in vitro* con ossido nitrico su adipociti 3T3-L1 e ne è stata in seguito valutata sia la biogenesi mitocondriale che la capacità di captazione del glucosio. E' stato osservato che il trattamento con ossido nitrico aumenta la trascrizione di geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale, induce la formazione di nuova massa mitocondriale e influenza positivamente la traslocazione in membrana del GLUT4, trasportatore regolato a valle del signalling insulinico. E' stata fornita dunque la prova che anche nel tessuto adiposo il fenomeno di

adattamento all'esercizio fisico che culmina con il miglioramento della sensibilità all'insulina coinvolge direttamente l'ossido nitrico e la biogenesi mitocondriale ad esso correlata.

La spiegazione dei fenomeni che si sono osservati nel tessuto adiposo va ricercata considerando una serie di meccanismi di adattamento di questo tessuto all'esercizio fisico non limitata al suo immediato ruolo di reservoir energetico, ma estesa ad un processo di ri-bilanciamento energetico più a lungo termine. E' stato osservato infatti che nel tessuto adiposo di topi wild type sottoposti ad esercizio fisico e in colture di adipociti 3T3-L1 trattati con un donatore di NO (3-morpholinonydnonimina SIN-1) si verificava un aumento della mitocondriogenesi e della secrezione di adiponectina, fenomeno che al contrario non si osservava nel tessuto adiposo di topi eNOS-/- sottoposti ad allenamento, né in adipociti 3T3-L1 non trattati con ossido nitrico, né in 3T3-L1 silenziate per il gene eNOS [56]. Questi fenomeni di adattamento fanno parte di una riorganizzazione del metabolismo del tessuto adiposo in seguito all'esercizio fisico che tende a portare gli adipociti che verso un fenotipo più insulino-sensibile e più funzionalmente attivo da punto di vista mitocondriale. Tale fenotipo caratterizza gli adipociti che si trovano ad uno stadio più precoce di maturazione, mentre gli adipociti più maturi (sia in coltura, sia in vivo nel tessuto adiposo adulto) perdono parte delle loro attività metaboliche, aumentano le loro dimensioni (ipertrofia) e diminuiscono la sintesi di adiponectina diventando meno insulino-sensibili e più suscettibili agli stress ossidativi.

L'apparentemente controverso comportamento del tessuto adiposo è il risultato quindi di un adattamento di quest'organo ad una nuova situazione metabolica indotta dall'esercizio fisico, al fine di offrire un meccanismo di difesa compensatorio contro il danno mitocondriale e lo stress ossidativo che si è osservato in numerosi altri studi [57-59].

Conclusioni

Gli esperimenti in vivo hanno dunque evidenziato come il sistema eNOS-NO-cGMP sia importante nella fisiologia *whole body* per il mantenimento di una corretta funzionalità mitocondriale e un'adeguata sensibilità all'insulina, ma non potevano offrire una completa spiegazione del rapporto causa-effetto tra le molecole coinvolte in questo signalling. E' stato con gli esperimenti *in vitro* che si è potuto ottenere una prova diretta che il metabolismo dell'ossido nitrico, la biogenesi mitocondriale, la sensibilità insulinica e il trasporto di glucosio sono fenomeni mutualmente collegati tra loro.

In conclusione le nostre osservazioni mostrano chiaramente che la biogenesi mitocondriale indotta da esercizio fisico non avviene nei topi eNOS^{-/-} e questo fatto è strettamente associato con una diminuita capacità di un appropriato utilizzo del glucosio come fonte di energia da parte di diversi tessuti non solo in condizioni basali ma anche dopo stimolo insulinico. Questi dati, associati a precedenti evidenze, indicano che l'ossido nitrico è un elemento chiave nella regolazione del metabolismo del glucosio da parte della cellula, attraverso un'azione diretta sulla biogenesi mitocondriale. Perciò il meccanismo di bilancio energetico cellulare, regolato dall'aumento della richiesta di energia durante e in seguito all'esercizio fisico, sembra essere regolato da cambiamenti che dipendono dalla biogenesi mitocondriale. Gli studi su questa via di regolazione risultano di cruciale importanza al fine di comprendere meglio i meccanismi cellulari alla base dell'insorgenza della resistenza insulinica e di analizzare quali sistemi sono coinvolti nella patogenesi del diabete di tipo 2, dell'obesità e delle complicanze cardiovascolari allo scopo di individuare una corretta ed efficace strategia preventiva nei confronti di queste patologie.

BIBLIOGRAFIA

1. Rothenbacher, D., W. Koenig, and H. Brenner, *Lifetime physical activity patterns and risk of coronary heart disease*. Heart, 2006. **92**(9): p. 1319-20.
2. Myers, J., et al., *Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing*. N Engl J Med, 2002. **346**(11): p. 793-801.
3. Laaksonen, D.E., et al., *Physical activity in the prevention of type 2 diabetes: the Finnish diabetes prevention study*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 158-65.
4. Tuomilehto, J., et al., *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance*. N Engl J Med, 2001. **344**(18): p. 1343-50.
5. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. N Engl J Med, 2002. **346**(6): p. 393-403.
6. Shulman, G.I., et al., *Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy*. N Engl J Med, 1990. **322**(4): p. 223-8.
7. Blaak, E.E., et al., *Impaired oxidation of plasma-derived fatty acids in type 2 diabetic subjects during moderate-intensity exercise*. Diabetes, 2000. **49**(12): p. 2102-7.
8. Goodpaster, B.H., et al., *Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss*. Metabolism, 2000. **49**(4): p. 467-72.
9. Lowell, B.B. and G.I. Shulman, *Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes*. Science, 2005. **307**(5708): p. 384-7.
10. Simoneau, J.A. and D.E. Kelley, *Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM*. J Appl Physiol, 1997. **83**(1): p. 166-71.
11. Ritov, V.B., et al., *Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 8-14.
12. Choo, H.J., et al., *Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice*. Diabetologia, 2006. **49**(4): p. 784-91.
13. Petersen, K.F., et al., *Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 664-71.

14. Wu, Z., et al., *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1*. Cell, 1999. **98**(1): p. 115-24.
15. St-Pierre, J., et al., *Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26597-603.
16. Mootha, V.K., et al., *PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes*. Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 267-73.
17. Patti, M.E., et al., *Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8466-71.
18. Mootha, V.K., et al., *Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria*. Cell, 2003. **115**(5): p. 629-40.
19. Bereiter-Hahn, J. and M. Voth, *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. Microsc Res Tech, 1994. **27**(3): p. 198-219.
20. Sesaki, H. and R.E. Jensen, *Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape*. J Cell Biol, 1999. **147**(4): p. 699-706.
21. Bleazard, W., et al., *The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(5): p. 298-304.
22. Brunk, C.F., *Mitochondrial proliferation during myogenesis*. Exp Cell Res, 1981. **136**(2): p. 305-9.
23. Vorobjev, I.A. and D.B. Zorov, *Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum*. FEBS Lett, 1983. **163**(2): p. 311-4.
24. Klaus, S., et al., *The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue*. Int J Biochem, 1991. **23**(9): p. 791-801.
25. Clayton, D.A., *Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(3): p. 107-11.
26. Terjung, R.L., *The turnover of cytochrome c in different skeletal-muscle fibre types of the rat*. Biochem J, 1979. **178**(3): p. 569-74.
27. Reichmann, H., et al., *Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits*. Pflugers Arch, 1985. **404**(1): p. 1-9.

28. Henriksson, J., et al., *Chronic stimulation of mammalian muscle: changes in enzymes of six metabolic pathways*. Am J Physiol, 1986. **251**(4 Pt 1): p. C614-32.
29. Takahashi, M., et al., *Contractile activity-induced adaptations in the mitochondrial protein import system*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 1): p. C1380-7.
30. Hoppeler, H., *Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle*. Int J Sports Med, 1986. **7**(4): p. 187-204.
31. Hickson, R.C., et al., *Time course of the adaptive responses of aerobic power and heart rate to training*. Med Sci Sports Exerc, 1981. **13**(1): p. 17-20.
32. Williams, R.S., *Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event*. J Biol Chem, 1986. **261**(26): p. 12390-4.
33. Gordon, J.W., et al., *Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2001. **90**(1): p. 389-96.
34. Clementi, E. and E. Nisoli, *Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2005. **142**(2): p. 102-10.
35. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
36. Denninger, J.W. and M.A. Marletta, *Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 334-50.
37. Lewis, R.S. and W.M. Deen, *Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solutions*. Chem Res Toxicol, 1994. **7**(4): p. 568-74.
38. Wolzt, M., et al., *Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. Mechanisms underlying synthesis, no release, and biological activity*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 28983-90.
39. Cleeter, M.W., et al., *Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases*. FEBS Lett, 1994. **345**(1): p. 50-4.
40. Clementi, E., et al., *Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7631-6.
41. Clementi, E., et al., *On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1559-62.

42. Kelly, D.P. and R.C. Scarpulla, *Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function*. Genes Dev, 2004. **18**(4): p. 357-68.
43. Nisoli, E., et al., *Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16507-12.
44. Balon, T.W. and J.L. Nadler, *Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle*. J Appl Physiol, 1997. **82**(1): p. 359-63.
45. Li, J., et al., *Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(5): p. E834-41.
46. Kawanami, H., et al., *Possible role of nitric oxide on adipocyte lipolysis in exercise-trained rats*. Jpn J Physiol, 2002. **52**(4): p. 343-52.
47. Nisoli, E., et al., *Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS*. Science, 2005. **310**(5746): p. 314-7.
48. Nisoli, E., et al., *Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide*. Science, 2003. **299**(5608): p. 896-9.
49. Adhihetty, P.J., et al., *Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity*. Exp Physiol, 2003. **88**(1): p. 99-107.
50. Essig, D.A., *Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle*. Exerc Sport Sci Rev, 1996. **24**: p. 289-319.
51. Lin, J., et al., *Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres*. Nature, 2002. **418**(6899): p. 797-801.
52. Koves, T.R., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33588-98.
53. Reznick, R.M. and G.I. Shulman, *The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis*. J Physiol, 2006. **574**(Pt 1): p. 33-9.
54. Canto, C., et al., *Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle*. Cell Metab, 2010. **11**(3): p. 213-9.
55. Sutherland, L.N., et al., *Exercise and adrenaline increase PGC-1{alpha} mRNA expression in rat adipose tissue*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 7): p. 1607-17.
56. Koh, E.H., et al., *eNOS plays a major role in adiponectin synthesis in adipocytes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(4): p. E846-53.

57. Sakurai, T., et al., *Effects of exercise training on adipogenesis of stromal-vascular fraction cells in rat epididymal white adipose tissue*. Acta Physiol (Oxf), 2010. **200**(4): p. 325-38.
58. Vieira, V.J., et al., *Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(5): p. E1164-71.
59. Gollisch, K.S., et al., *Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(2): p. E495-504.