INDICE

PREMESSA……...…….2

INTRODUZIONE……...……...3
HMG-CoAR: CARATTERIZZAZIONE E STATO DELL'ARTE……...……...4

SCOPO DELLA RICERCA……11

PROGETTO SPERIMENTALE……14

RISULTATI……15

SEZIONE I: HMG-CoAR E INVECCHIAMENTO……..16

A-*ROS E REGOLAZIONE A BREVE TERMINE DELL'ATTIVITA' DELL'HMG-CoAR*…….….16

***Ratti Wistar di 3 mesi trattati con TAA*……...……....16**

***HepG2 trattate con H_2O_2*……...……..…….17**

***Ratti Sprague-Dawley di 24 mesi AL o CR*……..……..……...……..24**

***Ratti Sprague-Dawley di 24 mesi AL e OMEGA-3: riduzione dei livelli di ROS*..27**

B-*REGOLAZIONE A LUNGO TERMINE DELL'ATTIVITA' DELL'HMG-CoAR*……..31

***Ratti Sprague-Dawley di 24 mesi AL, CR e OMEGA-3*……..31**

C-*IPOSSIA E REGOLAZIONE DELL'HMG-CoAR*……..38

***Effetto dell'ipossia ambientale (2% di O_2)*……..……....38**

***Effetto dell'ipossia chimica ($CoCl_2$)* ……..…….…....39**

SEZIONE II: HMG-CoAR E SVILUPPO……...…46

SEZIONE III: HMG-CoAR E DIFFERENZIAMENTO……..50

DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONI……..…….61

INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI……...……70

MATERIALI E METODI……71

HMG-CoAR……...95

INVECCHIAMENTO, RADICALI LIBERI E RESTRIZIONE CALORICA……..…105

IPOSSIA……...111

SVILUPPO E DIFFERENZIAMENTO……119

BIBLIOGRAFIA……...…123

PREMESSA

E' noto come diversi stadi fisiologici dell'organismo animale presentino esigenze, produzione e utilizzazione di composti mevalonato-derivati, notevolmente diverse. Questi composti derivano da un percorso metabolico il cui enzima chiave è la 3β-Idrossi-3β-Metilglutaril Coenzima A Reduttasi (HMG-CoAR), enzima che è finemente regolato sia nel livello che nell'attività. I prodotti terminali delle diverse ramificazioni del percorso metabolico sono coinvolti in numerosi processi cellulari quali la membranogenesi, il traffico cellulare, la localizzazione a livello di membrana, la proliferazione e il differenziamento cellulare, la riproduzione, la produzione di ormoni e di lipo- o glico-proteine. Mentre sono state da tempo definiti i processi di biosintesi e degradazione, solo recentemente sono stati definiti i meccanismi generali alla base della regolazione a lungo e breve termine della reduttasi individuando i complessi proteici interessati e i loro rapporti con composti modulatori. Tuttavia, non è stato ancora definito se e come questi operino nelle diverse situazioni fisiologiche e non, nelle quali si osservano ad esempio alterati contenuti di colesterolo.

Tra le fasi del ciclo vitale, il periodo peri-natale e l'invecchiamento rappresentano situazioni caratterizzate da variazioni metaboliche diverse dall'adulto, correlabili a modificazioni di proliferazione e differenziamento nelle quale le informazioni sulla regolazione della reduttasi sono parziali o carenti.

Scopo di questo progetto è stato quindi quello di studiare la regolazione a breve e lungo termine della reduttasi in modelli *in vivo* ed *in vitro* di invecchiamento e sviluppo, cercando anche di contribuire alla definizione dei meccanismi molecolari alla base di variazioni già note o riscontrate.

Non si può non sottolineare che la definizione delle tappe di un meccanismo di regolazione può contribuire a identificare eventuali interventi in situazioni patologiche nelle quali ad esempio è frequentemente riscontrabile ipercolesterolemia.

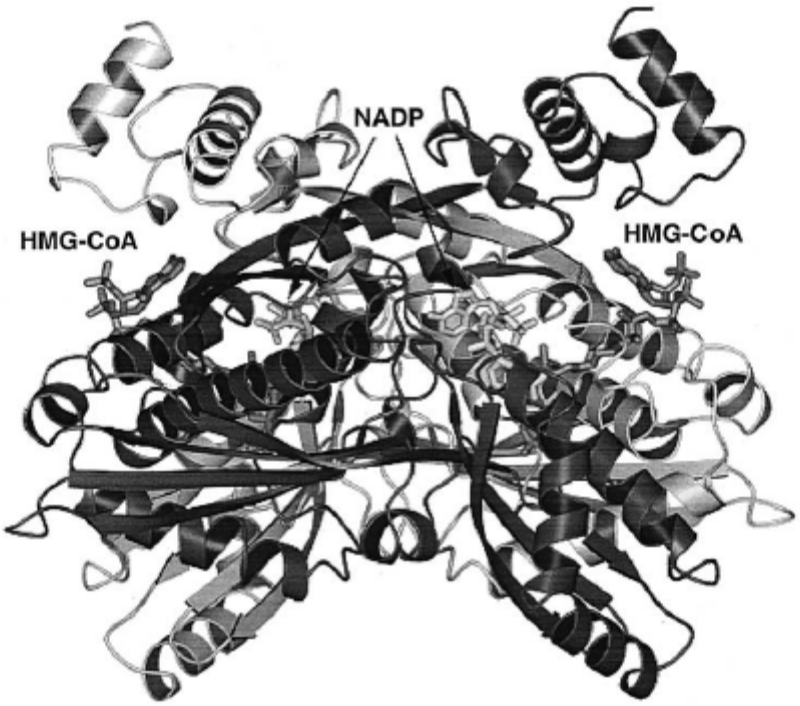
L'elaborato è pertanto organizzato in una **Introduzione** che presenta una sintesi sulla caratterizzazione dell'enzima HMG-CoAR e sulle sue variazioni negli stati fisiologici considerati; in uno **Scopo della ricerca** in cui vengono definite le articolazioni del progetto sperimentale, nel capitolo **Risultati**, articolato in più sezioni, e nelle **Conclusioni**. Le informazioni più dettagliate sui vari argomenti correlati (che saranno indicate nel testo da numeretti successivi in apice) e sui metodi utilizzati vengono riportate alla fine del testo nella sezione **Informazioni supplementari**.

INTRODUZIONE

HMG-COAR: CARATTERIZZAZIONE E STATO DELL'ARTE

La 3β-Idrossi-3β-Metilglutaril Coenzima A Reduttasi (HMG-CoAR) (figura 1) è un enzima di membrana localizzato nel reticolo endoplasmatico, che catalizza, per mezzo della riduzione operata da due molecole di NADPH, la conversione dell'HMG-CoA a mevalonato (MVA) e Coenzima A (CoA) (Durr and Rudney, 1960); il MVA rappresenta un composto intermedio nella biosintesi di steroli e composti isoprenoidi, essenziali per il mantenimento della fluidità di membrana e la proliferazione cellulare in piante, funghi e animali (Edwards and Ericsson, 1999) (figura 2).

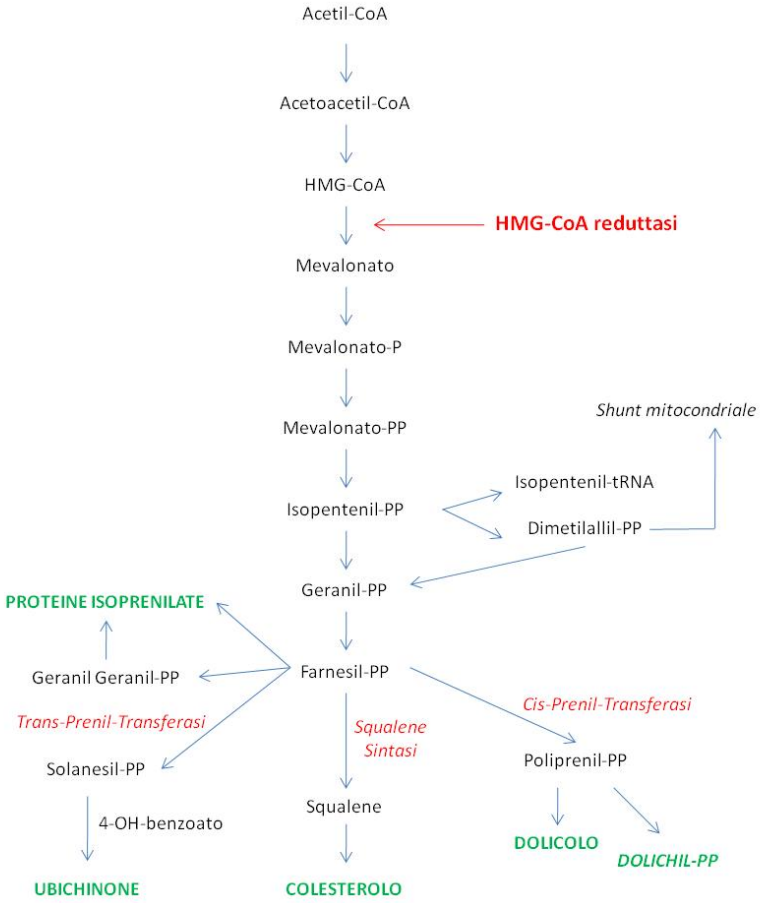
Fig.1 ***Complesso costituito da HMG-CoAR, HMG-CoA e NADP$^+$ (Istvan, 2002)***



Nel mammifero il mevalonato ha un ruolo cruciale come precursore della sintesi di colesterolo e, quindi anche, della produzione di ormoni; nella glicosilazione proteica come precursore del dolicolo-P; nella respirazione cellulare, tramite la produzione di ubichinone; nella sintesi proteica, come precursore dei prenili per il tRNA e per le proteine prenilate. L'HMG-CoAR è uno degli enzimi maggiormente regolato (Goldstein and Brown, 1990). L' HMG-CoAR, come già detto, catalizza la conversione del HMG-CoA in mevalonato, tale reazione richiede l'utilizzo di due molecole di NADPH. Il mevalonato viene, quindi, convertito in isopentenilpirofosfato, attraverso tre reazioni catalizzate da enzimi: fosforilazione del mevalonato, ulteriore fosforilazione

e decarbossilazione. L'isopentenilpirofosfato, è il precursore dello squalene, e, quindi del colesterolo, ma è utilizzato anche per la sintesi di altri prodotti fisiologicamente importanti, come i tocoferoli ed altre vitamine liposolubili, l'ubichinone, componente importante della catena di trasporto degli elettroni; i dolicoli, importanti nell'organizzazione dei fosfolipidi di membrana e necessari per la sintesi di glicoproteine; l'isopentenil adenina, presente in alcuni tRNA; il farnesolo ed il geranilgeraniolo, necessari per la produzione di proteine farnesilate, come Ras e la lamina B, regolatori del ciclo cellulare (Farnsworth et al., 1989); e le proteine geranilgeranilate, come le Rab, coinvolte nel traffico intracellulare. I sali biliari derivano dal colesterolo, così come la vitamina D e gli ormoni steroidei, quali testosterone e β-estradiolo, responsabili dei caratteri sessuali e gli altri ormoni steroidei, quali l'aldosterone, che controllano l'equilibrio idrosalino (Moran et al., 1996). Il colesterolo si dimostra, inoltre, cruciale per la formazioni di microdomini di membrana, denominati *lipid raft*, che intervengono nella localizzazione di proteine di membrana o recettori e nella trasduzione del segnale cellulare (Rietveld and Simons, 1998).

Fig.2 ***Via metabolica di sintesi dei composti isoprenoidi (Ericsson and Dallner, 1993 modificata)***



La modulazione di tale enzima è regolata sia da un'inibizione a feedback da prodotti finali, che da ormoni; è attuata, a lungo termine, tramite il controllo della sintesi e della degradazione e, a breve termine, principalmente tramite meccanismi di fosforilazione e defosforilazione. L'attività della reduttasi varia in relazione a diversi stati fisiologici, come lo sviluppo, la gravidanza (Leoni et al., 1984) e l'invecchiamento (Marino et al., 2002). Infatti, durante la gravidanza si osserva una diminuzione dell'attività dell'HMG-CoAR epatica, indotta probabilmente da una parallela diminuzione della concentrazione dell'insulina plasmatica, la cui azione determina un aumento dell'attività della reduttasi (Leoni et al., 1984); durante lo sviluppo e durante l'invecchiamento si osserva, invece, un'attività più elevata dell'enzima (Leoni et al., 1984; Marino et al., 2002)[1].

Il fegato rappresenta il sito principale del mantenimento dell'omeostasi del colesterolo (Dietschy et al., 1993), operato mediante il controllo della biosintesi, attraverso l'attività dell'HMG-CoAR, dell'assunzione attraverso i recettori delle lipoproteine, del rilascio nel sangue mediante le lipoproteine, dell'accumulo tramite l'esterificazione e la conversione in acidi biliari (Weber et al., 2004).

In particolare, l'HMG-CoAR risulta essere regolato a diversi livelli che coinvolgono sia una regolazione a breve termine che a lungo termine (Goldstein and Brown, 1990).

La **regolazione a breve termine**, opera modulando lo stato di attivazione dell'enzima ed è assicurata sopratutto dal controllo della fosforilazione e defosforilazione dell'HMG-CoAR. L'AMPKα (da AMP-activated Kinase α) fosforila la reduttasi sulla Ser871 nei roditori inibendone l'attività; viceversa la PP2A (da Protein Phosphatase 2A) ne determina la defosforilazione e la conseguente attivazione dell'HMG-CoAR (Ching et al., 1996; Gaussin et al., 1997).

La **regolazione a lungo termine** della reduttasi è operata principalmente mediante il controllo della trascrizione e degradazione. La trascrizione del gene dell'HMG-CoAR è garantita dalle SREBP (da Sterol Regulatory Element Binding Protein), SREBP1a, -1c e -2 (Hua et al., 1993; Yokoyama et al., 1993), sintetizzati come precursori inattivi nel reticolo endiplasmatico. Il trasporto al Golgi, mediante l'azione della proteina SCAP (da SREBP Cleavage Activating Protein), permette il rilascio della porzione N-terminale trascrizionalmente attiva, nota come nuclear SREBP (nSREBP). La nSREBP promuove la trascrizione di oltre 30 geni coinvolti nel metabolismo lipidico (Horton et al., 2002). Il trasporto del complesso SCAP/SREBP è regolato dalla proteina Insig (da Insulin induced gene). In presenza di alti livelli di colesterolo nella cellula, SCAP lega Insig, portando ad un accumulo stabile del complesso Insig/SCAP/SREBP, che determina una diminuzione nei livelli di nSREBP e consiste in tal modo una riduzione nella trascrizione dei suoi geni *target* (Goldstein et al., 2006).

D'altra parte, Insig è in grado di legare direttamente l'HMG-CoAR. Il legame di Insig alla reduttasi, ne promuove **l'ubiquitinazione e la degradazione** mediante proteasoma (Goldstein et al., 2006).

Come riportato in precedenza, numerosi stati fisiologici mostrano variazioni nell'attività dell'HMG-CoAR.

Infatti nell'invecchiamento, la frequente ipercolesterolemia correlata a varie alterazioni patologiche è stata dimostrata essere dovuta ad un aumentata attività dell'HMG-CoAR (Marino et al., 2002). In questo stadio fisiologico non risulta però definito il ruolo svolto dall'aumentato contenuto di ROS e dalla diminuita disponibilità di ossigeno, due dei fattori coinvolti nelle variazioni riscontrabili nell'invecchiamento.

Nello sviluppo peri-natale, le variate richieste di colesterolo e proteine prenilate si accompagnano a variazioni di attività dell'enzima (Leoni et al., 1984) ma non si hanno indicazioni sulla funzionalità dei complessi regolativi.

Nel differenziamento, l'esigenza di alcuni prodotti dell'attività della reduttasi è presumibilmente alla base di alcune variazioni dell'attività dell'enzima ma non se ne conosce il ruolo ne i meccanismi molecolari che le determinano.

Lo studio di questi stati fisiologici eseguito su modelli sperimentali diversi scelti in base alla loro adeguatezza al processo in esame, si può avvalere sia di dati reperibili in letteratura che di risultati di nostre precedenti ricerche e di seguito viene riportata una sintesi delle informazioni sul comportamento della reduttasi in ognuno di essi.

- L'invecchiamento

L'invecchiamento[2] è un processo fisiologico definito come una generale perdita della capacità omeostatica dell'organismo, accompagnata da un'aumentata incapacità nel contrastare gli stress che rendono l'organismo vulnerabile alle malattie (Yu, 1996).

Studi precedenti hanno mostrato che durante l'invecchiamento si osservano variazioni nell'attività dell'HMG-CoAR dovute sia a modificazioni nel suo stato di attivazione che a variazioni nella velocità di degradazione dell'enzima stesso (Marino et al., 2002; Pallottini et al., 2004). Tali variazioni determinano un aumento nei livelli di due dei prodotti finali della via biosintetica di cui l'HMG-CoAR rappresenta l'enzima chiave, ossia colesterolo e dolicolo (Marino et al., 2002, Pallottini et al., 2003).

Fisiologicamente, in un animale adulto lo stato di attivazione, inteso come il rapporto tra l'attività espressa (enzima defosforilato) e l'attività totale dell'enzima (enzima defosforilato più enzima fosforilato), risulta essere pari a circa il 30-40%. Durante l'invecchiamento, invece si

osserva una modificazione di questo rapporto che diventa pari al 100% ossia l'enzima risulta essere totalmente attivato (Marino et al., 2002). Tale aumento nello stato di attivazione della reduttasi è stato messo in relazione con l'aumento dei radicali liberi osservabile durante l'invecchiamento. Infatti, in ratti adulti (3 mesi) mantenuti fin dallo svezzamento ad una dieta carente di due diversi componenti antiossidanti, che presentano quindi alti livelli di ROS si osserva un aumento dello stato di attivazione dell'HMG-CoAR in linea con quanto osservato durante l'invecchiamento (Pallottini et al., 2005).

Dati precedenti hanno mostrato come nei ratti di 24 mesi sottoposti fin dallo svezzamento a restrizione calorica veniva prevenuto l'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR e gli aumentati livelli di colesterolo ematici (Pallottini et al., 2003).

La restrizione calorica da più di 60 anni è definita una dieta anti-invecchiamento dato che è riconosciuta essere in grado di estendere la sopravvivenza dei roditori (Weindruch et al, 1988) e impedire l'instaurarsi e/o ritardare la progressione di molte malattie età-correlate, incluse neoplasie, malattie neurodegenerative e malattie autoimmuni (Maeda et al., 1985). Tale trattamento così come l'utilizzazione di ratti maschi di 24 mesi alimentati fin dallo svezzamento con una dieta arricchita di acidi grassi OMEGA-3, ad azione antiossidante (Ramaprasad et al., 2005; Kikugawa et al., 2003) ed ipocolesterolemizzante (Cook, 2005), può essere utilizzato come controllo degli effetti dell'invecchiamento e dei ROS, sui meccanismi di regolazione a breve e lungo termine.

Di particolare interesse è che durante l'invecchiamento e in alcune fasi dello sviluppo si osservano carenze di adeguate disponibilità di ossigeno e una correlazione tra stati ipossici[3] e metabolismo del colesterolo è stata mostrata in diversi modelli sperimentali

Ad esempio nel lievito e stato ipotizzato un coinvolgimento delle molecole SREBP nelle risposte sia a variazioni del livello di steroli che a differenti quantità di ossigeno (Hughes et al., 2005): è stato infatti dimostrato che lo *Schizosaccharomyces pombe*, una specie di lievito in grado di sintetizzare ergosterolo utilizza una via di segnale stimolata in seguito a condizioni ipossiche comprendente proteine omologhe a quelle presenti nell'uomo, come per esempio SREBP1.

In altri modelli è stato valutato l'effetto dell'apnea ostruttiva notturna, sindrome caratterizzata da periodi di ipossia intermittente e legata a diversi disturbi metabolici, tra cui dislipidemia (Li et al., 2006; Tanne et al., 2005; Tatsumi and Saibara, 2005) ed ipercolesterolemia (Li et al., 2005) correlati ad incrementi di SREBP1.

- Lo sviluppo[4]

Durante lo sviluppo fetale, l'intensa attività proliferativa che si verifica per il mantenimento di un adeguata velocità di crescita richiede una significativa quantità di colesterolo. Due sono le fonti di colesterolo fetale: endogena o esogena (Woollett, 2005; Schmid and Woollett, 2003). Il colesterolo endogeno è sintetizzato *de novo*. Come ci si può aspettare da un composto essenziale per la crescita, il tasso di sintesi di colesterolo fetale è relativamente elevato (Carr and Simpson, 1982; Dietschy et al., 1993). Poiché il feto non entra direttamente in contatto con la circolazione materna, la sua fonte di colesterolo esogeno deriva dalla placenta e dal sacco vitellino ed è secreto nella circolazione fetale (Woollett, 2005). Nelle fasi precoci della gravidanza il colesterolo materno contribuisce in maniera sostanziale alla richiesta di colesterolo del feto, mentre nelle fasi tardive è la sintesi de novo piuttosto che il trasferimento dalle lipoproteine materne a soddisfare tale richiesta (Herrera et al., 2006).

Il fegato nello stadio fetale e neonatale sintetizza colesterolo in eccesso rispetto all'accumulo, suggerendo una secrezione epatica di tale composto nel plasma. Prima dell'inizio dell'allattamento, la velocità di sintesi *de novo* è ancora sufficiente ma non più così elevata per determinare accumulo di colesterolo. Dopo l'inizio dell'allattamento, l'accumulo di colesterolo eccede la sintesi, suggerendo che la disponibilità di colesterolo derivi dal latte materno (Haave and Innis, 2001).

L'attività dell'HMG-CoAR, subisce notevoli variazioni durante lo sviluppo pre- e post-natale (McNamara et al., 1972; Leoni et al., 1984, Leoni et al., 1985 a,b). L'attività dell'enzima nel fegato fetale di ratto aumenta durante gli stadi tardivi della gestazione, con un tasso 2-3 volte maggiore che nell'adulto, quindi decresce alla nascita e rimane molto bassa fino allo svezzamento, quando aumenta nuovamente per raggiungere i valori dell'adulto (McNamara et al., 1972). I cambiamenti di attività dell'HMG-CoAR risultano essere in accordo con la richiesta di colesterolo durante lo sviluppo. È stato suggerito che l'alto tasso di colesterologenesi fetale sia correlato con la rapida utilizzazione di colesterolo per la steroidogenesi (Parker et al., 1983; Carr and Simpson, 1981). La bassa attività dell'HMG-CoAR durante l'allattamento e la risalita allo svezzamento sono state correlate alla diversa composizione della dieta ricca di grassi durante l'allattamento e ricca di carboidrati allo svezzamento (Innis, 2007).

- Il differenziamento[4]

Studi precedenti hanno mostrato come l'attività dell'HMG-CoAR sia essenziale nella regolazione del differenziamento in differenti tipi cellulari (Viccica et al., 2007; Castellano et al.,

1994). Nello studio del processo differenziativo particolarmente utili si sono rivelate le cellule L6 (mioblasti fetali di ratto) stimolate con un ormone differenziante, l'insulina. Infatti queste cellule mononucleate, se sottoposte a determinate condizioni di coltura differenziano organizzandosi in miotubi e consentono di verificare le variazioni dei parametri in due diversi stadi differenziativi ben riconoscibili. Oltre all'azione pro-differenziante, è ampiamente riportato che l'effetto dell'insulina si esercita anche sulla regolazione dei livelli di Insig1 con potenziali interessanti ricadute sulla reduttasi (Goldstein et al., 2006), ma al momento non si hanno indicazioni né sulle variazioni, né sui meccanismi di regolazione e tantomeno sul ruolo della reduttasi in tale modello.

SCOPO DELLA RICERCA

Scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di definire i meccanismi alla base delle variazioni di attività dell'HMG-CoAR in diversi stati fisiologici dato che l'elucidazione delle varie tappe coinvolte può essere utile per evidenziare eventuali disfunzioni e progettare interventi terapeutici.

Sono stati presi in esame, l'invecchiamento, lo sviluppo e il differenziamento utilizzando modelli sperimentali diversi *in vivo* e *in vitro*.

Per quanto riguarda l'invecchiamento, si osserva una completa attivazione dell'HMG-CoAR; tale aumento dello stato di attivazione viene messo in relazione con l'aumento dei radicali liberi e viene sostanzialmente prevenuto nei ratti sottoposti fin dallo svezzamento a restrizione calorica. Pertanto, una prima serie di esperimenti è stata finalizzata ad analizzare la eventuale correlazione tra aumentati livelli di ROS e aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR e all'individuazione del meccanismo coinvolto.

La relazione tra aumentati livelli di ROS e attività della reduttasi è stata studiata utilizzando modelli sperimentali diversi:

a) ratti maschi di 3 mesi trattati in cronico ed in acuto con tioacetammide (TAA), sostanza in grado di indurre aumentati livelli di radicali liberi nel fegato (Mehmetçik et al., 2007);

b) cellule HepG2 trattate con perossido di idrogeno (H_2O_2), trattamento comunemente utilizzato per indurre un aumento dello stress ossidativo (Chen et al., 2007);

c) animali a restrizione calorica utilizzati come controllo degli effetti dell'invecchiamento sui parametri presi in considerazione;

d) ratti maschi di 24 mesi alimentati fin dallo svezzamento con una dieta arricchita di acidi grassi OMEGA-3[5], di cui è nota l'azione antiossidante (Ramaprasad et al., 2005; Kikugawa et al., 2003) e l'effetto ipocolesterolemizzante (Cook, 2005).

Inoltre, avendo già osservato che le variazioni della velocità di degradazione dell'HMG-CoAR osservabile nell'invecchiamento non sono correlabili alle variazioni dei suoi livelli e sono insensibili all'aumento dei ROS (Pallottini et al., 2004), in ratti di 24 mesi AL, CR e OMEGA-3 è stato anche analizzato il comportamento delle proteine coinvolte nella regolazione a lungo termine dell'HMG-CoAR

Una ulteriore serie di esperimenti è stata volta allo studio dell'effetto dell'ipossia sulla attività e sulla regolazione della HMG-CoAR. È stato anche preso in esame il ruolo svolto dall'*hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1), ritenuto il fattore di trascrizione di numerosi geni coinvolti nella risposta fisiologica all'ipossia. L'effetto dell'ipossia sul metabolismo epatico del colesterolo e sull'attività del suo enzima chiave è stato studiato in un sistema cellulare

controllabile ovvero colture di cellule di epatocarcinoma umano (HepG2) sottoposte ad ipossia ambientale (2% di O_2) o ad ipossia chimica (100 μM di $CoCl_2$) in presenza ed in assenza di un inibitore degli effetti del HIF-1 (YC-1).

Per quanto riguarda lo sviluppo è stato utilizzato come modello sperimentale lo sviluppo perinatale del fegato di ratto. Variazioni sia di esigenza sia di disponibilità di prodotti dell'HMG-CoAR durante lo sviluppo sono ben documentati, non altrettanto le eventuali variazioni dei meccanismi di regolazione.

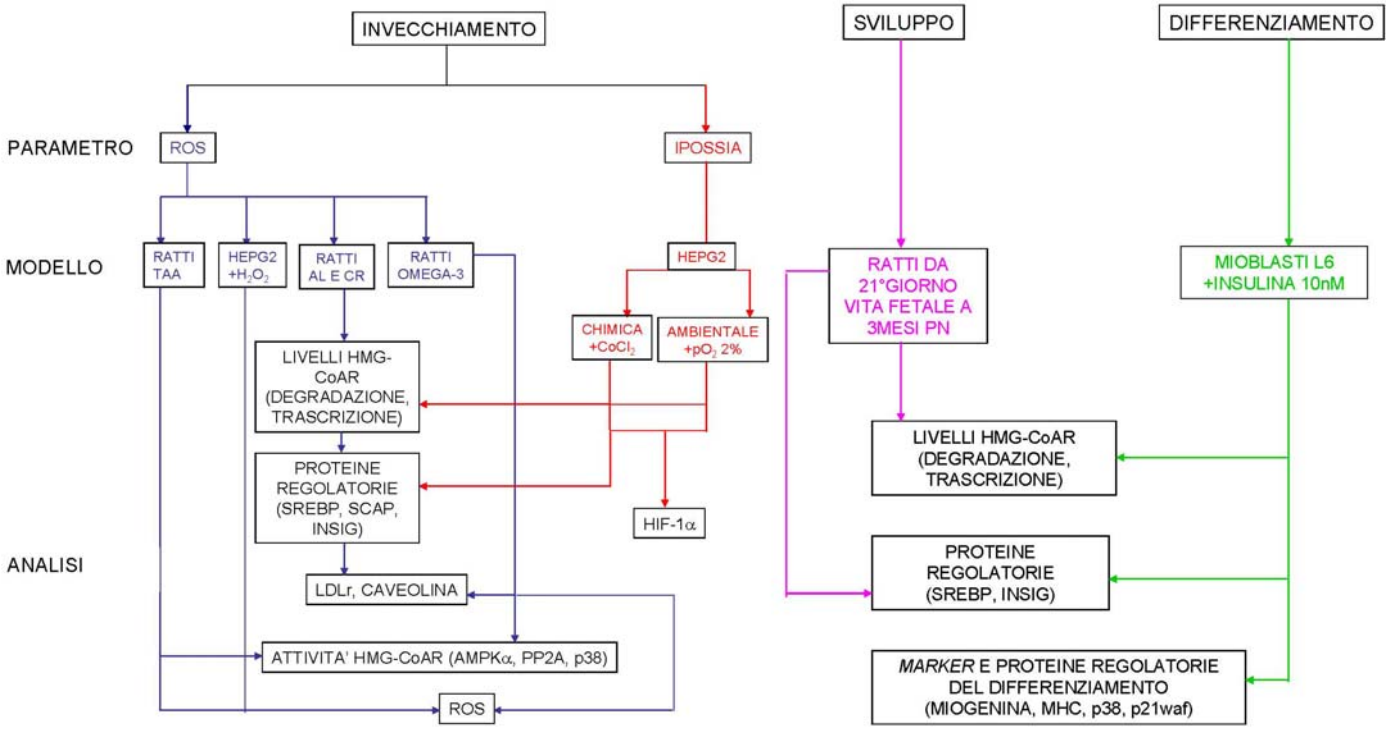
I meccanismi alla base di tali modificazioni di attività sono stati pertanto studiati utilizzando come modello sperimentale fegato di ratti a diversi stadi di sviluppo, e precisamente al ventunesimo giorno di vita intrauterina, ad 1 giorno, a 8 giorni, a 15 giorni e a 3 mesi di vita post-natale che riflettono rispettivamente le fasi di vita fetale e neonatale, di allattamento, di svezzamento e adulto. In particolare sono stati analizzati i livelli delle proteine SREBP, Insig che sono coinvolte nella trascrizione e nella degradazione dell'HMG-CoAR e quindi nella sua regolazione a lungo termine.

Per quanto riguarda lo studio della regolazione della reduttasi durante il differenziamento cellulare, si è optato per un modello facilmente differenziabile; sono state utilizzate come modello sperimentale cellule L6 (mioblasti fetali di ratto) stimolate con un ormone pro-differenziante, l'insulina (Pontecorvi et al., 1988) che oltre all'azione differenziante presenta interessanti correlazioni con il Insig e SREBP. La scelta di questo modello di miocellule nasce anche dal fatto che è ampiamente riportato che i trattamenti con statine, potenti inibitori della HMG-CoAR largamente utilizzate nel trattamento dell'ipercolesterolemia, provocano effetti collaterali quali miopatie, caratterizzate da dolore e debolezza dei muscoli scheletrici, elevazione dei livelli sierici della creatinina chinasi, indice di danno muscolare e rabdomiolisi (Ogura et al., 2007).

Pertanto in mioblasti L6 (non differenziati, ND) stimolati da insulina sono stati analizzate le variazioni dell'HMG-CoAR e del suo *network* regolatorio.

Oltre a valutare se l'HMG-CoAR subisse variazione durante il differenziamento, lo scopo di questo lavoro è stato quello di comprendere l'importanza di tale enzima in questo stadio fisiologico. E' stato analizzato quindi se l'inibizione dell'attività della reduttasi avesse effetti sull'espressione della miogenina e dell'MHC (da Myosin Heavy Chain) rispettivamente *marker* precoce e *marker* tardivo del differenziamento e se le putative variazioni dell'HMG-CoAR fossero correlate con la via di segnale p38/MAPK in grado di regolare il processo differenziativo.

PROGETTO SPERIMENTALE



RISULTATI

SEZIONE I: HMG-CoAR E INVECCHIAMENTO

A-*ROS E REGOLAZIONE A BREVE TERMINE DELL'ATTIVITA' DELL'HMG-CoAR*

Ratti Wistar di 3 mesi trattati con TAA

Dosaggio di ROS e stato di attivazione dell'HMG-CoAR

La eventuale correlazione tra aumentati livelli di ROS e aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR; è stata studiata utilizzando ratti maschi di 3 mesi trattati in cronico ed in acuto con tioacetammide (TAA), sostanza in grado di indurre aumentati livelli di radicali liberi nel fegato. L'effetto del trattamento con TAA degli animali sui livelli di ROS, è stato verificato negli omogenati di fegato dei gruppi sperimentali e dei controlli tramite la sonda diclorofluorescina (DCF) in assenza e in presenza di solfato ferroso 10μM per dosare il livello basale dei ROS e le specie perossidate.

Lo stato di attivazione dell'HMG-CoAR, è stato analizzato misurando l'attività dell'enzima in base alla quantità di ^{14}C-MVA prodotto dall'enzima a partire dal 3 ^{14}C-HMG-CoA.

Figura 1. Attività dell'HMG-CoAR (a) e dosaggio dei ROS (b)

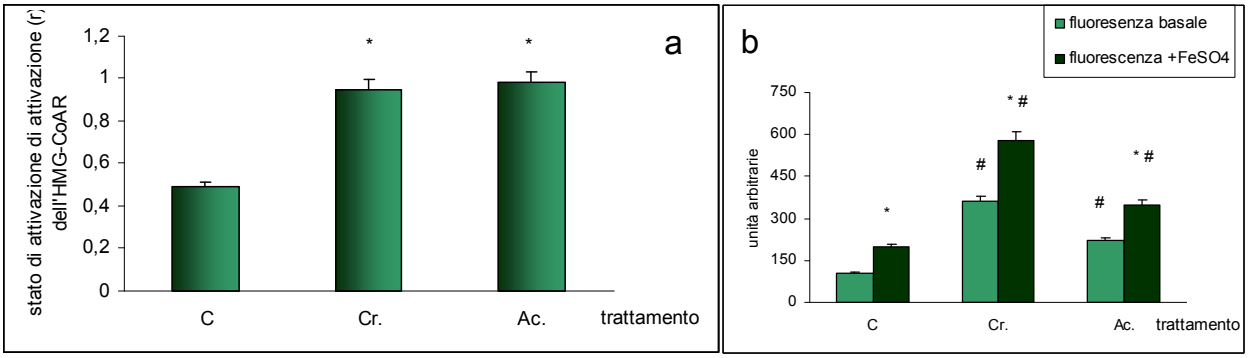


Figura 1 (a): L'attività dell'enzima e il suo stato di attivazione è stata analizzato con il metodo radioisotopico misurando la quantità di ^{14}C-MVA prodotto dall'enzima a partire dal 3 ^{14}C-HMG-CoA, in presenza e in assenza di NaF. I risultati ottenuti sono espressi stato di attivazione (r). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto allo stesso campione del controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti (b): L'effetto del trattamento con TAA sui livelli di ROS è stato analizzato tramite una sonda fluorescente, la diclorofluorescina (DCF), sia negli omogenati di fegato dei gruppi sperimentali e dei controlli. Dopo aver analizzato il livello basale, ai campioni è stato aggiunto solfato ferroso 10μM per mettere in evidenza le specie perossidate. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto alla propria fluorescenza basale. #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto allo stesso campione del controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

L'analisi dei dati mostra che negli animali trattati con TAA sia in cronico che in acuto, il livello basale di radicali liberi è molto più elevato rispetto al controllo. Dopo l'aggiunta di solfato ferroso sia gli animali trattati in cronico che gli animali in acuto mostrano un netto incremento della fluorescenza, evidenziando la presenza di specie perossidate.

In ratti trattati con TAA lo stato di attivazione (r) dell'HMG-CoAR, risulta più elevato rispetto al controllo, indicando che, anche in questo modello in presenza di alte quantità di ROS l'enzima risulta completamente attivato e suggerendo una correlazione diretta tra l'aumento di radicali liberi e variazione dell'attività dell'HMG-CoAR.

HepG2 trattate con H_2O_2

Dosaggio di ROS, stato di attivazione e fosforilazione dell'HMG-CoAR

Il meccanismo alla base dell'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR ROS-dipendente, è stato studiato in un modello cellulare epatico, cellule HepG2, trattate con perossido d'idrogeno, un trattamento comunemente utilizzato per indurre elevati livelli di ROS (Clerk et al., 1998; Yoshizumi et al., 2000; Kosmidou et al., 2002).

E' stata inizialmente controllata l'induzione dose-dipendente di ROS nelle cellule HepG2 trattate con differenti concentrazioni di H_2O_2 (da 30µM a 600µM).

Figura 2. Dosaggio dei ROS in cellule HepG2 stimolate con differenti concentrazioni di H_2O_2

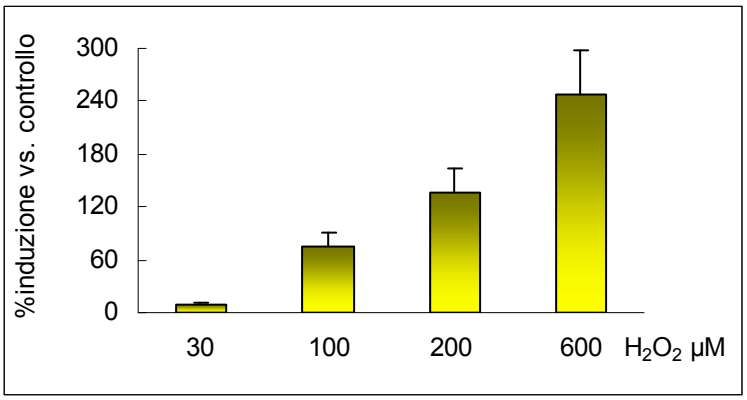


Figura 2: Le cellule HepG2 sono state trattate con differenti concentrazioni di H_2O_2 (da 30µM a 600µM). I risultati sono espressi come percentuale di incremento della fluorescenza nelle cellule trattate con H_2O_2 rispetto al proprio controllo non stimolato.

I risultati mostrano un induzione dose-dipendente di ROS in queste cellule; in accordo con altri autori (Clerk et al., 1998; Yoshizumi et al., 2000; Kosmidou et al., 2002), è stata, quindi utilizzata la dose di 200µM di H_2O_2 per tutti gli esperimenti successivi.

E' stato, successivamente valutato, l'effetto dell'aumento di ROS sullo stato di attivazione dell'HMG-CoAR. In figura 3 è riportato il *time-course* (da 0 a 4 ore di stimolazione H_2O_2 200µM) dello stato di attivazione espresso come r, ossia come rapporto tra l'attività dell'enzima in presenza di NaF e attività in assenza di NaF (a), ed il *time-course* (da 0 a 1 ora di stimolazione 200µM H_2O_2) dello stato di fosforilazione dell'HMG-CoAR valutato mediante Western Blot (b). Per escludere un'azione diretta dell'H_2O_2 sulla reduttasi, sono state quindi, preparate le membrane totali da cellule non stimolate ed incubate a 37°C con H_2O_2 200µM per 15 minuti. Su tali campioni è stata successivamente misurato lo stato di attivazione dell'HMG-CoAR (c).

Figura 3. Stato di attivazione (a) e fosforilazione (b) dell'HMG-CoAR nelle cellule HepG2 e stato di attivazione dell'HMG-CoAR in membrane stimolate con H_2O_2 (c)

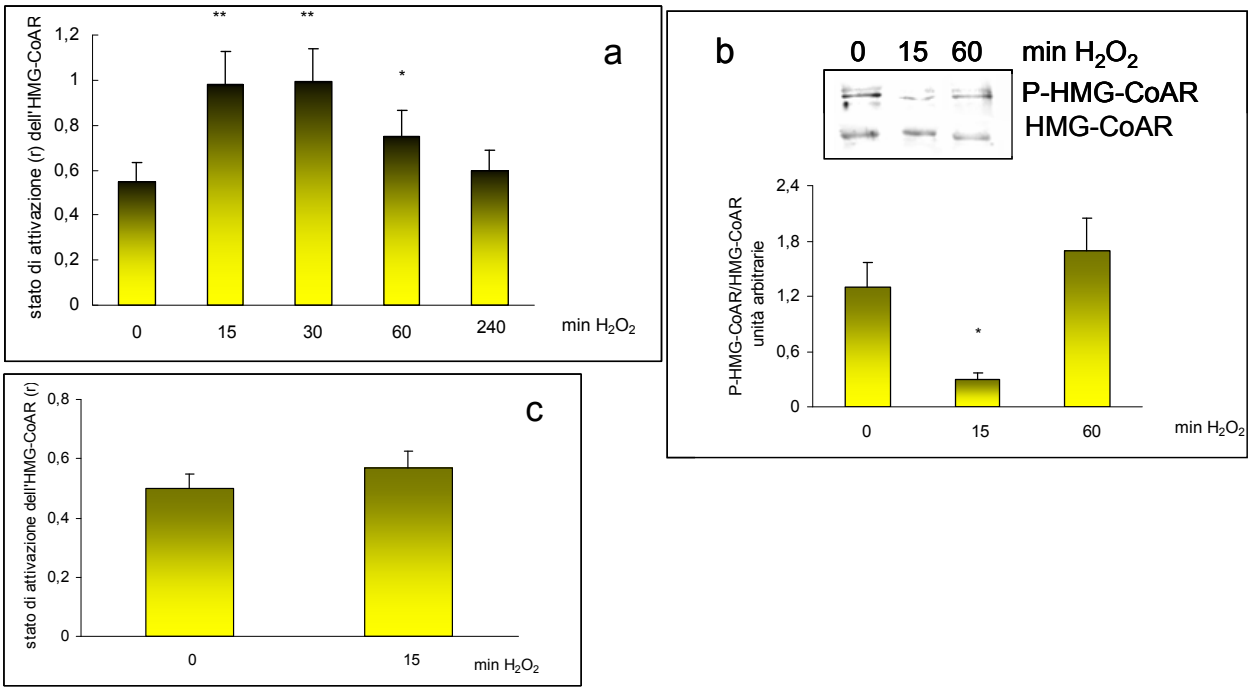


Figura 3 (a): *Time-course* (da 0 a 4 ore di stimolazione 200µM H_2O_2) dello stato di attivazione dell'HMG-CoAR espresso come r. *=p<0.05; **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo non stimolato (0 min). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): *Time-course* (da 0 a 1 ora di stimolazione 200µM H_2O_2) dello stato di fosforilazione dell'HMG-CoAR (Ser872) valutato mediante Western Blot. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo non stimolato (0 min). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (c): Su membrane totali da cellule non stimolate ed incubate a 37°C con 200µM di H_2O_2 per 15 minuti, è stato misurato lo stato di attivazione (r) dell'HMG-CoAR.

I risultati mostrano che l'induzione di alti livelli di ROS determina un aumento dello stato di attivazione dell'HMG-CoAR, la cui induzione è massima a 15 minuti dalla stimolazione con H_2O_2 e decresce fino ai valori del controllo a 4 ore dalla stimolazione (a). Lo stato di fosforilazione dell'enzima (b) risulta essere in pieno accordo con il suo stato di attivazione (a). Per di più, si può

verificare che il trattamento delle membrane con H_2O_2 non altera lo stato di attivazione della reduttasi (b) escludendo un effetto diretto dell'acqua ossigenata sulla membrana e suggerendo l'implicazione di una via di segnale citosolica.

Fosforilazione, attività e associazione con l'HMG-CoAR dell'AMPKα in cellule HepG2

Per valutare se l'aumento dello stato di attivazione e la ridotta fosforilazione della reduttasi evidenziato in questo modello cellulare potesse dipendere da una variazione negli enzimi che la modulano, è stato inizialmente analizzato il comportamento dell'AMPKα, enzima responsabile della fosforilazione ed inattivazione dell'HMG-CoAR (figura 4). È stato, quindi studiato nelle HepG2 stimolate con H_2O_2, lo stato di fosforilazione (a) e l'attività dell'AMPKα (b), la sua capacità di fosforilare l'ACC (c), altro suo enzima *target*, nonchè la sua capacità di associarsi con l'HMG-CoAR (d).

Figura 4. Stato di fosforilazione (a) e attività dell'AMPKα (b), stato di fosforilazione dell'ACC (c) e associazione dell'AMPKα con l'HMG-CoAR (d)

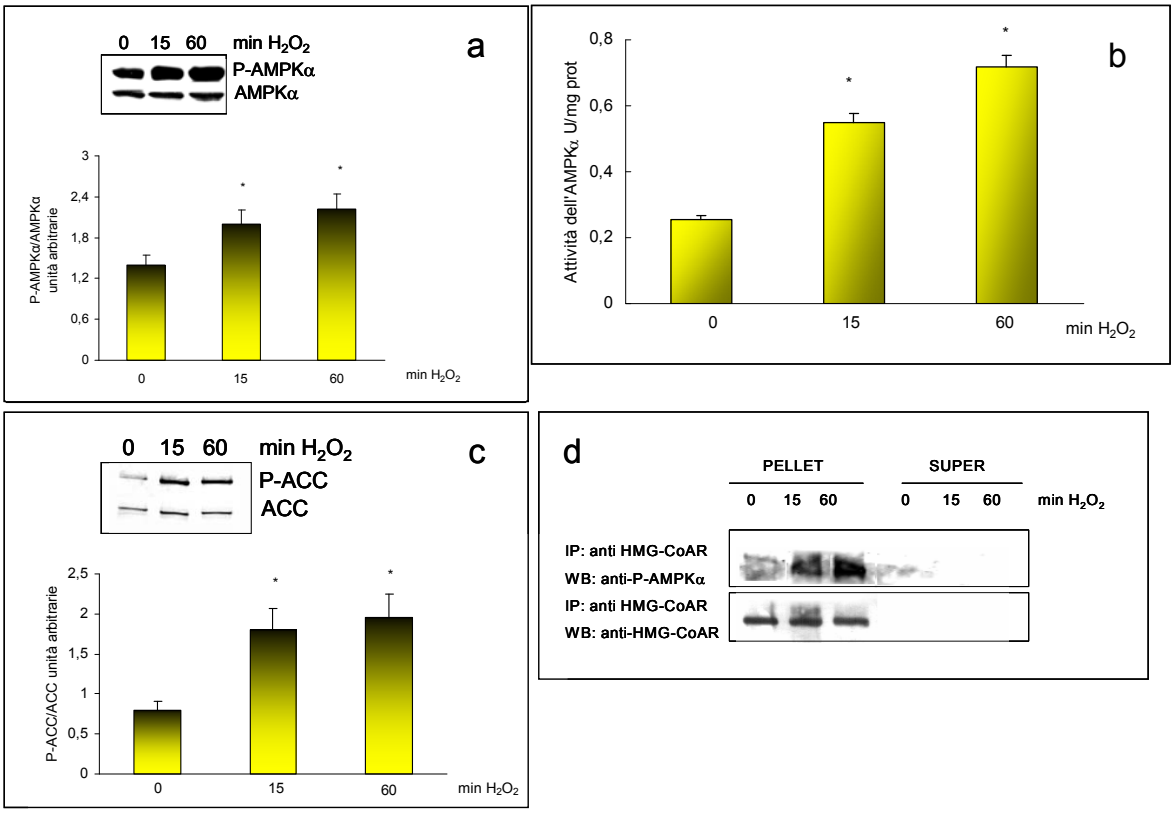


Figura 4 (a): Stato di fosforilazione dell'AMPKα (Thr172) nelle cellule HepG2 stimolate con 200μM H_2O_2 per 15 e 60 minuti mediante Western blot.*=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo non stimolato (0 min). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Attività dell'AMPKα valutato mediante immunoprecipitazione e saggio radioisotopico, analizzando l'attività totale dell'enzima.*=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo non stimolato (0 min). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (c): Stato di fosforilazione dell'ACC (Ser79) nelle cellule HepG2 stimolate con 200μM H_2O_2 per 15 e 60 minuti mediante Western blot. *=p< 0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo non stimolato (0 min). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (d): Associazione dell'AMPKα con l'HMG-CoAR. L'HMG-CoAR è stata immunoprecipitata e sottoposta a Western Blot e analizzata per la presenza di anti-AMPKα.

I risultati mostrano che nelle HepG2 stimolate con perossido d'idrogeno l'AMPKα risulta più fosforilata (a), più attivata (b) ed in grado di fosforilare l'ACC (c). Si può anche osservare che l'AMPKα mantiene la capacità di associarsi alla reduttasi (d), indicando che la ridotta fosforilazione della reduttasi non deriva, in questo modello sperimentale, da un alterazione dell'attività e del comportamento della chinasi specificamente responsabile della sua regolazione.

Livelli, ruolo e associazione con l'HMG-CoAR della PP2A e attività dell'HMG-CoAR in presenza di inibitori delle fosfatasi.

Si è, quindi passati allo studio della PP2A, l'enzima responsabile della defosforilazione e della conseguente attivazione dell'HMG-CoAR. Nelle HepG2 stimolate con H_2O_2, è stato analizzato il comportamento della subunità catalitica, misurando le eventuali variazioni sia del livello che dell'associazione con l'HMG-CoAR. Il ruolo della PP2A è stato altresì definito mediante il pretrattamento delle cellule con un inibitore specifico della PP2A (acido ocadaico o OA) e con inibitori generici delle fosfatasi (NaF and Na_3VO_4) e misurando l'attività espressa (+NaF) dell'HMG-CoAR, dopo trattamento con H_2O_2.

Figura 5. Livelli della subunità catalitica della PP2A (a), associazione della subunità catalitica della PP2A con l'HMG-CoAR (b), attività dell'HMG-CoAR in cellule HepG2 pretrattate con inibitori delle fosfatasi (c)

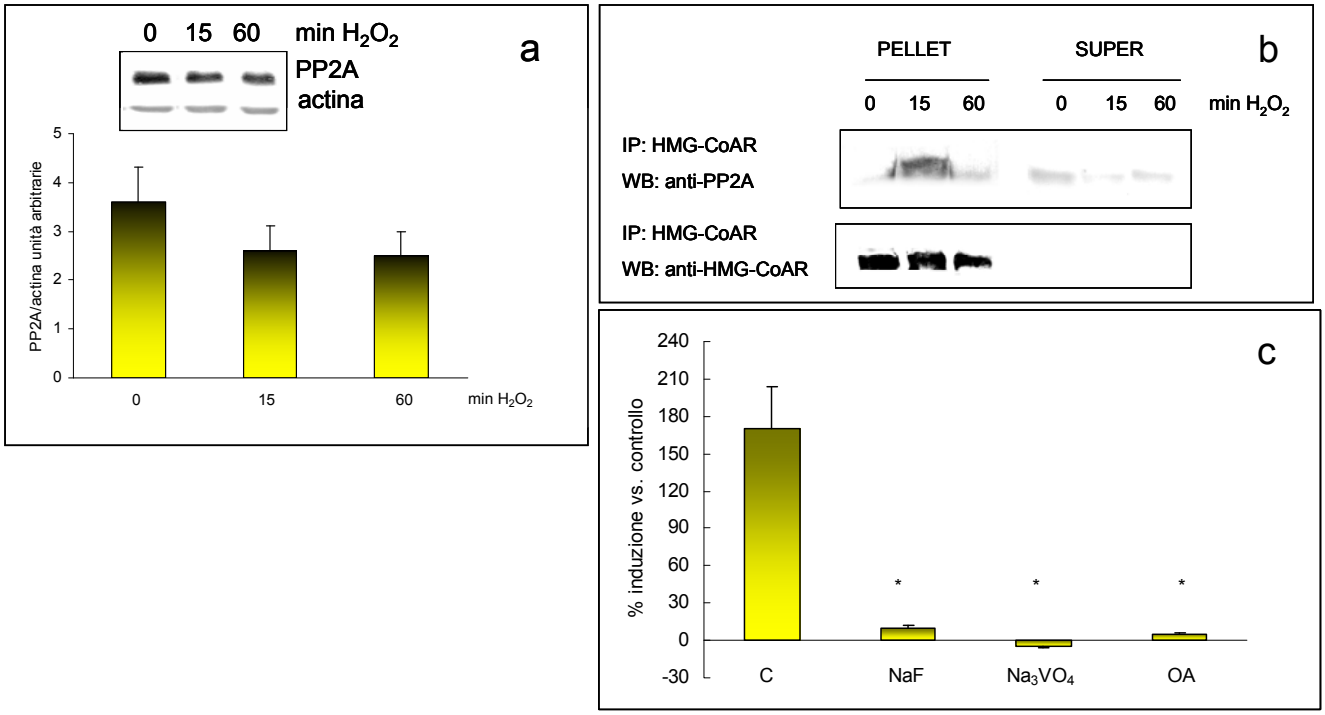


Figura 5: (a): I livelli della subunità catalitica della PP2A sono stati valutati mediante Western blot. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Associazione della subunità catalitica della PP2A con l'HMG-CoAR. L'HMG-CoAR è stata immunoprecipitata e sottoposta a Western Blot e analizzata per la presenza di anti-PP2A (c): Le cellule HepG2 sono state pretrattate sia con inibitori generici delle fosfatasi (NaF and Na_3VO_4) che con un inibitore specifico della PP2A (acido ocadaico o OA) e poi stimolate con H_2O_2. Dopo tale trattamento è stata, quindi misurata l'attività espressa (+NaF) dell'HMG-CoAR mediante saggio radioisotopico. I risultati sono espressi con percentuale di incremento dell'attività in presenza di H_2O_2 rispetto al proprio controllo non stimolato (C) o trattato solo con l'inibitore delle fosfatasi. *=$p<0.05$ valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo non stimolato (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

I risultati ottenuti mostrano che nelle cellule HepG2 stimolate con H_2O_2 e quindi, con alti livelli di ROS, la subunità catalitica della PP2A non presenta variazioni del livello (a), ma risulta essere maggiormente associata all'HMG-CoAR (b). Questi dati, oltre al fatto che il trattamento delle cellule con inibitori delle fosfatasi previene l'attivazione dell'HMGR (c) indicano che l'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR è dipendente dalla PP2A.

Coinvolgimento della via di segnale p38/MAPK nell'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR indotto dall'H_2O_2 in cellule HepG2

E' stato riportato che l'attivazione della p38 è in grado di indurre un aumento nell'attività e nell'associazione con i suoi bersagli, della PP2A (Liu and Hofmann, 2004). Pertanto, per verificare se l'attivazione di questa via di segnale fosse coinvolta anche nel processo di attivazione della reduttasi indotto da radicali liberi, è stato controllato se il trattamento con H_2O_2 delle HepG2 determinasse l'attivazione della p38 (ovvero la sua fosforilazione) e se il pretrattamento delle cellule con l'inibitore specifico della p38, SB203580 influenzasse sia l'attivazione e la defosforilazione dell'HMG-CoAR che la sua associazione con la PP2A.

Figura 6. Attivazione per fosforilazione della p38 (a) indotta da H_2O_2, stato di attivazione (b) e di fosforilazione (c) dell'HMG-CoAR, associazione della PP2A con la reduttasi (d) in presenza ed in assenza dell'inibitore della p38

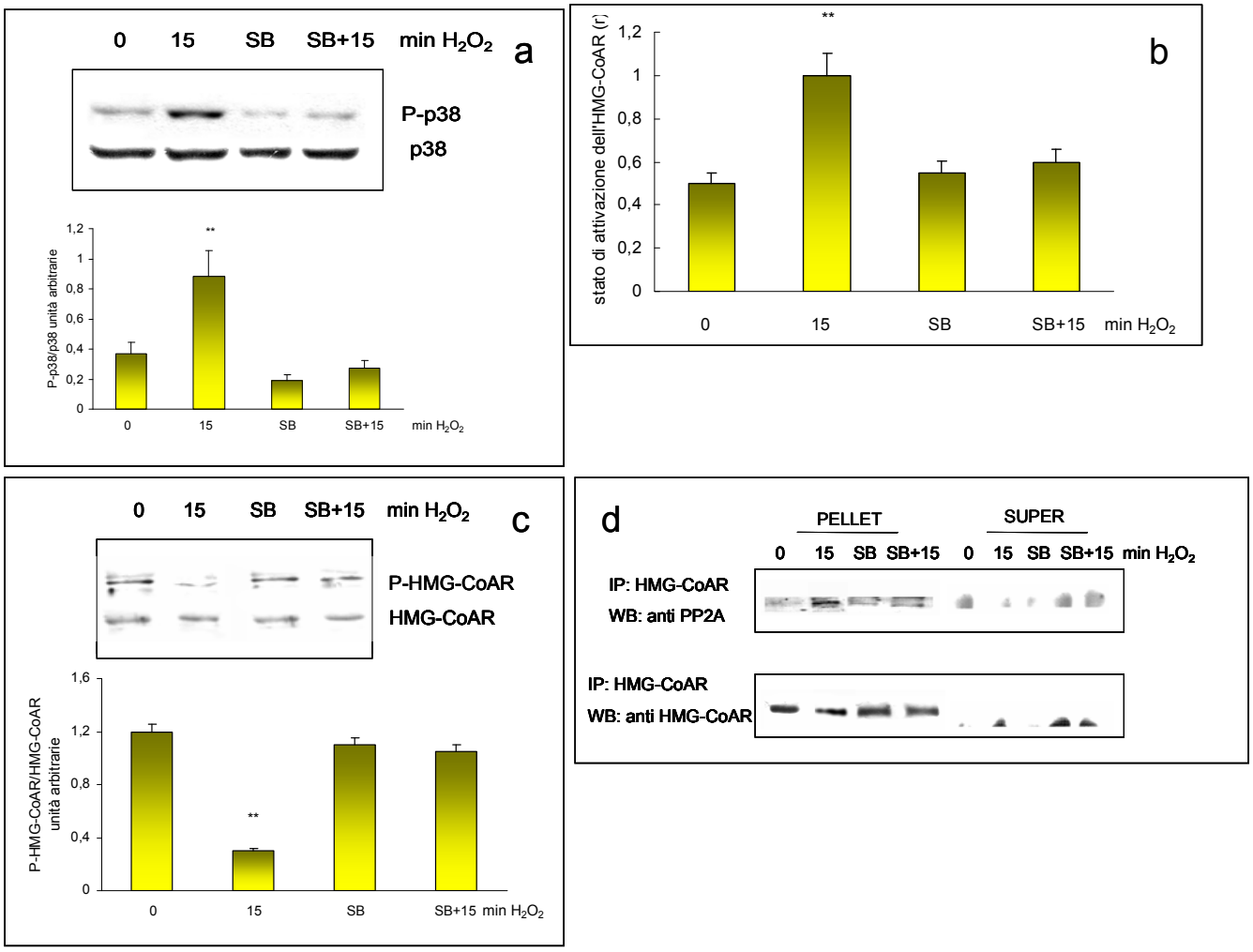


Figura 6. (a): Stato di fosforilazione di p38 (Thr180/Tyr182) nelle cellule HepG2 stimolate con 200µM H_2O_2 per 15 in presenza ed in assenza del suo inibitore specifico, SB203580 valutato mediante Western blot. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo non stimolato (0 min). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Stato di attivazione dell'HMG-CoAR nelle cellule HepG2 stimolate con 200µM H_2O_2 per 15 minuti in presenza ed in assenza del suo inibitore specifico, SB203580 valuato mediante saggio radioisotopico. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo non stimolato (0 min). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (c): Stato di fosforilazione dell'HMG-CoAR (Ser872) nelle cellule HepG2 stimolate con 200µM H_2O_2 per 15 in presenza ed in assenza del suo inibitore specifico, SB203580 valutato mediante Western blot. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo non stimolato (0 min). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.(d): Associazione della PP2A con l'HMG-CoAR valutato mediante coimmunoprecipitazione in presenza ed in assenza dell'inibitore della p38.

I risultati mostrano che il trattamento con perossido d'idrogeno responsabile dell'aumento dei ROS è in grado di indurre l'attivazione della p38 (a) e che il pretrattamento con l'inibitore della p38 è in grado di prevenire l'aumentato stato di attivazione (b) e di defosforilazione (c) dell'HMG-CoAR, nonché l'associazione della PP2A (d) con l'HMG-CoAR.

Ratti Sprague-Dawley di 24 mesi AL o CR

Relazione tra ROS e attività della HMG-CoAR

In animali di 24 mesi alimentati AL o animali sottoposti a restrizione calorica, come controllo degli effetti dell'invecchiamento sono stati presi in esame i parametri precedentemente considerati: livelli di ROS e lo stato di fosforilazione della reduttasi nel fegato, il comportamento dell'AMPKα e della PP2A e l'attivazione della p38.

Figura 7. Dosaggio dei ROS (a) e stato di fosforilazione (b) dell'HMG-CoAR

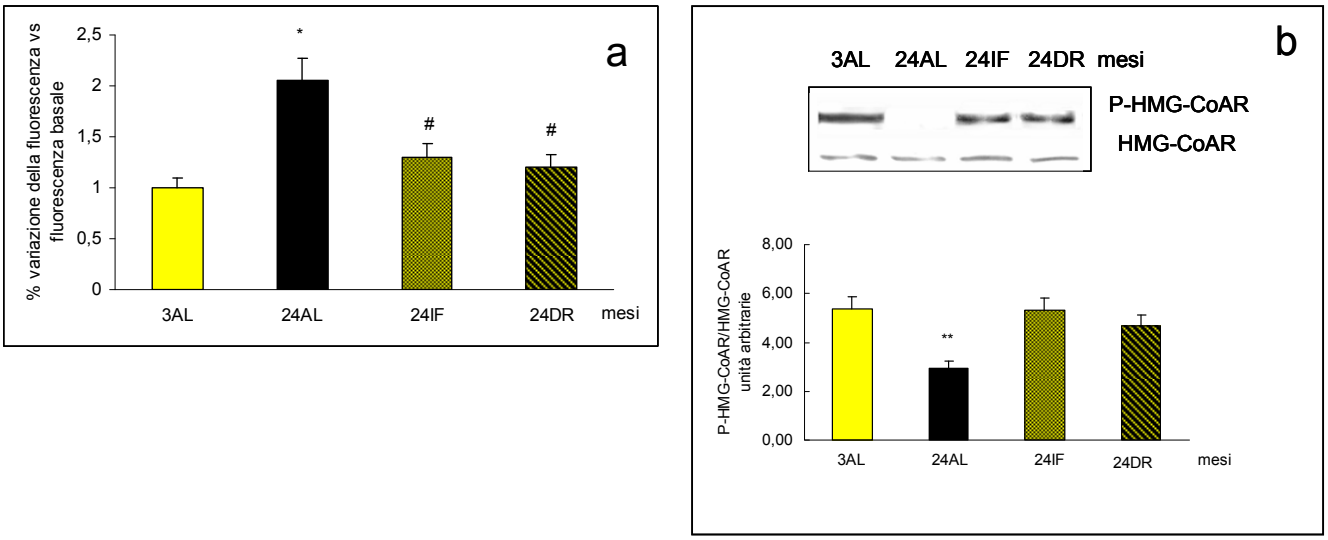


Figura 7. (a): Il dosaggio dei livelli di ROS è stato effettuato tramite una sonda fluorescente, la diclorofluorescina (DCF), sia negli omogenati di fegato dei gruppi sperimentali e dei controlli. Dopo aver analizzato il livello basale, ai campioni è stato aggiunto, successivamente, solfato ferroso 10μM per mettere in evidenza le specie perossidate. I risultati sono espressi come percentuale di incremento della fluorescenza negli omogenati di fegato a cui è stato aggiunto solfato ferroso rispetto alla fluorescenza basale. *=$p<0.05$ valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=$p<0.05$ valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Stato di fosforilazione dell'HMG-CoAR (Ser871) valutato mediante Western blot. **=$p< 0.001$ valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

L'analisi dei dati mostra che negli animali di 24 mesi sottoposti a restrizione calorica il contenuto epatico di specie perossidate è paragonabile a quello degli animali giovani (3 mesi) (a). Per di più, nel fegato di ratto 24 AL, si osserva una forte riduzione dello stato di fosforilazione della reduttasi (b), in accordo con l'aumentato stato di attivazione dell' HMG-CoAR già riportato, sostanzialmente prevenuta nel fegato dei ratti sottoposti a restrizione calorica.

Ruolo degli enzimi modulatori dello stato di fosforilazione dell'HMG-CoAR, AMPKα e PP2A

Per valutare se l'aumento dello stato di attivazione e la ridotta fosforilazione della reduttasi evidenziato durante l'invecchiamento potesse dipendere da una variazione negli enzimi che la modulano, è stato analizzato il comportamento dell'AMPKα, prendendo in esame anche in questo modello *in vivo* l'attività, lo stato di fosforilazione, la capacità di fosforilare ACC e di associarsi all'HMG-CoAR.

Figura 8. Fosforilazione (a), attività dell'AMPKα (b), fosforilazione dell'ACC (c) e associazione dell'AMPKα con l'HMG-CoAR (d)

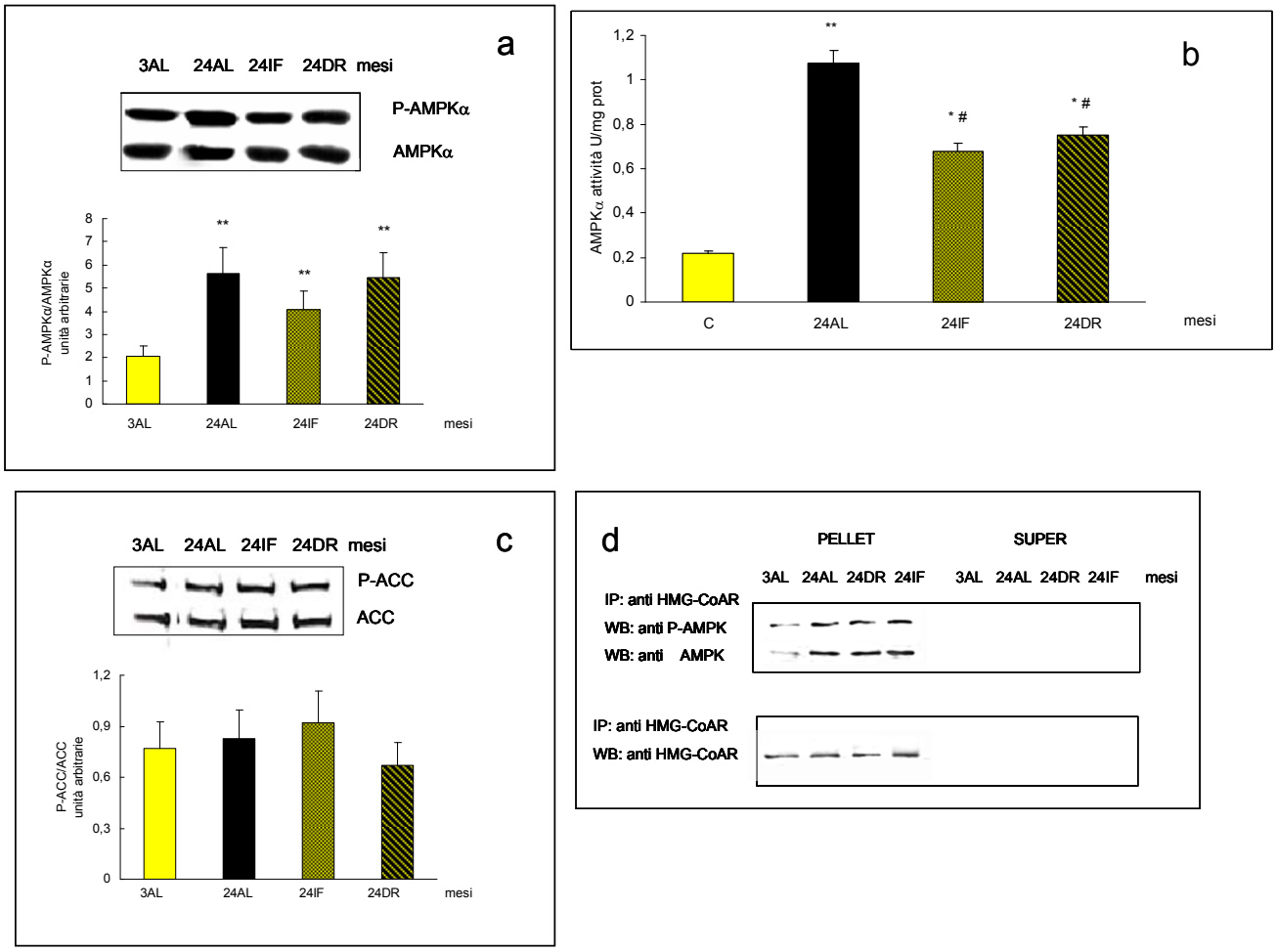


Figura 8 (a): Stato di fosforilazione dell'AMPKα (Thr172) valutato mediante Western blot. I valori densitometrici sono la media ± la deviazione standard dei Western Blot di quattro esperimenti. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). (b): Attività dell'AMPKα valutato mediante immunoprecipitazione e saggio radioisotopico, analizzando l'attività totale dell'enzima*=p<0.05, **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. (c): Stato di fosforilazione dell'ACC (Ser79) valutato mediante Western blot. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (d): Associazione dell'AMPKα con l'HMG-CoAR. L'HMG-CoAR è stata immunoprecipitata e sottoposta a Western Blot e analizzata per la presenza di anti-AMPKα.

I risultati riportati nella figura 8 mostrano che l'AMPKα risulta più fosforilata (a) ed attivata (b) negli animali AL che non negli animali CR ed in grado di fosforilare l'ACC (c). Si osserva, inoltre, l'associazione dell'AMPK con l'HMG-CoAR misurata mediante coimmunoprecipitazione (d), risulta essere maggiore negli animali AL, indicando che la ridotta fosforilazione della reduttasi nel fegato di ratti 24 mesi AL, analogamente al modello cellulare utilizzato non possa essere imputato né ad alterazione dell'attività della chinasi né ad una sua ridotta associazione con la reduttasi.

Lo studio del comportamento della subunità catalitica della PP2A, l'enzima responsabile della defosforilazione e della conseguente attivazione dell'HMG-CoAR è stato eseguito valutandone il livello proteico e l'associazione con la reduttasi .

Figura 9. Livelli della subunità catalitica della PP2A (a) e associazione con l'HMG-CoAR (b)

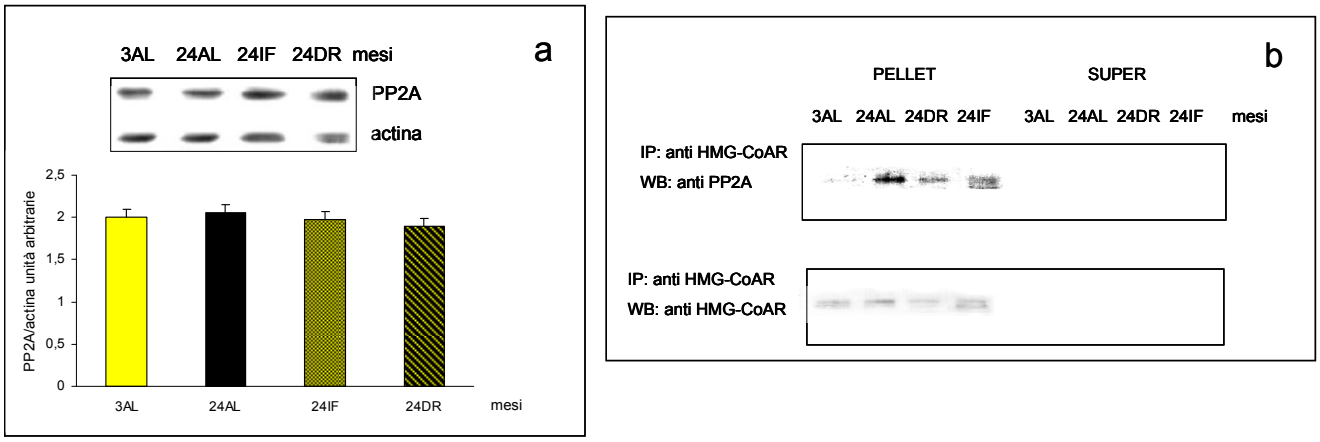


Figura 9 (a): I livelli della subunità catalitica della PP2A sono stati valutati mediante Western blot. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Associazione della subunità catalitica della PP2A con l'HMG-CoAR. L'HMG-CoAR è stata immunoprecipitata e sottoposta a Western Blot e analizzata per la presenza di anti-PP2A.

I risultati ottenuti mostrano che il livello della subunità catalitica della PP2A (a) non presenta alcuna variazione mentre rivelano una maggiore associazione con l'HMG-CoAR (b) negli animali di 24 mesi AL. Si osserva inoltre che il trattamento dei ratti sottoposti a restrizione calorica è in grado di prevenire, almeno parzialmente, tale associazione.

L'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR anche durante l'invecchiamento risulta essere dipendente dalla PP2A.

Ratti Sprague-Dawley di 24 mesi AL e OMEGA-3: riduzione dei livelli di ROS

Dosaggio di ROS e stato di attivazione dell'HMG-CoAR , associazione della PP2A con la reduttasi

Per valutare se il controllo o la riduzione dei livelli di ROS fosse in grado di prevenire l'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR *in vivo* ratti maschi di 24 mesi sono stati alimentati fin dallo svezzamento con una dieta arricchita di acidi grassi OMEGA-3, di cui è nota l'azione antiossidante.

Nel fegato di animali di 24 mesi AL e OMEGA-3 sono stati, quindi misurati i livelli di ROS e lo stato di attivazione e di fosforilazione dell'HMG-CoAR nonché la sua associazione con la subunità catalitica della PP2A.

Figura 10. Dosaggio dei ROS (a), stato di attivazione (b) e di fosforilazione dell'HMG-CoAR (c) e associazione della PP2A con l'HMG-CoAR (d)

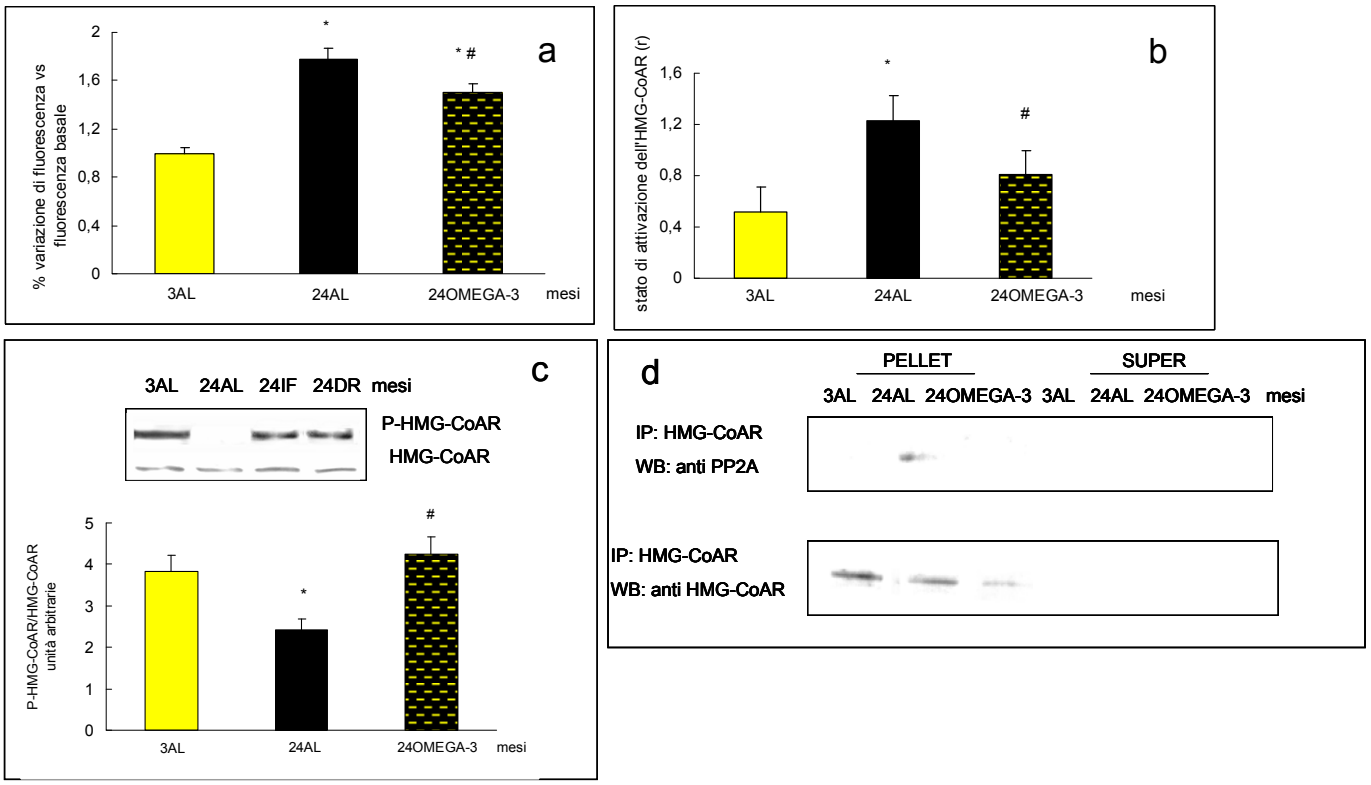


Figura 10 (a): Il dosaggio dei livelli di ROS è stato effettuato tramite una sonda, la diclorofluorescina (DCF), sia negli omogenati di fegato dei gruppi sperimentali e dei controlli. Dopo aver analizzato il livello basale, ai campioni è stato aggiunto, successivamente, solfato ferroso 10µM per mettere in evidenza le specie perossidate. I risultati sono espressi come percentuale di incremento della fluorescenza negli omogenati di fegato a cui è stato aggiunto solfato ferroso rispetto alla fluorescenza basale. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Stato di attivazione dell'HMG-CoAR valuato mediante saggio radio isotopico. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (c): Stato di fosforilazione dell'HMG-CoAR (Ser871) valutato mediante Western blot. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. (d): Associazione della subunità catalitica della PP2A con l'HMG-CoAR. L'HMG-CoAR è stata immunoprecipitata e sottoposta a Western Blot e analizzata per la presenza di anti-PP2A.

I risultati mostrano che la dieta arricchita con acidi grassi OMEGA-3 è in grado di ridurre le variazioni età-dipendenti di ROS (a), l'aumentato stato di attivazione (b) e di defosforilazione (c) dell'HMG-CoAR nonché la sua associazione con la PP2A (d).

Coinvolgimento della via di segnale p38/MAPK nell'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR in animali di 24 mesi AL, CR e OMEGA-3

Per verificare se il processo p38 dipendente in grado di indurre l'attivazione della reduttasi, avesse luogo anche durante l'invecchiamento e dipendesse dall'aumentata produzione di ROS, è stato analizzato lo stato di fosforilazione della p38 in animali vecchi alimentati AL o mantenuti fin dallo svezzamento a diete anti-invecchiamento CR o a diete arricchite di composti anti-ossidanti OMEGA-3.

Figura 11. Fosforilazione della p38 nel fegato di ratti di 24 mesi AL, CR e OMEGA-3

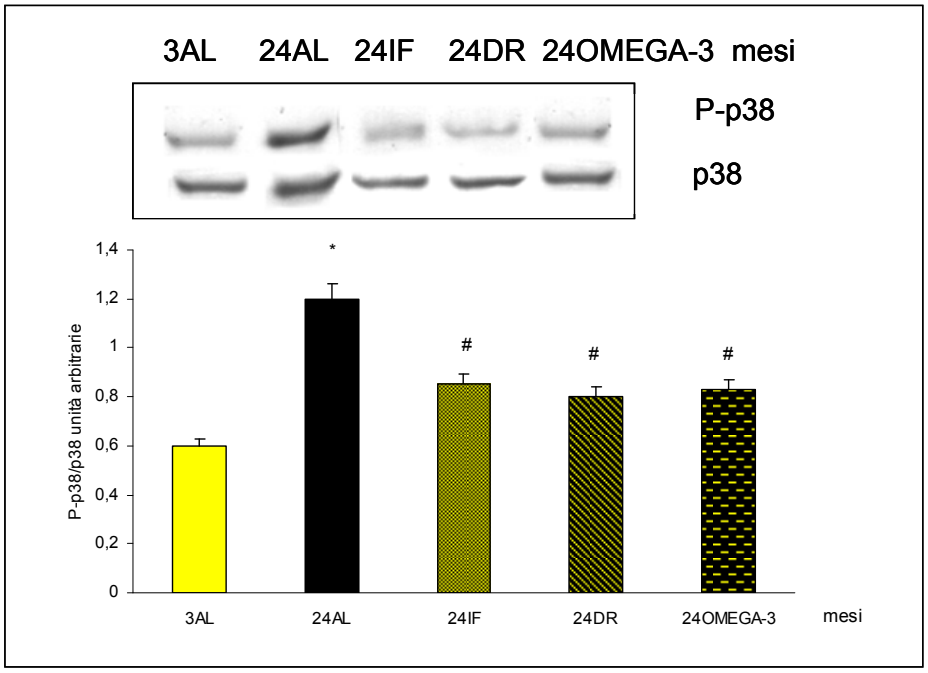


Figura 11: Stato di fosforilazione di p38 (Thr180/Tyr182) nel fegato di ratti di 24 mesi AL, CR e OMEGA-3 valutato mediante Western blot. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

I risultati mostrano che la diete utilizzate sono in grado di prevenire l'attivazione per fosforilazione della p38, così confermando che la presenza di alti livelli di ROS induce un'attivazione della p38, che a sua volta è in grado di dirigere l'associazione della PP2A con la reduttasi, promuovendone la defosforilazione e la conseguente attivazione.

Effetto delle diete CR e OMEGA-3 sui livelli plasmatici di colesterolo totale, HDL e LDL in animali di 24 mesi

Per valutare se il controllo dello stato di attivazione dell'HMG-CoAR operato dalla dieta arricchita in OMEGA-3 o diete CR, determinasse il controllo dei livelli plasmatici di colesterolo, è stato valutato il quadro colesterolemico negli animali AL, CR e OMEGA-3 (livelli plasmatici di colesterolo totale, colesterolo HDL e colesterolo LDL), come mostrato nella figura 12.

Figura 12. Livelli plasmatici di colesterolo totale, HDL e LDL nel plasma di ratti di 24 mesi AL, CR e OMEGA-3

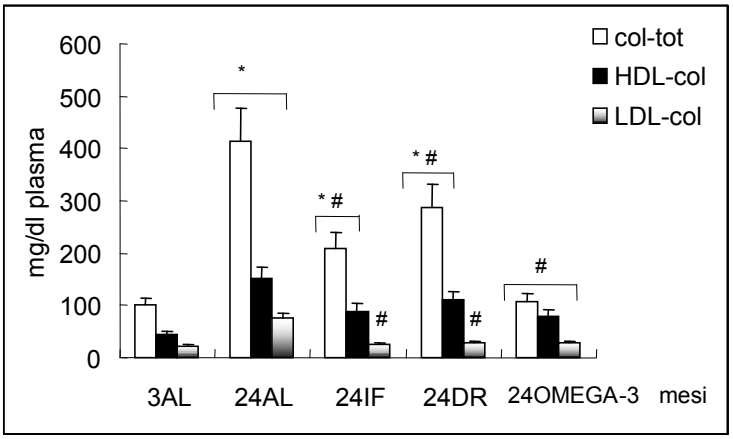


Figura 12: Dosaggio dei livelli plasmatici di colesterolo totale, colesterolo HDL e colesterolo LDL. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

I risultati mostrano che gli animali CR, come già dimostrato in precedenti lavori, hanno un livello di colesterolo totale più basso rispetto agli animali AL ma non completamente sovrapponibile a quello degli animali giovani. D'altra parte, il trattamento con la dieta OMEGA-3 è in grado di prevenire le modificazioni età-correlate della colesterolemia, rendendo tale parametro totalmente assimilabile a quello dell'animale giovane (3AL). Sia il livello di colesterolo totale, che quello del colesterolo LDL e HDL risulta essere significativamente ridotto in tutti i modelli sperimentali CR e OMEGA-3.

B-*REGOLAZIONE A LUNGO TERMINE DELL'ATTIVITA' DELL'HMG-CoAR*

Ratti Sprague-Dawley di 24 mesi AL, CR e OMEGA-3

Livelli di mRNA dell'HMG-CoAR

Per comprendere il meccanismo alla base della modificazione nella velocità di degradazione dell'HMG-CoAR durante l'invecchiamento non accompagnata da variazioni dei suoi livelli proteici, è stato preso in esame la produzione dell'enzima valutando il livello dell'mRNA dell'HMG-CoAR mediante real-time PCR.

Figura 13. Livello di mRNA dell'HMG-CoAR epatico

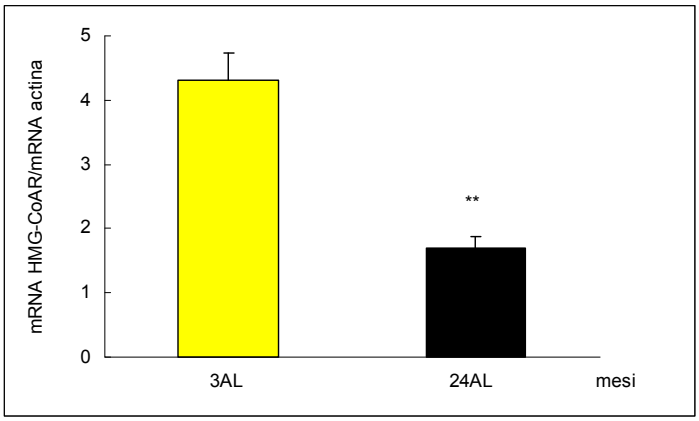


Figura 13: Livelli di mRNA epatico valutato mediante real-time PCR. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti

I risultati ottenuti mostrano come negli animali di 24 mesi AL si abbia una riduzione dei livelli di mRNA, che può spiegare il non modificato livello proteico nonostante la ridotta velocità di degradazione.

Livelli di Insig e fosforilazione dell'IRS 1/2

Per valutare il meccanismi alla base della modificata velocità di degradazione e regolazione trascrizionale dell'HMG-CoAR negli animali di 24 mesi AL, sono stati valutati i livelli delle proteine responsabili della regolazione a lungo termine dell'enzima: Insig e SREBP.

L'analisi di Insig, che è noto essere regolata da insulina, è stata effettuata prendendo in esame le due isoforme Insig1 e Insig2 ed è stata accompagnata dall'analisi dello stato di fosforilazione dell'IRS1/2 (da Insulin Receptor Substrate), che rappresenta un segnale dell'attivazione del recettore dell'insulina.

Figura 14. Livelli proteici di Insig1 (a) e Insig2 (b) e fosforilazione dell'IRS 1/2 (c)

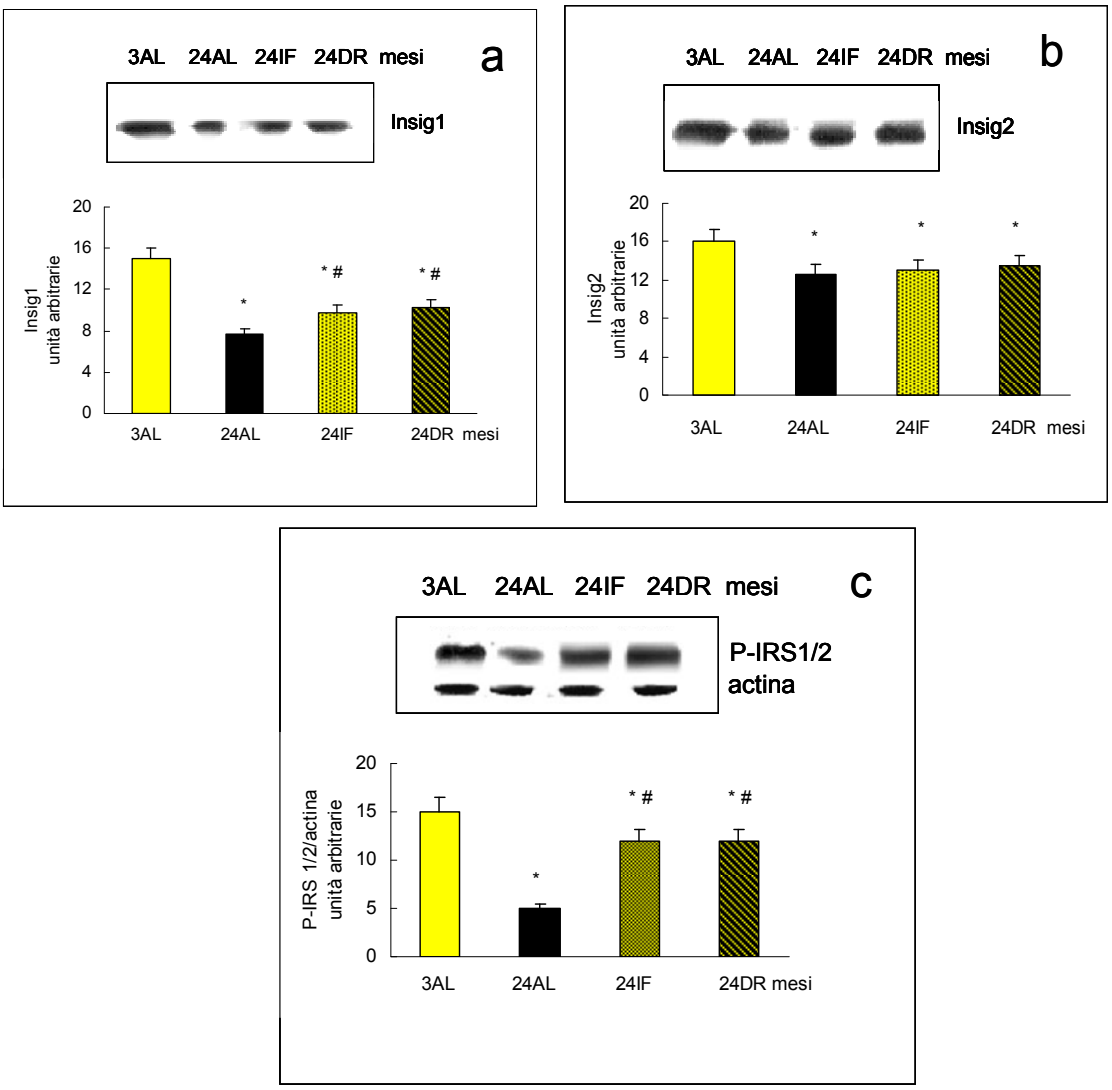


Figura 14 (a): Livelli proteici di Insig1 misurati mediante analisi di Western Blot su microsomi di fegato di ratti di 24 mesi alimentati AL o sottoposti a restrizione calorica (IF e DR). *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Livelli proteici di Insig2 misurati mediante analisi di Western Blot su microsomi di fegato di ratti di 24 mesi alimentati AL o sottoposti a restrizione calorica (IF e DR). *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (c): Stato di fosforilazione di IRS 1/2 (Tyr612) misurato mediante analisi di Western Blot su lisato totale di fegato di ratti di 24 mesi alimentati AL o sottoposti a restrizione calorica (IF e DR). *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

I risultati mostrano una riduzione dei livelli di Insig1, che è solo parzialmente prevenuto dalla CR (a); anche, per quanto riguarda Insig2, si osserva una riduzione anche se meno consistente e la CR non mostra nessuna azione preventiva (b). Si osserva, inoltre, una forte riduzione della fosforilazione dell'IRS (c) nel fegato dei ratti di 24 mesi AL, in accordo con la

ridotta sensibilità all'insulina riscontrata durante l'invecchiamento (Fulop et al., 2003; Moller et al., 2003; Masoro, 2005). La CR è in grado di prevenire solo parzialmente tale riduzione.

Poiché Insig1 e Insig2 regolano la trascrizione dell'HMG-CoAR, modulando il processamento di SREBP e quindi il rilascio della forma matura nSREBP trascrizionalmente attiva, sono stati analizzati i livelli proteici di tali fattori di trascrizione.

Figura 15. Livelli proteici di SREBP1 (a) e SREBP2 (b)

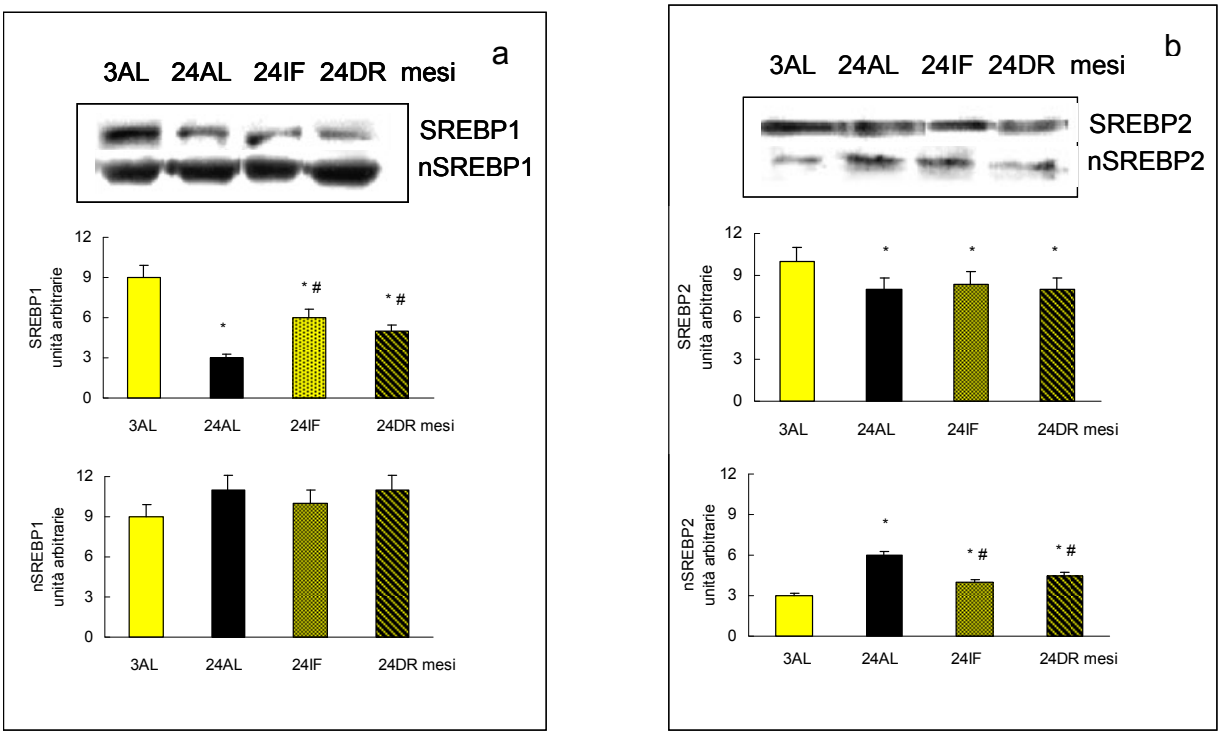


Figura 15 (a):Livelli di nSREBP1 e SREBP1 misurati rispettivamente sui nuclei e microsomi di fegato di ratto mediante Western blot, di cui è riportato un Western blot tipo con la relativa analisi densitometrica. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Livelli di nSREBP2 e SREBP2 misurati rispettivamente sui nuclei e microsomi di fegato di ratto mediante Western blot. È riportato un Western blot tipo con la relativa analisi densitometrica. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti

I risultati riportati in figura 15 mostrano un aumento nei livelli proteici di nSREBP2 (b), nessun cambiamento significativo nei livelli di nSREBP1 (a) e una riduzione nei livelli di SREBP2 e 1 nei ratti di 24 mesi AL. Ancora una volta, la CR non è in grado di prevenire completamente le modificazioni osservabili durante l'invecchiamento.

L'aumento nei livelli di nSREBP2, in accordo con la riduzione dei livelli di Insig, suggerirebbe una stimolazione della trascrizione dei suoi geni *target*, ma non avendo rilevato alcun aumento dell'espressione dell'mRNA dell'HMG-CoAR, si è voluto analizzarne l'effetto su altri geni *target*. Tra tutti i geni *target* di SREBP, risultano particolarmente interessanti sia l'LDLr (da Low Density Lipoprotein receptor), per il suo coinvolgimento nel metabolismo del colesterolo (Horton et al., 2002), che la Caveolina1, correlata con l'esposizione del LDLr sulla membrana (Ness et al., 2003). A tale scopo è stato preso in esame il livello di mRNA mediante real-time PCR, l'espressione totale del LDLr e sulla membrana la presenza del LDLr e della Caveolina1 in animali AL e CR. Inoltre sui livelli totale e di membrana del LDLr, è stato analizzato l'effetto della dieta OMEGA-3.

Figura 16. Livelli di mRNA (a) e proteici del LDLr (b,c) e livelli proteici di Caveolina1 (d)

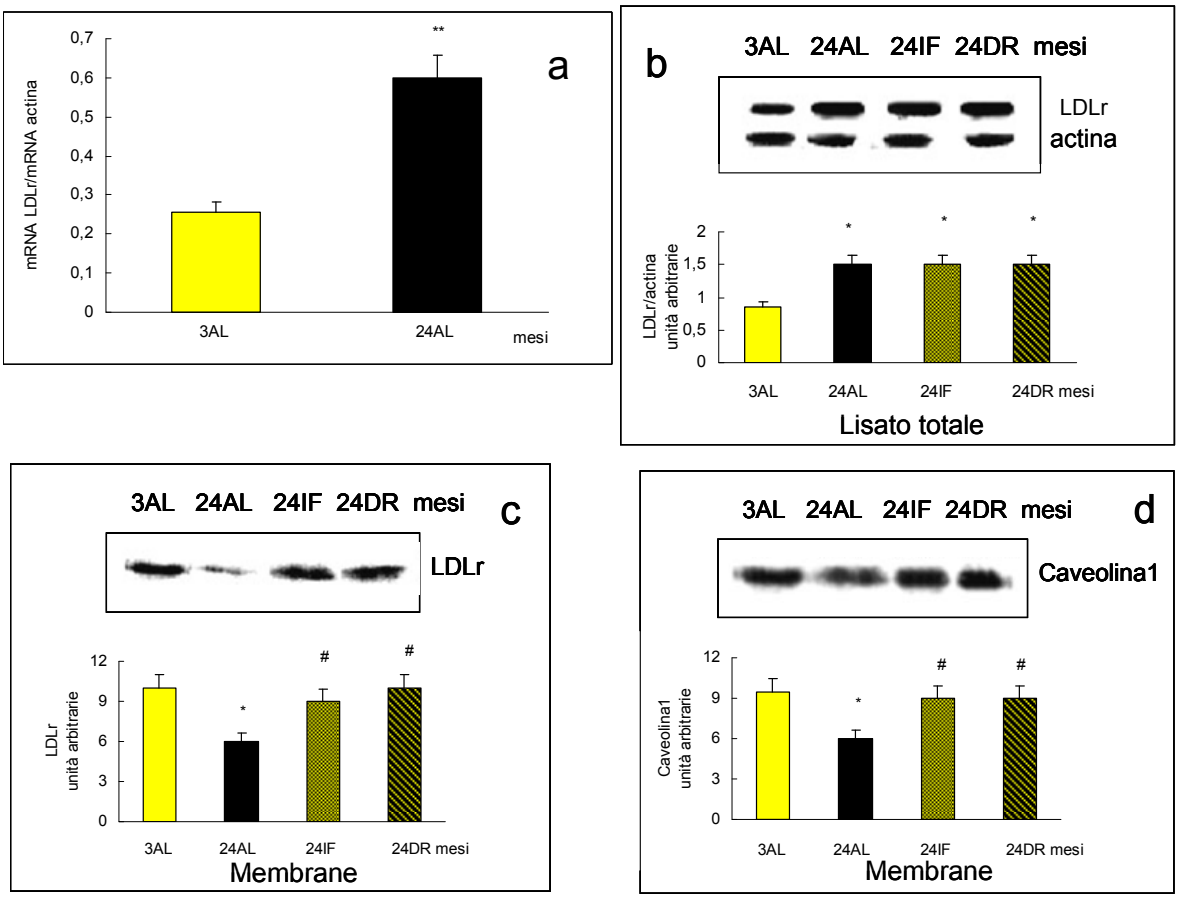


Figura 16 (a): Livelli di mRNA epatico del LDLr misurato mediante real-time PCR. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti (b): Livelli proteici di LDLr misurati mediante analisi di Western Blot su lisato totale di fegato di ratti di 24 mesi alimentati AL o sottoposti a restrizione calorica (IF e DR). *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti (c): Livelli proteici di LDLr misurati mediante analisi di Western Blot su membrane totali di fegato di ratti di 24 mesi alimentati AL o sottoposti a restrizione calorica (IF e DR). *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (d): Livelli proteici di Caveolina1 valutati su mediante analisi di Western Blot su membrane totali di fegato di ratti di 24 mesi alimentati AL o sottoposti a restrizione calorica (IF e DR). *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

Figura 17. Livelli proteici del LDLr nel fegato di ratti di 24 mesi AL e OMEGA-3

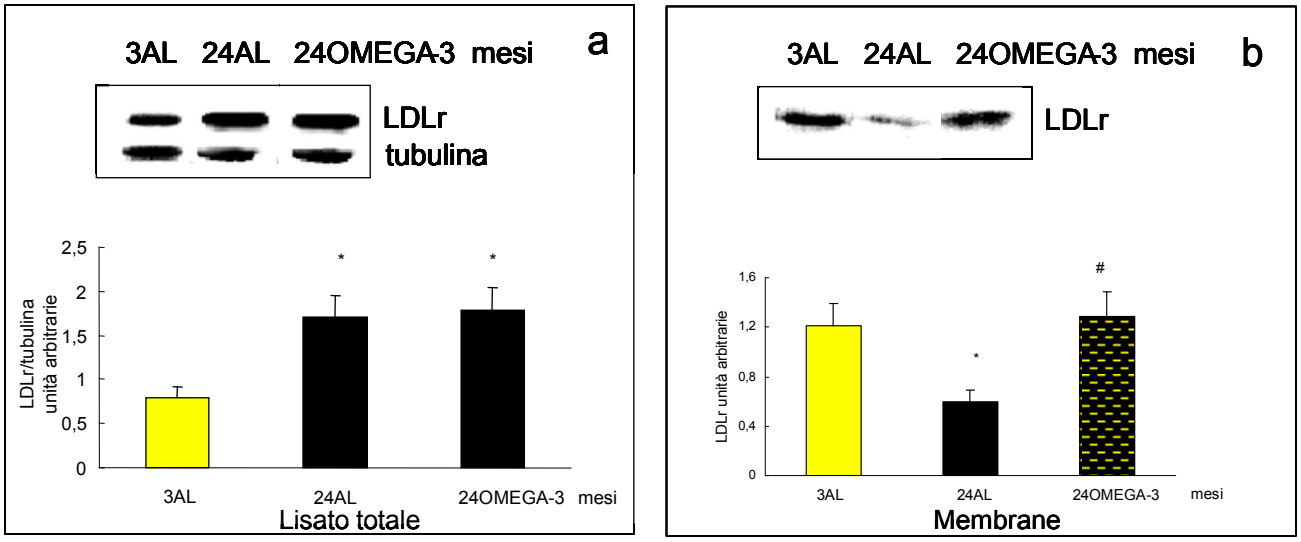


Figura 17 (a): Livelli proteici di LDLr misurati mediante analisi di Western Blot su lisato totale di fegato di ratti di 24 mesi alimentati AL o sottoposti dieta OMEGA-3. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Livelli proteici di LDLr valutati su mediante analisi di Western Blot su membrane totali di fegato di ratti di 24 mesi alimentati AL o sottoposti a dieta OMEGA-3. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3AL). #=p< 0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto all'animale di 24 mesi AL. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

I risultati mostrano, in accordo con l'aumento dei livelli di nSREBP2, un aumento della sintesi del LDLr negli animali di 24 mesi AL, come dimostrato dall'aumentato livello di mRNA (Fig.16a) e di proteina (Fig16b); viceversa l'esposizione del LDLr sulla membrana (Fig.16c) risulta essere notevolmente ridotta e tale diminuzione si accompagna ad una ridotta presenza di Caveolina1 (Fig.16d).

La diminuzione di LDLr sulla membrana, insieme all'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR fornisce un'esauriente spiegazione degli aumentati livelli di colesterolo osservabile nel plasma di questi animali.

La CR e gli OMEGA-3 prevengono totalmente la forte riduzione dei livelli del LDLr membranari età-dipendenti (Fig.16c-Fig.17b), contribuendo in tal modo al controllo dei livelli di colesterolo plasmatici.

C-*IPOSSIA E REGOLAZIONE DELL'HMG-CoAR*

Lo studio degli effetti della ridotta disponibilità di O_2 sulla regolazione dell'HMG-CoAR è stato eseguito utilizzando due modelli sperimentali: cellule HepG2 sottoposte a una ipossia ambientale e cellule HepG2 trattate con $CoCl_2$, induttore di un'ipossia chimica. Nel primo modello sono stati analizzati i livelli di HIF-1α e di HMG-CoAR mentre nel secondo, caratterizzato da livelli di HIF-1α controllabili, sono stati valutati l'induzione di HIF-1α, i livelli proteici, la trascrizione e la velocità di degradazione di HMG-CoAR.

Effetto dell'ipossia ambientale (2% di O_2)

Mediante l'uso di camerette ipossiche, le cellule HepG2 sono state incubate in condizioni di ridotta concentrazione di ossigeno (2% di O_2) per 24 ore, in presenza o in assenza dell'inibitore dell'HIF-1, YC-1. Mediante la tecnica del Western blot, è stato misurato il livello proteico di HIF-1α e di HMG-CoAR nel lisato totale delle cellule.

Figura 18: Effetto dell'ipossia (2% O_2) sui livelli di HIF-1α (a) e di HMG-CoAR (b) nel lisato totale di cellule HepG2

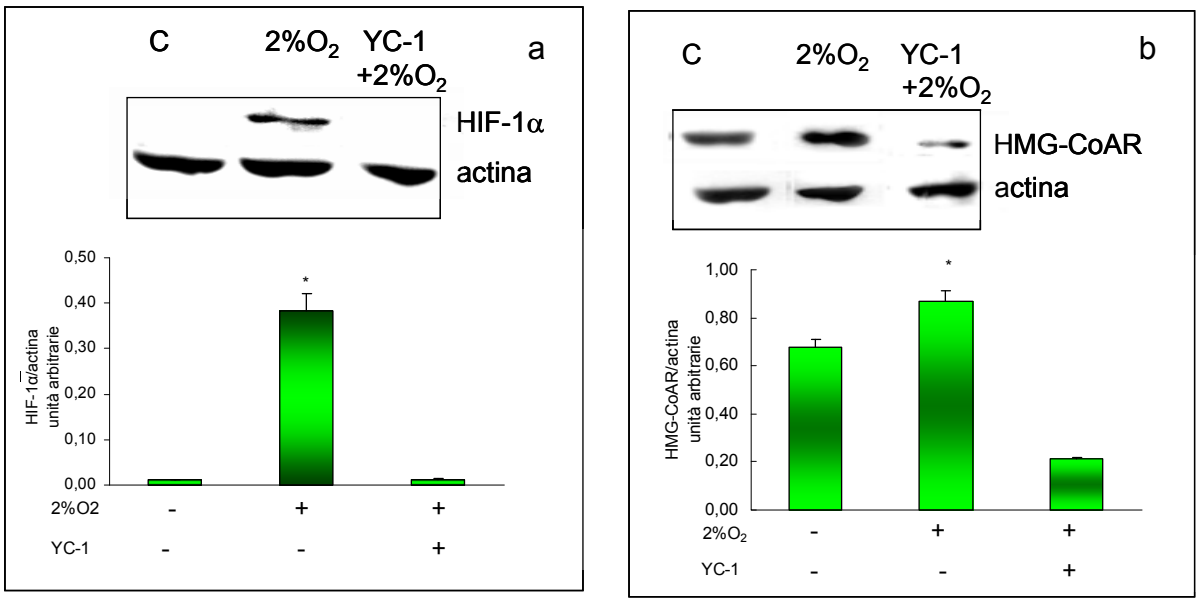


Figura 18 (a): Livelli proteici di HIF-1α misurati mediante Western Blot sul lisato totale di cellule HepG2 incubate al 2% di O_2 per 24 ore in presenza ed in assenza del suo inibtore specifico, YC-1. *=$p<0.05$ valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (2%O_2-;YC-1-). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): Livelli proteici di HMG-CoAR valutati mediante Western Blot sul lisato totale di cellule HepG2 incubate al 2% di O_2 per 24 ore in presenza ed in assenza del suo inibtore specifico, YC-1. *=$p<0.05$ valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (2%O_2-;YC-1-). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

Lo stato ipossico induce un forte aumento dello HIF-1α (a) ed un aumento significativo dei livelli dell'enzima HMG-CoAR (b); tali incrementi, invece, risultano non rilevabili in presenza dell'inibitore dell'HIF-1, suggerendo una correlazione tra ipossia, induzione di HIF-1α e HMG-CoAR.

Effetto dell'ipossia chimica ($CoCl_2$)

Visto l'effetto sulla reduttasi di un ambiente a ridotta concentrazione di ossigeno, il meccanismo alla base delle modificazioni osservate è stato analizzato utilizzando un sistema cellulare sottoposto ad ipossia chimica controllabile.

Innanzitutto è stato caratterizzato il sistema valutando il *time-course* dell'induzione dell'HIF-1α, la sua traslocazione nel nucleo, e l'induzione dell'HMG-CoAR nelle cellule HepG2, stimolandole per diversi tempi con una concentrazione di $CoCl_2$ pari a 100 μM. E' stata, inoltre, misurata in cellule trattate per 2 e 20 ore, l'attività della reduttasi con il metodo radio-isotopico.

Figura 19: Induzione dell'HIF-1α da $CoCl_2$ nel lisato totale (a) e negli estratti nucleari (b) di cellule HepG2 ed effetto del $CoCl_2$ sui livelli (c) ed attività di HMG-CoAR (d) nel lisato totale

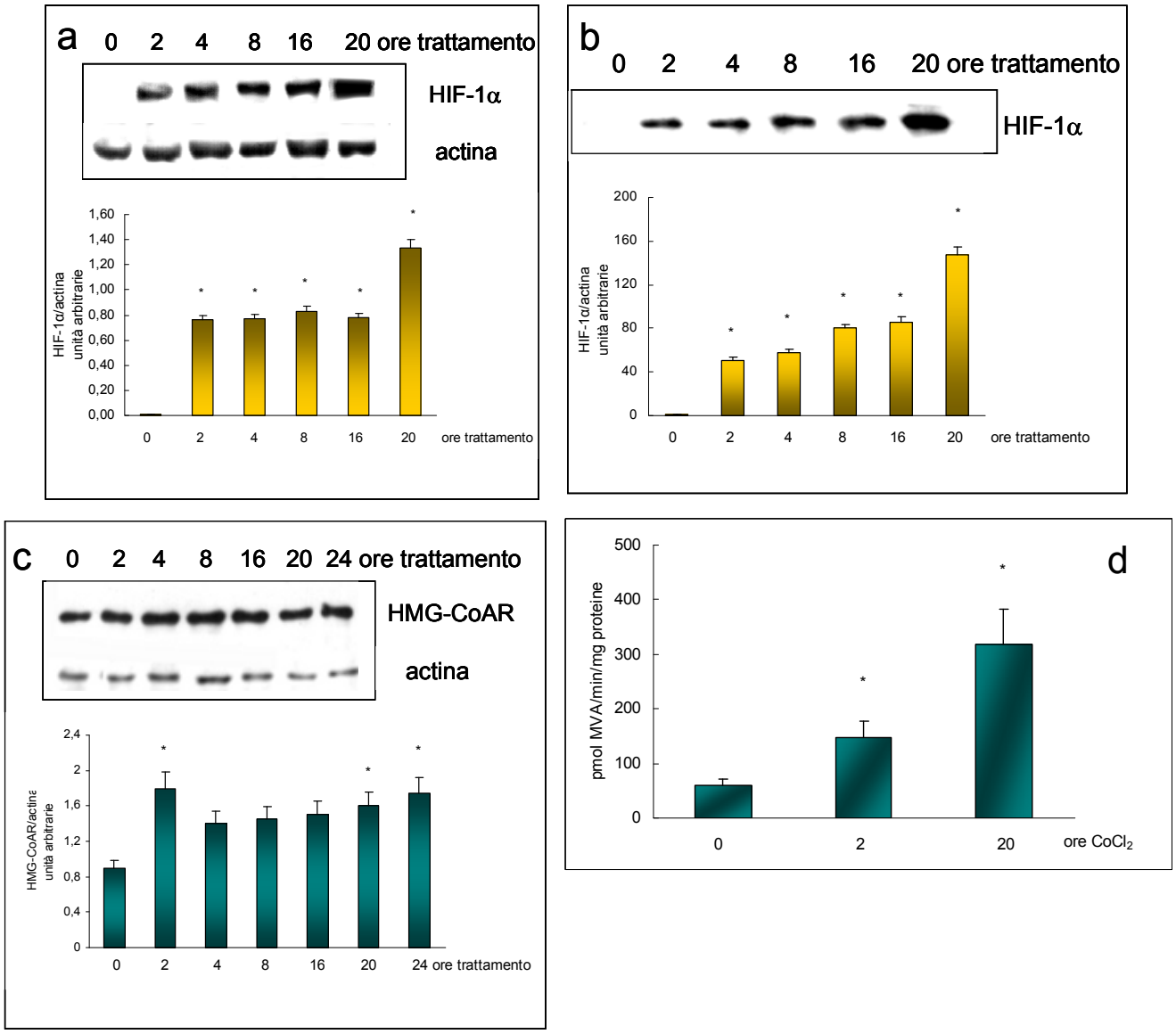


Figura 19 (a): *Time-course* (da 0 a 20 ore di stimolazione con 100μM $CoCl_2$) dell'induzione dell' HIF-1α misurato mediante Western Blot sul lisato totale.*=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (0 ore). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): Induzione di HIF-1α da $CoCl_2$ (100μM) in estratti nucleari di cellule HepG2 misurato mediante Western Blot *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (0 ore). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (c): *Time-course* (da 0 a 24 ore di stimolazione con 100μM $CoCl_2$) di HMG-CoAR nel lisato totale di cellule HepG2 misurato mediante Western Blot. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (0 ore). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (d): Attività di HMG-CoAR in cellule HepG2 trattate con 100 μM $CoCl_2$ per 2 e 20 ore. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (0 ore). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

I risultati mostrano (Fig.19) che già a 2 ore dal trattamento con $CoCl_2$ si osserva un aumento di HIF-1α, sia totale (a) che nucleare (b) rispetto al controllo non trattato, e che tale incremento

continua fino a 20 ore. La stimolazione con $CoCl_2$ induce, anche, un significativo aumento del contenuto proteico (c) e dell'attività (d) dell'HMG-CoAR, che è stato controllato non essere riferibile ad un effetto diretto del $CoCl_2$ sulle membrane (dati non mostrati).

Per verificare se ci fosse una relazione tra l'aumento dell'HMG-CoAR e l'aumento di HIF-1 sono stati eseguiti esperimenti in presenza di YC-1, inibitore degli effetti dell'HIF-1 (Chun et al., 2001): tale molecola è in grado di bloccare l'accumulo dei livelli proteici di HIF-1α, mantenendone invariati i livelli di mRNA. Pertanto, in cellule HepG2 in presenza ed in assenza di YC-1, è stato valutato l'incremento dei livelli di HMG-CoAR e di HIF-1α indotto dalla stimolazione con $CoCl_2$.

Figura 20: Effetto di YC-1 su HIF-1α (a) e sui livelli di HMG-CoAR (b) nel lisato totale di cellule HepG2

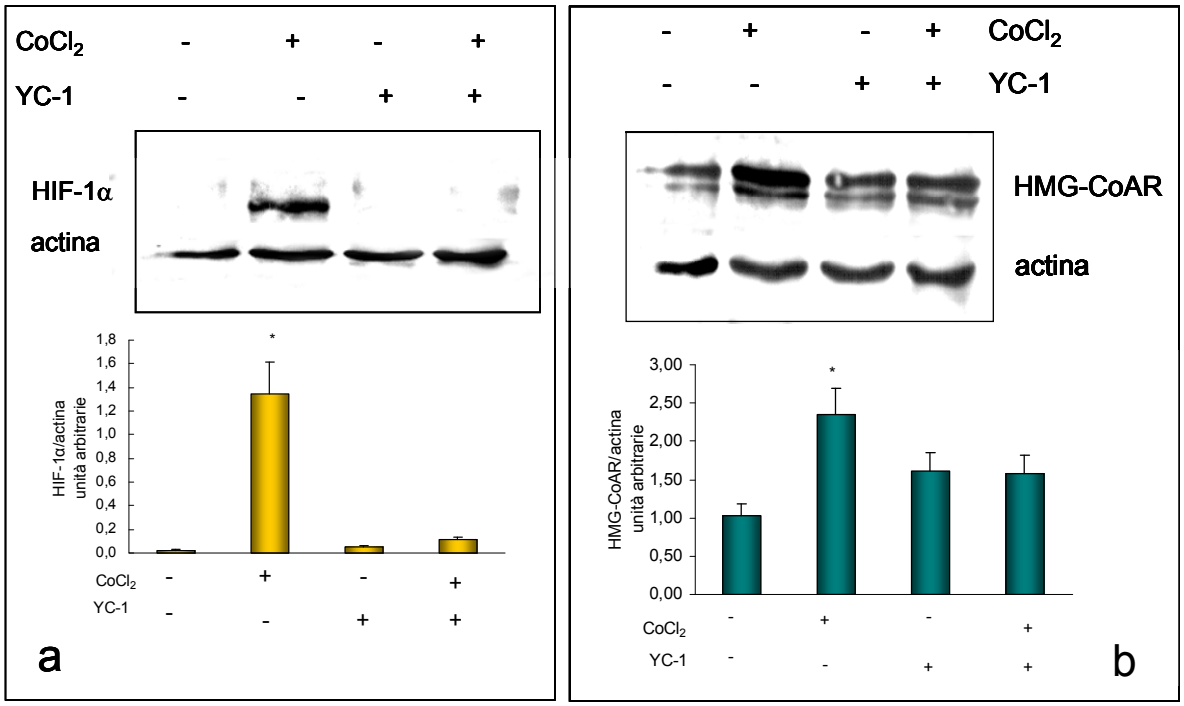


Figura 20 (a): Le cellule sono state stimolate per 20 ore con $CoCl_2$ (100 μM) con e senza 10 μM YC-1 e analizzati i livelli di HIF-1α mediante Western Blot. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo ($CoCl_2$-; YC-1-). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): Le cellule sono state stimolate per 20 ore con $CoCl_2$ (100 μM) con e senza 10 μM YC-1 e analizzati i livelli di HMG-CoAR mediante Western Blot. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo($CoCl_2$-; YC-1-). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

Come si evince dalla figura 20, la stimolazione con $CoCl_2$ causa un aumento del livello proteico di HIF-1 (a) e di HMG-CoAR (b) rispetto al controllo non trattato. La sola somministrazione di YC-1 o il trattamento contemporaneo con entrambi i composti impedisce l'aumento di HIF-1 e dell'HMG-CoAR, il cui livello risulta essere confrontabile con il controllo

non trattato. Tali risultati indicano un coinvolgimento di HIF-1 nella regolazione trascrizionale della reduttasi.

Degradazione di HMG-CoAR

Per verificare se l'effetto dell'ipossia chimica sul livello proteico dell'HMG-CoAR potesse dipendere dall'alterata velocità di degradazione dell'enzima, è stato eseguito un saggio di degradazione *in vitro* su cellule HepG2 stimolate per 20 ore con $CoCl_2$ (100 μM).

Figura 21: Degradazione *in vitro* di HMG-CoAR

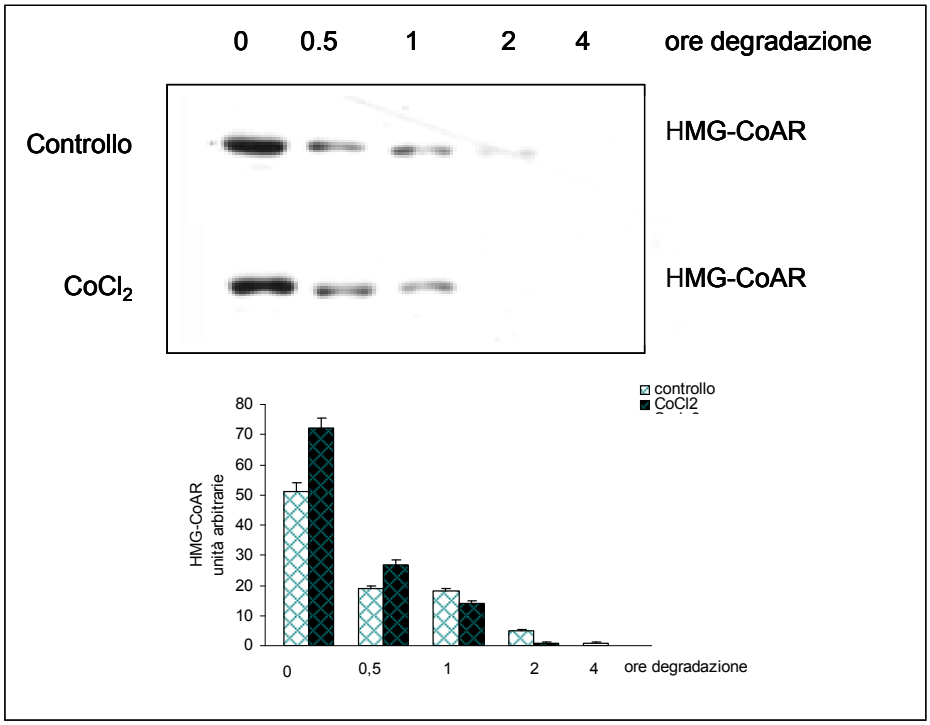


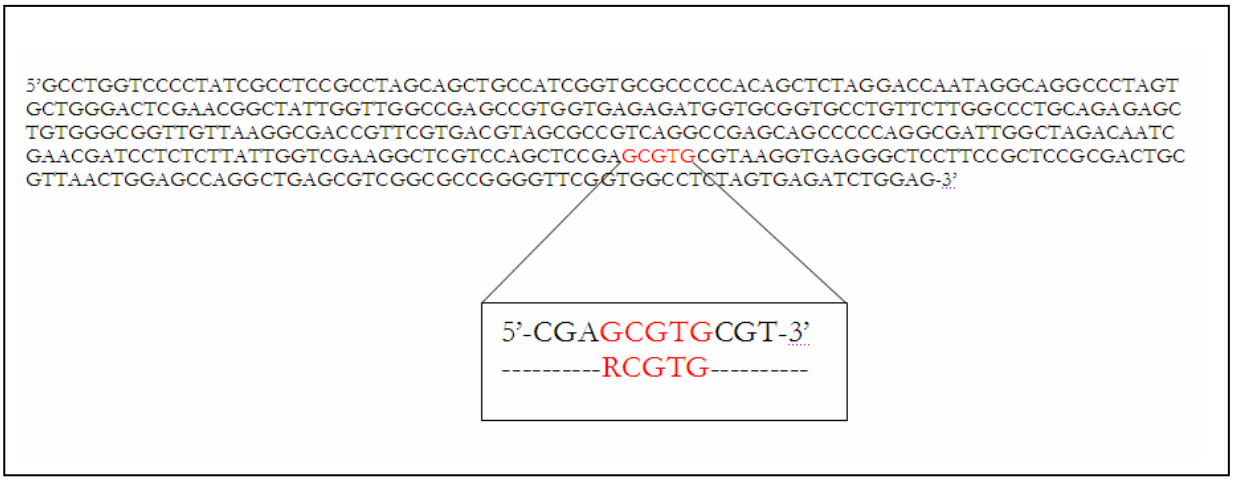
Figura 21: Le cellule stimolate con 100μM di $CoCl_2$ sono state lisate ed incubate a 37°C. A diversi tempi è stata interrotta la reazione di degradazione e sono stati quindi analizzati i livelli di HMG-CoAR mediante Western Blot. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

L'andamento della degradazione della reduttasi nelle cellule trattate risulta simile (se non addirittura accelerato) rispetto a quello delle cellule non trattate: infatti, la presenza della proteina HMG-CoAR è ancora visibile nel controllo dopo 2 ore, mentre è completamente assente nelle cellule trattate.

Trascrizione di HMG-CoAR e sua regolazione

Per controllare se il gene codificante HMG-CoAR potesse essere considerato un bersaglio di HIF-1, è stata verificata la presenza della sequenza a cui si lega HIF-1 ossia HRE (da Hypoxia Responsive Element) (5'-RCGTG-3'), nella regione promotrice del gene umano di HMG-CoAR. Pertanto, mediante il programma informatico ClustalW è stato effettuato l'allineamento tra HRE e la regione promotrice della reduttasi.

Figura 22: Allineamento della sequenza promotrice del gene codificante HMG-CoAR con la sequenza HRE



Come si osserva dall'allineamento riportato nella figura 22, è possibile rilevare la presenza di una sequenza HRE all'interno del promotore della reduttasi.

Per verificare se l'ipossia chimica avesse un effetto, mediato da HIF-1, sull'attività del promotore, le cellule HepG2 sono state trasfettate con il gene reporter pHMG-CoAR-luciferasi e successivamente trattate per diversi tempi (16 e 20 ore) con $CoCl_2$ (100 µM) in presenza ed in assenza di YC-1 10 µM. L'effetto sulla trascrizione è stato misurato in funzione dell'attività della luciferasi, ossia mediante la luminescenza registrata (RLU, relative luminescence units). La figura 23 riporta l'incremento percentuale della trascrizione in seguito al trattamento.

Figura 23: Effetto dell'ipossia chimica sull'attività del promotore del gene umano di HMG-CoAR.

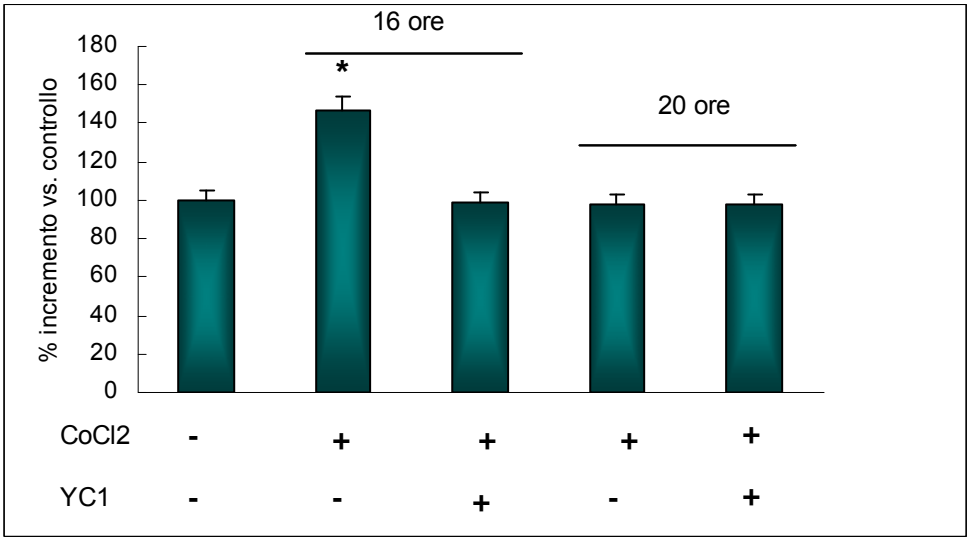


Figura 23: Le cellule HepG2 sono state trasfettate con il gene reporter pHMG-CoAR-luciferasi e successivamente trattate per diversi tempi (16 e 20 ore) con $CoCl_2$ (100 μM) in presenza ed in assenza di 10 μM di YC-1. L'effetto sulla trascrizione è stato misurato in funzione dell'attività della luciferasi, ossia mediante la luminescenza registrata (RLU, relative luminescence units). La figura riporta l'incremento percentuale della trascrizione in seguito al trattamento.*=$p<0.05$ valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo ($CoCl_2$-;YC-1-). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

La figura 23 mostra a 16 ore dal trattamento con $CoCl_2$ un incremento significativo della trascrizione rispetto al controllo non trattato; l'assenza di tale aumento in presenza di YC-1, conferma trattarsi di un effetto di HIF-1α.

Per valutare se l'effetto di HIF-1α sulla trascrizione di HMG-CoAR fosse mediato da alcuni dei fattori coinvolti nella regolazione trascrizionale dell'enzima, sono stati valutati i livelli proteici di nSREBP2 e di SCAP.

Figura 24: Effetto del $CoCl_2$ (100 μM) sui livelli di nSREBP2 (a) e SCAP (b) nel lisato totale di HepG2

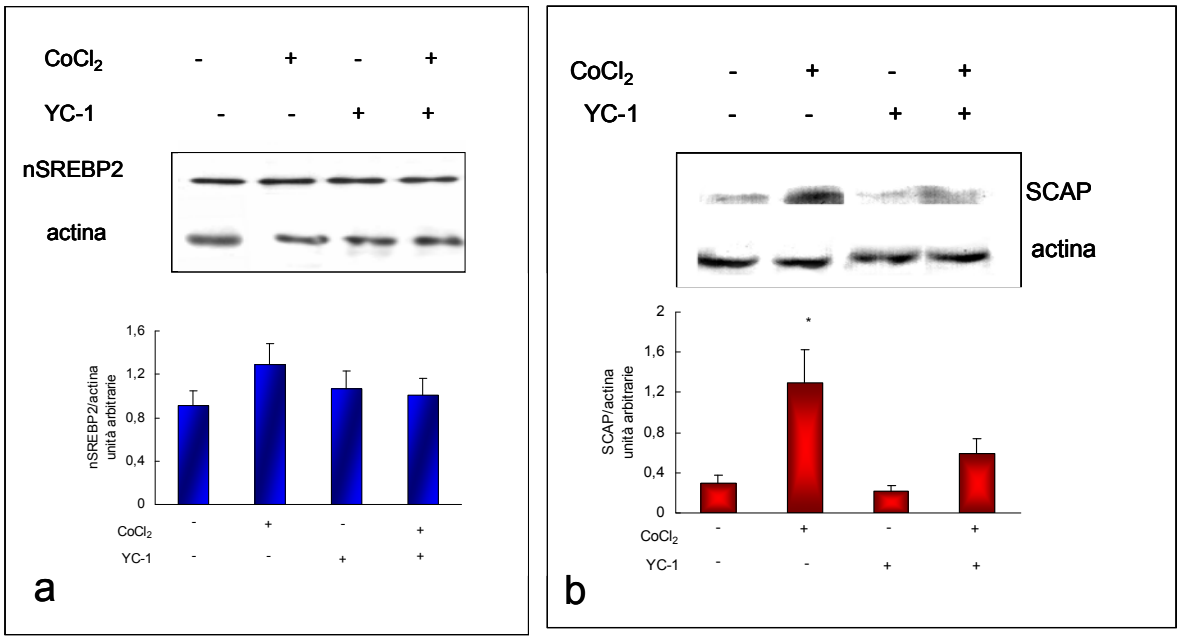


Figura 24 (a) Le cellule sono state stimolate per 20 ore con $CoCl_2$ (100 μM) con e senza 10 μM YC-1 e analizzati i livelli di nSREBP2 mediante Western Blot. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo ($CoCl_2$-;YC-1-). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): Le cellule sono state stimolate per 20 ore con $CoCl_2$ (100 μM) con e senza 10 μM YC-1 e analizzati i livelli di SCAP mediante Western Blot. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo ($CoCl_2$-;YC-1-). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

I risultati mostrano che le cellule trattate con $CoCl_2$ presentano livelli invariati di nSREBP2 e un aumento del contenuto proteico di SCAP che non si osserva nelle cellule trattate con YC-1. Questo suggerisce un effetto dell'ipossia chimica sui livelli di SCAP mediato da HIF-1.

SEZIONE II: HMG-CoAR E SVILUPPO

Livelli dell'HMG-CoAR

E' stato riportato che l'attività dell'HMG-CoAR nel fegato subisce notevoli variazioni durante lo sviluppo pre- e post-natale (McNamara et al., 1972; Leoni et al., 1984; Leoni et al., 1985 b) ma non è noto se alle variazioni di attività riportate corrispondano variazioni nel livello proteico dell'enzima e del complesso dei fattori deputati alla sua regolazione. Pertanto, inizialmente è stato misurato mediante Western Blot il livello proteico dell'HMG-CoAR su membrane totali preparate da fegato di ratti a differenti stadi di sviluppo.

Figura 25. Livelli proteici dell'HMG-CoAR nel fegato di ratti al 21° giorno di vita fetale, a 1, 8, 15 giorni e 3 mesi di vita post-natale

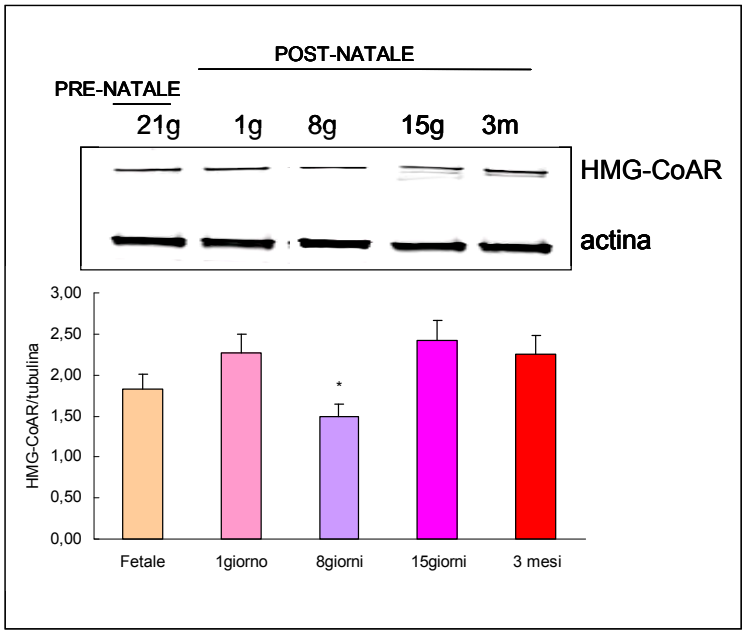


Figura 25: Livello proteico di HMG-CoAR misurato mediante analisi di Western Blot su membrane totali preparate da fegato di ratti al 21° giorno di vita fetale, a 1, 8, 15 giorni e 3 mesi di vita postnatale. In figura è riportato un Western blot tipo con la relativa analisi densitometrica. *=p< 0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3mesi). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

I risultati mostrano, in analogia con l'andamento dell'attività già riportato, alti livelli proteici di HMG-CoAR nella vita perinatale, ossia negli stati tardivi di gestazione e nel primo giorno di vita postnatale, un significativo decremento a 8 giorni di vita postnatale e un aumento successivo fino a raggiungere i livelli dell'adulto.

Livelli di Insig e fosforilazione dell'IRS 1/2

Per valutare se le variazioni dei livelli della reduttasi fossero correlate a variazioni dei livelli di Insig, che rappresenta il modulatore primario della regolazione a lungo termine dell'HMG-CoAR e la cui induzione è insulina-dipendente, in membrane totali preparate da fegato di ratti ai differenti stadi di sviluppo sono stati dosati i livelli di Insig1 e Insig2 e, nel lisato totale la fosforilazione dell'IRS1/2, che rappresenta un segnale della risposta all'insulina.

Figura 26: Livelli proteici di Insig1 e Insig2 (a) e fosforilazione dell'IRS 1/2 (b) nel fegato di ratti al 21° giorno di vita fetale, a 1, 8, 15 giorni e 3 mesi di vita post-natale

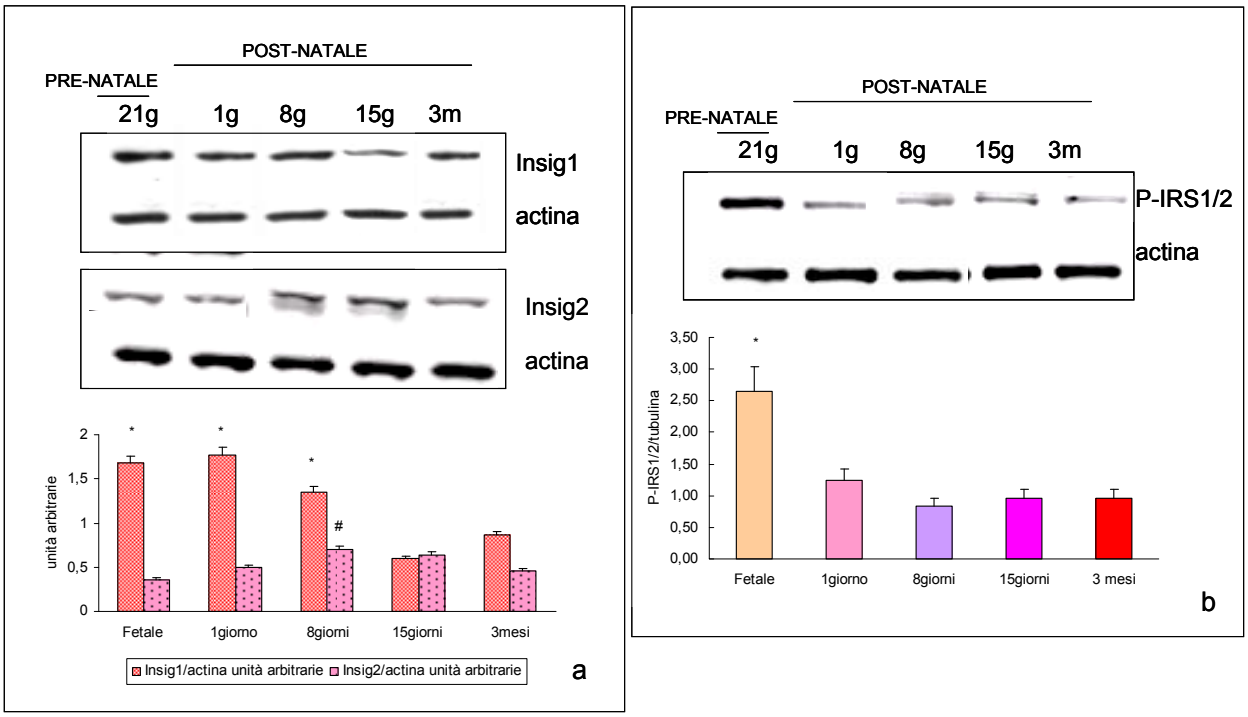


Figura 26 (a): Livelli proteici di Insig1 e Insig2 misurati mediante analisi di Western Blot su membrane totali preparate da fegato di ratti al 21° giorno di vita fetale, a 1, 8, 15 giorni e 3 mesi di vita postnatale. In figura è riportato un Western blot tipo con la relativa analisi densitometrica. #,*=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3mesi). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti. (b): Stato di fosforilazione di IRS1/2 (Tyr612) saggiato mediante analisi di Western Blot su lisato totale di fegato di ratti al 21° giorno di vita fetale, a 1, 8, 15 giorni e 3 mesi di vita postnatale. In figura è riportato un Western blot tipo con la relativa analisi densitometrica. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3mesi). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

Dal momento che ad alti livelli di Insig dovrebbe corrispondere un basso livello dell'HMG-CoAR e viceversa, i risultati ottenuti mostrano che questa correlazione esiste per Insig1 solo a partire dai 15 giorni, mentre per Insig2 si mantiene nei diversi stadi dello sviluppo.

Per quanto riguarda la capacità delle cellule epatiche di rispondere all'insulina durante lo sviluppo, la fosforilazione dell'IRS1/2 si presenta elevata nello stadio fetale e ridotta nel postatale

fino ai valori dell'adulto. Pertanto, fino ai 15 giorni di vita postnatale, non sembra esistere una stretta correlazione tra risposta all'insulina e livelli di Insig1, confermando un non completo sviluppo della sensibilità del fegato all'ormone nella vita perinatale del ratto.

Livelli di SREBP

Poiché Insig1 e Insig2 regolano la trascrizione dell'HMG-CoAR, modulando il processamento di SREBP e quindi il rilascio della forma matura nSREBP, trascrizionalmente attiva, è stato analizzato se le variazioni nei livelli di Insig osservate durante lo sviluppo perinatale fossero correlate a modificazioni nei livelli proteici di tali fattori di trascrizione.

Figura 27: Livelli proteici di nSREBP1 e nSREBP2 nel fegato di ratti al 21° giorno di vita fetale, a 1, 8, 15 giorni e 3 mesi di vita post-natale

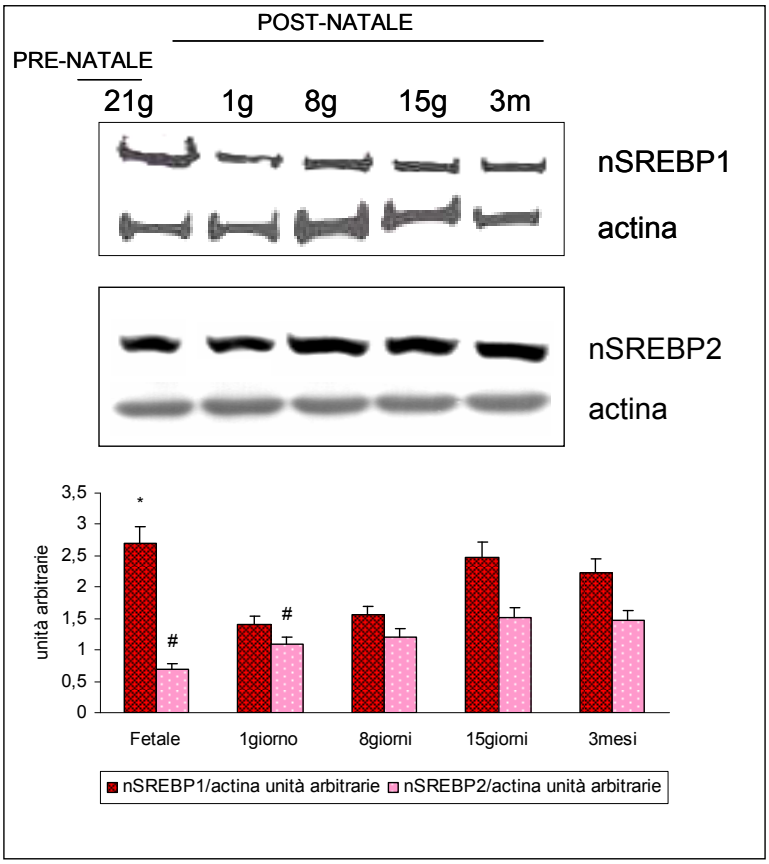


Figura 27 Livelli proteici di nSREBP1 e nSREBP2 saggiati mediante analisi di Western Blot sul lisato totale preparato da fegato di ratti al 21° giorno di vita fetale, a 1, 8, 15 giorni e 3 mesi di vita postnatale. In figura è riportato un Western blot tipo con la relativa analisi densitometrica. #,*=$p<0.05$ valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (3mesi). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di quattro differenti esperimenti.

I livelli proteici di nSREBP1 si presentano elevati al 21°giorno di vita fetale e risultano non significativamente diversi dall'adulto negli altri stadi considerati.

I livelli di nSREBP2 risultano bassi nel fetale e aumentano progressivamente fino ai valori dell'adulto.

È interessante notare che all'aumentato di P-IRS1/2 corrisponda l'aumento di nSREBP1, essendo l'isoforma -1c indotta direttamente dall'insulina (Kast-Woelbern et al., 2004). Per quanto riguarda nSREBP2, i suoi livelli sono in accordo con i livelli di Insig1 riportati ma non correlabili con i livelli di HMG-CoAR. Ancora una volta si può osservare che durante lo sviluppo il processo di regolazione a lungo termine dell'HMG-CoAR non sembra essere maturo, dal momento che non si osserva una coordinazione precisa tra risposta ormonale - espressione di proteine regolatrici - espressione dell'HMG-CoAR.

SEZIONE III: HMG-CoAR E DIFFERENZIAMENTO

L'importanza dell'HMG-CoAR nel differenziamento è stata ampiamente dimostrata in differenti tipi cellulari (Viccica et al., 2007; Castellano et al., 1994). Tra i suoi prodotti, i più coinvolti nel differenziamento cellulare sono stati individuati nel colesterolo e in altri mevalonato-derivati. Mentre, la necessità di un'adeguata attività dell'HMG-CoAR durante il differenziamento è stata ben definita valutando gli effetti negativi derivanti dall'inibizione dell'enzima, non esiste uno studio sistematico che prenda in considerazione in un modello ben caratterizzato i livelli dell'enzima e la sua modulazione da parte del complesso regolativo. Pertanto, lo studio della regolazione della reduttasi durante il differenziamento cellulare è stata affrontato utilizzando il modello sperimentale di mioblasti fetali di ratto (cellule L6) stimolati con un ormone pro-differenziante, l'insulina (Pontecorvi et al., 1988); tale modello cellulare offre il vantaggio di essere facilmente differenziabile e con fasi di differenziamento ben caratterizzate.

Caratterizzazione del modello sperimentale

Dopo un'iniziale verifica della espressione di due proteine *marker* del differenziamento, miogenina (a) e MHC (b), in seguito alla stimolazione delle L6 con insulina, sono stati analizzati i livelli di colesterolo (c) e la produzione di proteine prenilate (d), due dei prodotti finali della via biosintetica di cui l'HMG-CoAR è l'enzima chiave. Pertanto, i mioblasti L6 sono stati trattati con insulina 10^{-8} M, che è risultata essere la dose più efficace (dati non mostrati) a diversi tempi. In figura 28 è riportato un Western blot tipo con la relativa analisi densitometrica dei valori ottenuti dai diversi campioni stimolati con insulina 10^{-8} M.

Figura 28: Effetto dell'insulina (10^{-8} M) sull'espressione di miogenina (a) e MHC (b) e sui livelli di colesterolo intracellulare (c) e di proteine prenilate (d) in mioblasti L6

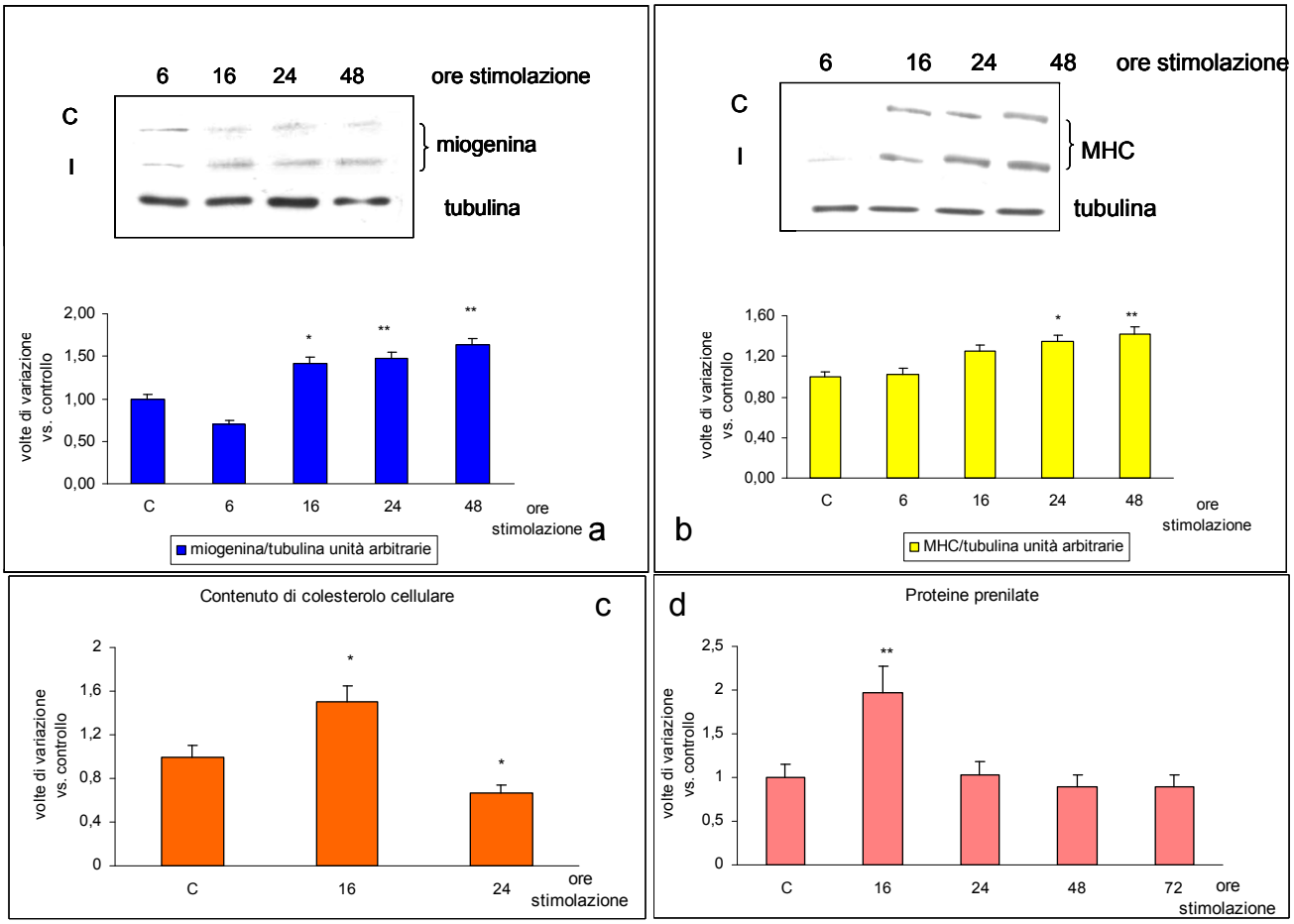


Figura 28 (a): *Time-course* (da 0 a 48 ore di stimolazione con con insulina 10^{-8} M) dell'induzione di miogenina valutato mediante Western Blot sul lisato totale.*=p<0.05, **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): *Time-course* (da 0 a 48 ore di stimolazione con insulina 10^{-8} M) dell'induzione di MHC misurato mediante Western Blot sul lisato totale.*=p<0.05, **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (c): Contenuto di colesterolo intracellulare valutato mediante TLC in mioblasti L6 stimolati per 16 e 24 ore con insulina 10^{-8} M.*=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (d): Livelli di proteine prenilate valutati mediante incorporazione di ^{3}H-MVA in mioblasti L6 stimolati da 0 a 72 ore con con insulina 10^{-8} M.**=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

I risultati mostrano che deboli variazioni dei *marker* sono osservabili anche nelle cellule non stimolate; pertanto, i risultati vengono espressi come rapporto tra la quantità presente ad ogni tempo nelle stimolate rispetto ai controlli. Si può osservare che il trattamento con insulina, in accordo con la letteratura, è in grado di indurre l'espressione precoce della miogenina (a) e più tardiva dell'MHC (b).

Per quanto riguarda i livelli di colesterolo (c) e la produzione di proteine prenilate (d), si osserva un aumento a 16 ore dalla stimolazione con insulina.

Livelli di HMG-CoAR, Insig1 e nSREBP1

Per valutare se le variazioni di colesterolo si accompagnassero a modificazioni del livello dell'HMG-CoAR ed in particolare se il *network* regolatorio dell'attività della reduttasi si modificasse in accordo con le eventuali variazioni dei suoi livelli, è stato seguito anche l'andamento dei livelli di Insig1 e di nSREBP1.

Figura 29: Espressione di HMG-CoAR (a), Insig1 (b) e nSREBP1 (c) in mioblasti L6

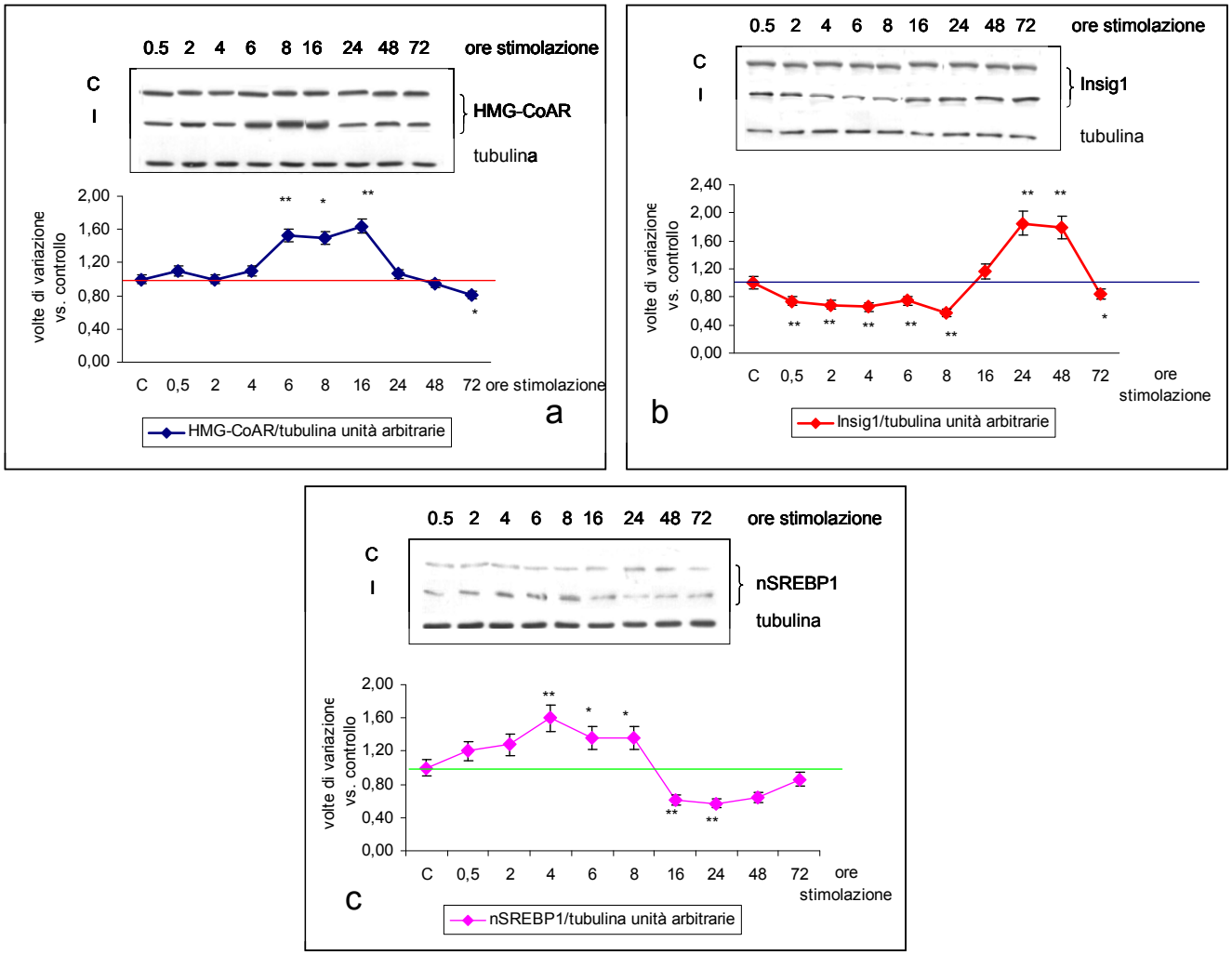


Figura 29 (a): *Time-course* (da 0 a 72 ore di stimolazione con con insulina 10^{-8} M) dell'induzione di HMG-CoAR valutato mediante Western Blot sul lisato totale.*=p<0.05, **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): *Time-course* (da 0 a 72 ore di stimolazione con con insulina 10^{-8} M) dell'induzione di Insig1 misurato mediante Western Blot sul lisato totale.*=p<0.05, **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (c): *Time-course* (da 0 a 48 ore di stimolazione con con insulina 10^{-8} M) dell'induzione di nSREBP1 saggiato mediante Western Blot sul lisato totale.*=p<0.05, **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

I risultati ottenuti mostrano come il livello proteico della reduttasi (a) varia durante il differenziamento indotto dall'insulina; infatti, si osserva un aumento iniziale dei livelli dell'enzima, a partire dalle 6 ore di stimolazione, che è massimo a 16 ore dal trattamento con insulina e successivamente diminuisce fino a 72 ore.

D'altro canto sono osservabili variazioni dei livelli di Insig1 (b) e nSREBP1 (c), che sono in grado di spiegare i livelli di HMG-CoAR rilevati.

Infatti, un precoce aumento dei livelli di nSREBP1 ed un'iniziale diminuzione dei livelli di Insig1, possono essere verosimilmente considerati alla base dell'aumento iniziale dei livelli di reduttasi. Successivamente, l'induzione di Insig1, SREBP1c-dipendente, si può ipotizzare che determini a sua volta la riduzione sia dei livelli di nSREBP1 che dei livelli di HMG-CoAR.

Pertanto, i risultati confermano una regolazione dei livelli di HMG-CoAR a *feedback* negativo Insig1-dipendente in accordo con quanto affermato da Kast-Woelbern et al., 2004 nel tessuto adiposo.

Importanza dell'HMG-CoAR nel differenziamento

Per verificare l'importanza dell'HMG-CoAR nel processo di differenziamento, l'attività dell'enzima è stata inibita pretrattando i mioblasti L6 con mevinolina 10 μM (Mev, inibitore dell'attività dell'HMG-CoAR) o 25-idrossi-colesterolo 25 μM (25OH-Col, induttore della degradazione dell'HMG-CoAR). Dopo stimolazione con insulina, è stato misurato il livello di miogenina a 16 ore e di MHC a 24 ore, tempi ai quali il loro livello risultava significativamente aumentato.

Figura 30: Effetto della mevinolina e del 25-idrossicolesterolo sull'espressione di miogenina e MHC in mioblasti L6

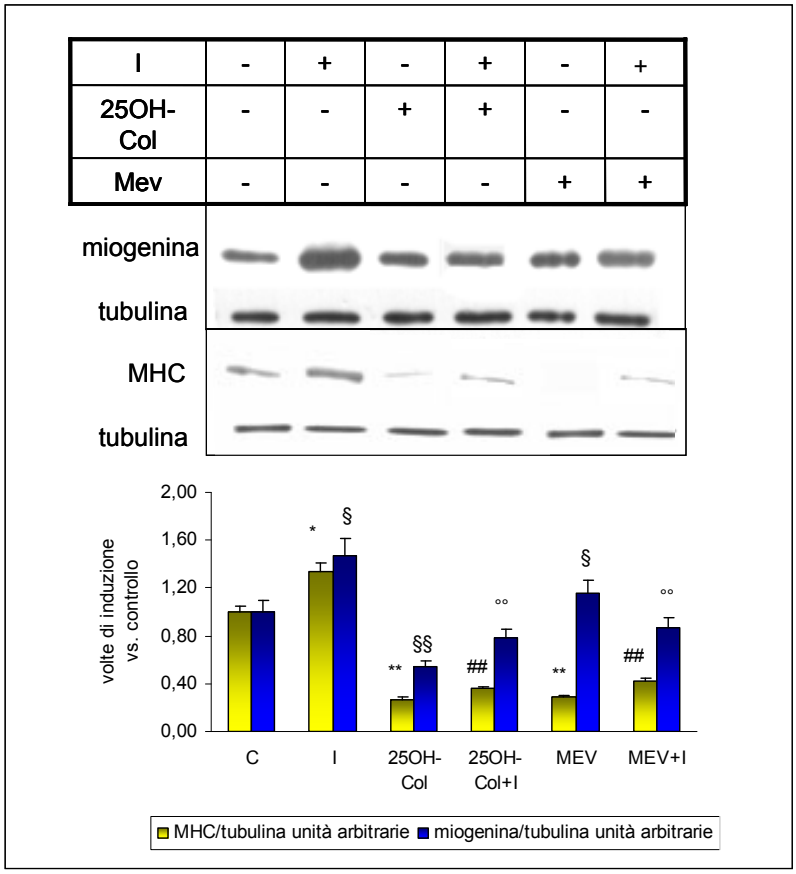


Figura 30: I mioblasti L6 pretrattati con mevinolina 10 μM (Mev, inibitore dell'attività dell'HMG-CoAR) o 25-idrossi-colesterolo 25 μM (25OH-Col, induttore della degradazione dell'HMG-CoAR). Le cellule sono state successivamente stimolate con insulina per 16 ore per quanto riguarda la miogenina (in blu) e 24 ore per l'MHC (in giallo). I loro livelli proteici sono stati valutati mediante Western Blot sul lisato totale. §=p<0.05; **, §§=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). ##, °°= p<0.001 valutato con il test di Tukey rispetto al campione stimolato con insulina (I). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

I risultati mostrano che l'inibizione dell'attività reduttasica ottenuta con due diversi inibitori è in grado già di per sé di prevenire la comparsa dei *marker* del differenziamento, miogenina e MHC. Inoltre, il pretrattamento con mevinolina e 25-idrossi-colesterolo, è in grado di ridurre l'azione pro-differenziante dell'insulina. Pertanto i risultati suggeriscono che l'attività dell'HMG-CoAR sia assolutamente necessaria per l'induzione del differenziamento in tali cellule.

Attivazione della p38 e livelli di p21waf nei mioblasti L6 stimolati con insulina

Allo scopo di comprendere la relazione tra HMG-CoAR e differenziamento dei mioblasti L6, è stato analizzato il coinvolgimento della reduttasi in una via di segnale che sembra essere uno dei maggiori regolatori del differenziamento muscolare, la via della p38/MAPK. Il segnale della p38, infatti è in grado di indurre l'espressione dell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente, p21waf1 nei mioblasti, supportando il suo ruolo nel regolare l'uscita dal ciclo cellulare dei mioblasti nella fase G1, che è assolutamente necessario affinché avvenga il differenziamento (Keren et al., 2006). È interessante, inoltre, notare che p21waf rappresenta un gene SREBP1a-dipendente quindi strettamente correlato alla via regolatoria dell'HMG-CoAR (Inoue et al., 2005). Pertanto nei mioblasti stimolati con insulina, è stata presa in esame l'attivazione della p38 e i livelli di p21waf.

Figura 31: Fosforilazione della p38 (a) e livelli di p21waf (b) in mioblasti L6

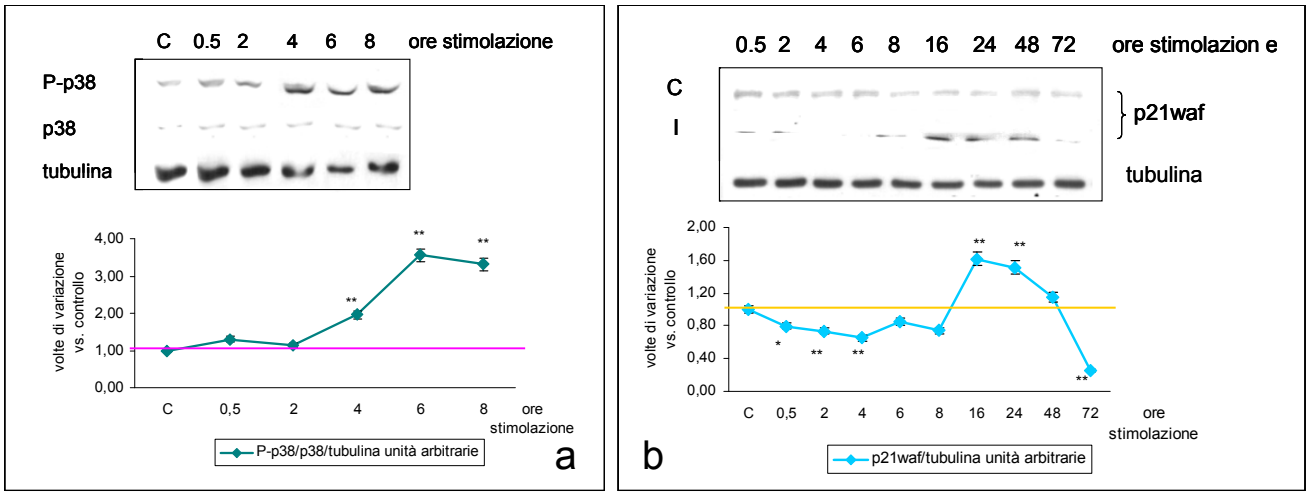


Figura 31 (a): *Time-course* (da 0 a 8 ore di stimolazione con insulina 10^{-8} M) dell'induzione dell'attivazione per fosforilazione di p38 (Thr180/Tyr182) valutato mediante Western Blot sul lisato totale. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): *Time-course* (da 0 a 72 ore di stimolazione con insulina 10^{-8} M) dell'induzione di p21waf valutato mediante Western Blot sul lisato totale.*=p<0.05, **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

I risultati mostrano che la stimolazione con insulina determina un'attivazione persistente della p38, indicando che l'azione pro-differenziante dell'ormone coinvolge tale via di segnale. È inoltre, interessante notare che l'induzione insulino-dipendente di p21waf raggiunge il suo massimo a 16 ore dalla stimolazione e coincide sia con il picco nei livelli di proteine prenilate che nei livelli di HMG-CoAR, suggerendo che le variazioni dei livelli di p21waf siano correlate alla via regolatoria responsabile delle variazioni della reduttasi nel differenziamento.

Coinvolgimento della via p38/MAPK nelle variazioni di HMG-CoAR, Insig1 e nSREBP1 nel differenziamento

Allo scopo di valutare il coinvolgimento della p38 nelle variazioni dell'HMG-CoAR durante il differenziamento indotto dall'insulina, i mioblasti L6 sono stati pretrattati con SB203580 (5 μM), inibitore della p38 e successivamente stimolati con insulina. Sono stati analizzati, quindi i livelli proteici di HMG-CoAR (a) a 16 ore, di Insig1 (b) a 24 ore e di SREBP1 e nSREBP1 (c) a 6 ore dal trattamento con insulina.

Figura 32: Effetto dell'inibizione della p38 sui livelli di HMG-CoAR (a), Insig1 (b), SREBP1 e nSREBP1 (c) in mioblasti L6

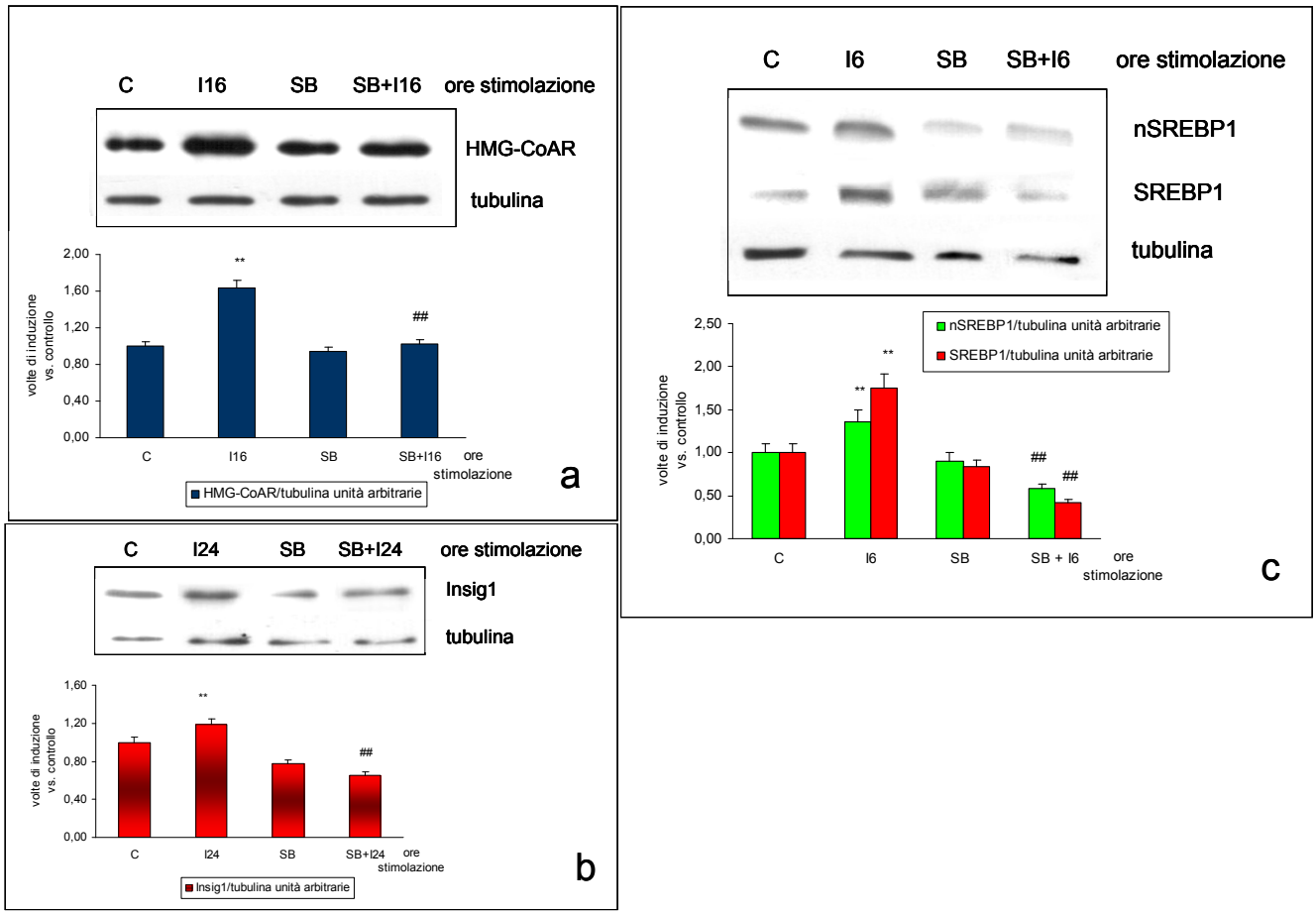


Figura 32 (a): I mioblasti sono stati trattati con insulina per 16 ore (10^{-8}M) e con l'inibitore della p38/MAPK (SB 203580) (5µM) (10 minuti prima di I). Dopo la stimolazione le cellule sono state lisate e successivamente è stato effettuato il saggio immunologico utilizzando l'anticorpo anti-HMG-CoAR. La figura riporta un Western Blot tipo e la relativa analisi densitometrica. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. ##= p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al campione stimolato con insulina (I). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): I mioblasti sono stati trattati con insulina per 24 ore (10^{-8}M) e con l'inibitore della p38/MAPK (SB 203580) (5µM) (10 minuti prima di I). Dopo la stimolazione le cellule sono state lisate e successivamente è stato effettuato il saggio immunologico utilizzando l'anticorpo anti-Insig1. La figura riporta un Western Blot tipo e la relativa analisi densitometrica. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. ##= p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al campione stimolato con insulina (I). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (c): I mioblasti sono stati trattati con insulina per 6 ore (10^{-8}M) e con l'inibitore della p38/MAPK (SB 203580) (5µM) (10 minuti prima di I). Dopo la stimolazione le cellule sono state lisate e successivamente è stato effettuato il saggio immunologico utilizzando l'anticorpo anti-SREBP1 (porzione N-terminale). Per quanto riguarda il livello di SREBP1 totale è stata analizzata la banda corrispondente al peso molecolare di 125kDa, mentre per la nSREBP1 la banda a 68kDa. La figura riporta un Western Blot tipo e la relativa analisi densitometrica. **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. ##=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al campione stimolato con insulina (I). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

I risultati ottenuti dimostrano chiaramente il coinvolgimento dell'HMG-CoAR e del suo *network* regolatorio nel processo differenziativi p38-dipendente. L'inibizione della p38, infatti, è in grado di prevenire l'incremento insulino-dipendente dell'HMG-CoAR, Insig1 e SREBP1.

Livelli di p21waf in presenza degli inibitori della p38 e dell'HMG-CoAR in mioblasti L6

Per verificare le relazioni tra l'aumento dei livelli di p21waf , la p38 e la reduttasi, i mioblasti L6 sono stati trattati con SB203580 (a) e con il 25-idrossicolesterolo e mevinolina (b) prima della stimolazione per 16 ore con insulina.

Figura 33: Effetto dell'inibitore della p38 (a)e del 25-idrossicolesterolo e mevinolina (b) sull'espressione insulino-dipendente di p21waf in mioblasti L6

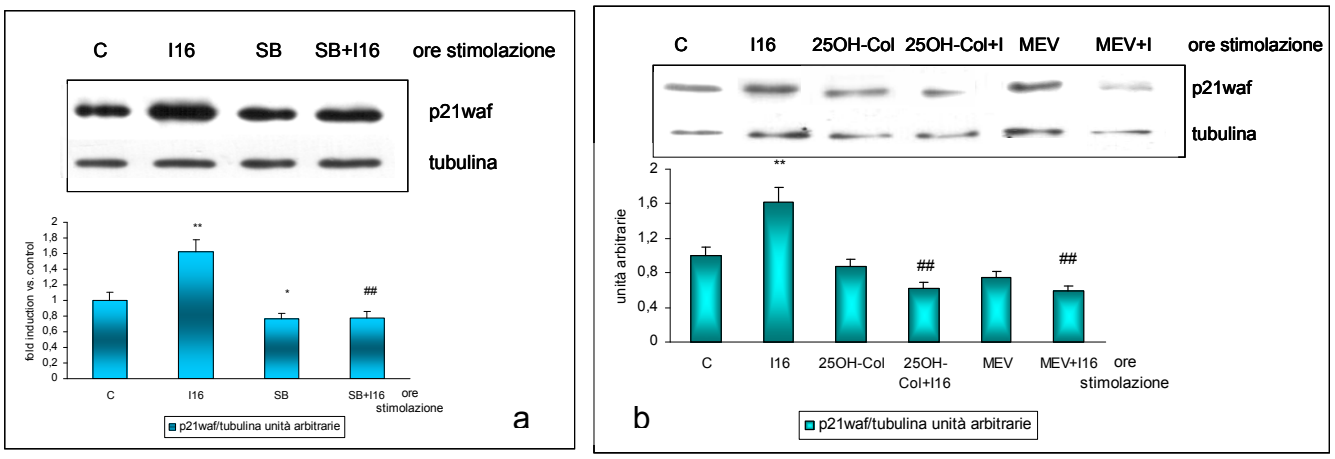


Figura 33 (a): I mioblasti sono stati trattati con insulina per 16 ore (10^{-8}M) e con l'inibitore della p38/MAPK (SB 203580) (5μM) (10 minuti prima di I). Dopo la stimolazione le cellule sono state lisate e successivamente è stato effettuato il saggio immunologico utilizzando l'anticorpo anti-p21waf. La figura riporta un Western Blot tipo e la relativa analisi densitometrica. *=p<0.05; **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. ##= p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al campione stimolato con insulina (I). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): I mioblasti L6 con mevinolina 10 μM (Mev, inibitore dell'attività dell'HMG-CoAR) e 25-idrossi-colesterolo 25 μM (25OH-Col, induttore della degradazione dell'HMG-CoAR). Le cellule sono state successivamente stimolate con insulina per 16 ore.). Il livello proteico è stato valutato mediante Western Blot sul lisato totale.*=p<0.05; **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. ##= p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa al campione stimolato con insulina (I). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

I risultati mostrano che il blocco della p38 inibisce l'espressione della p21waf (a). È tuttavia, interessante notare che l'induttore della degradazione dell'HMG-CoAR, 25-idrossicolesterolo e l'inibitore dell'attività dell'HMG-CoAR, mevinolina, mostrano lo stesso comportamento; infatti, la riduzione dei livelli e dell'attività della reduttasi determina sia una riduzione nei livelli basali di

p21waf ma soprattutto previene l'aumento insulino-dipendente della p21waf. Il 25-idrossicolesterolo rappresenta anche un inibitore della maturazione di SREBP (Sun et al., 2005), indicando un effetto SREBP1a dipendente sull'espressione di p21waf; tuttavia i risultati ottenuti inibendo direttamente l'HMG-CoAR, suggeriscono una ulteriore regolazione reduttasi-dipendente dei livelli di p21waf, verosimilmente indirizzata a modificazioni post-traduzionali di p21waf stessa o di proteine correlate.

Livelli di miogenina e MHC in presenza dell'inibitore della p38 in mioblasti L6

Per verificare che effettivamente l'inibizione della p38 fosse in grado di prevenire il processo differenziativi nei mioblasti L6, le cellule sono state trattate con SB203580 prima della stimolazione con insulina.

Figura 34: Effetto dell'inibitore della p38 sull'espressione insulino-dipendente di miogenina(a) e MHC (b) in mioblasti L6

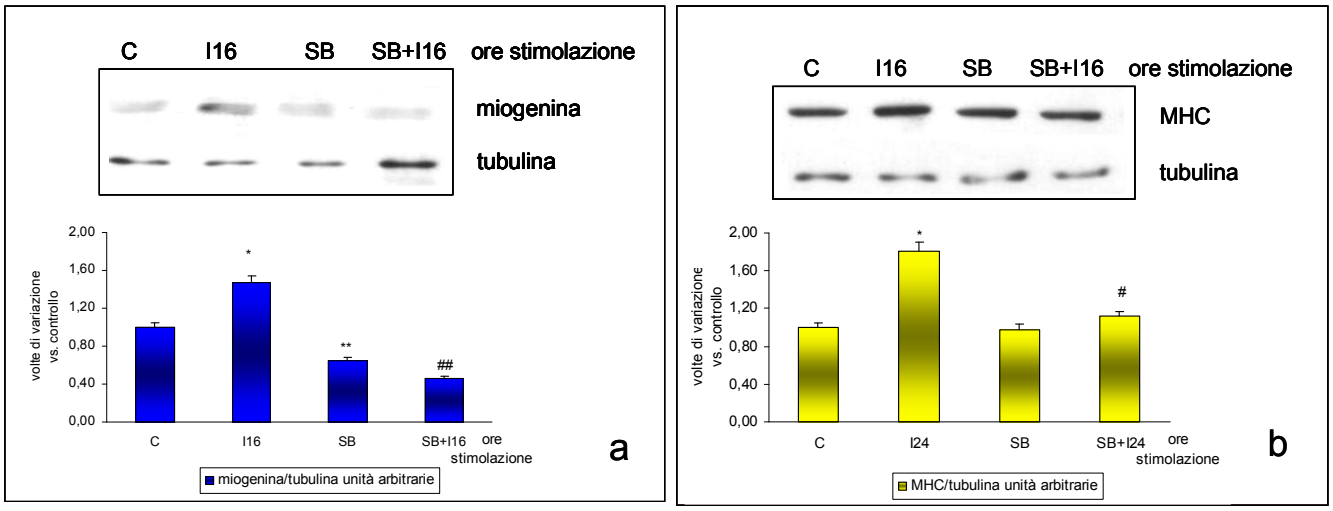


Figura 34 (a): I mioblasti sono stati trattati con insulina per 16 ore (10^{-8}M) e con l'inibitore della p38/MAPK (SB 203580) (5μM) (10 minuti prima di I). Dopo la stimolazione le cellule sono state lisate e successivamente è stato effettuato il saggio immunologico utilizzando l'anticorpo anti-miogenina. La figura riporta un Western Blot tipo e la relativa analisi densitometrica. *=p<0.05; **=p<0.001 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. ##= p<0.001 valutato con il test di Tukey rispetto al campione stimolato con insulina (I). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. (b): I mioblasti sono stati trattati con insulina per 24 ore (10^{-8}M) e con l'inibitore della p38/MAPK (SB 203580) (5μM) (10 minuti prima di I). Dopo la stimolazione le cellule sono state lisate e successivamente è stato effettuato il saggio immunologico utilizzando l'anticorpo anti-MHC. La figura riporta un Western Blot tipo e la relativa analisi densitometrica. *=p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al controllo (C). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti. #= p<0.05 valutato eseguendo l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Tukey. La significatività è espressa rispetto al campione stimolato con insulina (I). I valori rappresentano la media ± la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

I risultati ottenuti mostrano che effettivamente l'inibizione della p38 previene l'espressione insulino-dipendente dei *marker* del differenziamento, miogenina (a) e MHC (b).

DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONI

Esigenza, disponibilità e utilizzazione di composti mevalonato derivati presentano caratteristiche diverse in diversi stadi fisiologici nonostante che per alcuni di essi, quali ad esempio il colesterolo, gli organismi si garantiscono una omeostasi. L'HMG-CoAR rappresenta l'enzima chiave nella produzione del mevalonato e la sua attività risulta finemente regolata da un complesso proteico a sua volta influenzato da ormoni e altri modulatori come è stato definito nell'animale adulto. Tuttavia le modificazioni dell'attività dell'enzima riscontrabili sia nell'invecchiamento che nello sviluppo hanno suscitato un interesse particolare sui fattori responsabili e sul comportamento dei meccanismi di regolazione. Tra i fattori responsabili delle variazioni della HMG-CoAR i ROS, la disponibilità di ossigeno, le variazioni ormonali sono tra i principali candidati che emergono da precedenti ricerche del nostro gruppo di ricerca. Pertanto in questo progetto di dottorato sono stati studiati gli aspetti molecolari alla base delle variazioni dell'enzima e delle interazioni con altri parametri, osservabili o già osservate.

In un animale adulto, in condizioni fisiologiche, lo stato di attivazione, inteso come il rapporto tra l'attività espressa e l'attività totale dell'enzima, risulta essere pari a circa il 30-40%. Durante l'invecchiamento, invece si osserva una modificazione di questo rapporto che diventa pari al 100% ossia l'enzima risulta essere totalmente attivato (Marino et al., 2002). Tale aumento nello stato di attivazione della reduttasi è stato messo in relazione all'aumento dei radicali liberi osservabili durante l'invecchiamento. Lo studio di tali relazioni ha rivelato una dipendenza diretta dello stato di attivazione dell'HMG-CoAR dai livelli di ROS. Infatti sia in modelli animali (ratti TAA, 24AL) che cellulari (HepG2 stimolate con H_2O_2) con alterato stato redox, si osserva una stretta correlazione tra attività della reduttasi e ROS.

Inoltre, è stato osservato come nei ratti vecchi l'enzima risulti essere completamente defosforilato nel fegato, nonostante che l'enzima responsabile della sua fosforilazione ed inibizione, l'AMPKα, sia attivo ed associato con l'HMG-CoAR. Lo studio della PP2A, l'enzima responsabile della defosforilazione ed attivazione della reduttasi, nonostante non mostri variazione dei suoi livelli proteici, presenta una maggiore associazione con l'HMG-CoAR.

Per chiarire il meccanismo ROS-dipendente alla base di tali variazioni, è stato utilizzato un modello cellulare: HepG2 stimolate con H_2O_2. La caratterizzazione di questo modello ha mostrato le stesse variazioni sia nell'attività che nella regolazione dell'HMG-CoAR rilevate nell'invecchiamento. Infatti, anche in questo modello *in vitro*, l'HMG-CoAR presenta a 15 minuti dal trattamento, una completa attivazione; l'AMPKα risulta più fosforilata e più attiva ma non in grado di fosforilare l'HMG-CoAR; la PP2A appare maggiormente associata con la reduttasi e la sua inibizione previene l'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR H_2O_2-indotto.

È noto che la p38, attivata da alti livelli di ROS, è in grado di dirigere l'attività di defosforilazione della PP2A verso alcuni suoi bersagli cellulari (Cicchillitti et al., 2003). Dai risultati riportati sul ruolo della p38 si rileva che anche in questo modello questo meccanismo ha luogo. Infatti l'inibizione della p38 previene sia l'aumento dello stato di attivazione dell'HMG-CoAR che l'associazione della PP2A con la reduttasi, senza mostrare effetti sull'attività dell' AMPKα. Di particolare interesse è che una elevata attivazione della p38 sia riscontrabile anche nell'invecchiamento.

Tali risultati consentono di proporre un meccanismo con il quale l'aumentato livello di ROS influenza la regolazione a breve termine della reduttasi; si può infatti prevedere che durante l'invecchiamento gli alti livelli di ROS causino la contemporanea attivazione della p38 e dell'AMPKα; che l'attivazione della p38 provochi a sua volta un aumento nell'associazione tra la PP2A e l'HMG-CoAR, determinando la defosforilazione e la completa attivazione dell'enzima; ed infine, che la elevata associazione della PP2A con la reduttasi impedisca la fosforilazione da parte dell'AMPKα.

Il modello proposto risulta essere ulteriormente suffragato nei ratti mantenuti a due differenti tipi di restrizione calorica, di cui è noto l'effetto anti-invecchiamento. Infatti l'azione preventiva della restrizione calorica è risultata efficace sul meccanismo d'azione dei ROS prevenendo sia l'attivazione della p38 che l'associazione della PP2A età-correlate, e impedendo quindi l'aumento dello stato di attivazione dell'HMG-CoAR. Analogamente alla restrizione calorica, la dieta OMEGA-3 ha mostrato prevenire l'aumento età-correlato dello stato di attivazione dell'HMG-CoAR agendo sull'associazione p38-indotta della PP2A alla reduttasi.

Per quanto riguarda lo studio sulla regolazione a lungo termine durante l'invecchiamento, era già stato osservato che la reduttasi presentasse una velocità di degradazione ridotta non correlata alla variazione del suo livello proteico, non sensibile a 25-idrossi-colesterolo e il mevalonato o a variazioni dei ROS e non influenzata dalla restrizione calorica (Pallottini et al., 2004).

Innanzitutto si è verificato quindi l'espressione dell'mRNA dell'HMG-CoAR che è risultata ridotta rispetto all'adulto, e in grado di spiegare, in accordo con la ridotta velocità di degradazione, i non variati livelli proteici.

L'analisi si è quindi spostata sulle proteine Insig, che regolano sia la trascrizione via SREBP che la degradazione dell'HMG-CoAR (Sever et al., 2003 a,b). I ridotti livelli di Insig correlati alla ridotta sensibilità all'insulina, osservati nel ratto di 24 mesi AL spiegano la ridotta velocità di degradazione della reduttasi. Infatti la ridotta fosforilazione dell'IRS osservata, in accordo ai dati di letteratura (Fulop et al., 2003; Moller et al., 2003; Masoro, 2005), suggerisce una diminuita

sensibilità all'insulina che a sua volta, determina un decremento dei livelli di Insig1 alla base della ridotta degradazione dell'HMG-CoAR.

Insig regola anche la trascrizione della reduttasi controllando la maturazione del fattore di trascrizione SREBP e il rilascio della forma nSREBP, trascrizionalmente attiva (Horton et al., 2002). I dati hanno mostrato, in accordo ai ridotti livelli di Insig, un aumento nei livelli di nSREBP2, che risulta essere interessante alla luce del fatto che tale isoforma attiva preferenzialmente la trascrizione dei geni correlati al metabolismo del colesterolo (McPherson and Gauthier, 2004). Gli aumentati livelli di nSREBP2 dovrebbero determinare un aumento nella trascrizione del gene dell'HMG-CoAR, che al contrario negli animali vecchi risulta ridotta. Poteva essere ipotizzato che l'azione di nSREBP2 fosse indirizzata alla trascrizione di altri suoi geni bersaglio. Gli alti livelli di mRNA e proteina del LDLr riscontrati nel lisato totale del fegato dei ratti di 24 mesi AL, sembrano supportare tale ipotesi. Tuttavia la esposizione del LDLr sulla membrana è ridotta e correlata alla contemporanea riduzione dei livelli membranari di Caveolina1, e questo può contribuire fortemente all'ipercolesterolemia osservabile in questi animali durante l'invecchiamento. Ovviamente non si può escludere che la minore esposizione del LDLr sulla membrana possa dipendere, oltre che dalla diminuzione di caveolina, anche da una deregolazione della traslocazione del recettore.

Per quanto riguarda la restrizione calorica, i risultati non hanno mostrato effetti significativi sulle proteine coinvolte nella regolazione a lungo termine dell'HMG-CoAR, non prevenendo in tal modo la riduzione della velocità di degradazione età-correlata della reduttasi. È, invece, interessante notare come la CR e la dieta arricchita in OMEGA-3 siano in grado di prevenire la ridotta traslocazione del LDLr che si osserva durante l'invecchiamento. Ne consegue, che l'azione preventiva sui livelli plasmatici di colesterolo della CR e degli OMEGA-3 non si esplichi esclusivamente controllando lo stato di attivazione dell'HMG-CoAR e quindi la produzione di colesterolo, ma comprenda anche il controllo dell'espressione del recettore LDL sulla membrana.

Sempre nell'invecchiamento, anche la diminuita disponibilità di ossigeno potrebbe avere un suo ruolo ed essere alla base di modificazioni metaboliche ancora non del tutto chiarite.

Infatti la carenza di ossigeno innesca negli organismi aerobi una serie di risposte fisiologiche necessarie per l'adattamento e la sopravvivenza a diverse condizioni ipossiche. Un mediatore essenziale dell'ipossia è HIF-1, fattore trascrizionale in grado di aumentare l'espressione di tutti quei geni coinvolti nelle risposte adattative, tra i quali quelli coinvolti nel metabolismo glucidico.

È stato osservato che cellule HepG2 mantenute in ambiente ipossico presentavano un accumulo di HIF-1 e un aumento dei livelli di HMG-CoAR. Lo studio del meccanismo alla base di tali modificazioni è stato eseguito su cellule HepG2 sottoposte a ipossia chimica mediante

somministrazione di $CoCl_2$ in presenza ed in assenza di YC-1, un inibitore delle risposte mediate da HIF-1; tale sistema ha permesso di mimare l'effetto dell'ipossia su HIF-1.

In questo modello l'accumulo di HIF-1 indotto da $CoCl_2$ provoca un aumento del contenuto proteico di HMG-CoAR sia a tempi brevi (2 ore) che in lunghi periodi (20 e 24 ore) e l'incremento del contenuto proteico della reduttasi è anche accompagnato da un aumento della sua attività enzimatica. Tali variazioni sono sicuramente dipendenti da HIF-1 come dimostrato dall'utilizzo di YC-1 e come dimostrato dall'assenza di un effetto diretto del $CoCl_2$ sull'enzima.

Il maggior contenuto proteico di HMG-CoAR potrebbe essere dovuto sia ad una minore degradazione della proteina che ad un aumento della sua sintesi. Lo studio della velocità di degradazione non ha però mostrato variazioni tra i controlli ed i campioni ipossici. È stata, quindi, analizzata la sintesi della HMG-CoAR verificando se si trattasse di un effetto diretto o indiretto. Il gene della reduttasi può essere considerato un potenziale bersaglio di HIF-1 dal momento che sul promotore del gene della reduttasi è stata evidenziata la presenza della sequenza di legame per HIF-1, HRE.

La trasfezione del gene reporter pHMG-CoAR-luciferasi all'interno delle cellule HepG2 ha mostrato, infatti, a 16 ore di trattamento con $CoCl_2$ un incremento dell'attività del promotore attribuendo a HIF-1 il ruolo di regolatore trascrizionale del gene della reduttasi. Questo dato sembra essere in contrasto con i risultati ottenuti da Nguyen et al. (2007) che stabiliscono un legame diverso tra sintesi di colesterolo ed ipossia. Nel loro modello l'accumulo di HIF-1α e di lanosterolo indotto dall'ipossia media l'induzione di Insig, che porta alla rapida degradazione dell'HMG-CoAR, limitando la sintesi di colesterolo.

D'altra parte però, è stato dimostrato che la mancanza di ossigeno, nel lievito *Saccharomyces pombe,* induce una caduta della sintesi di colesterolo che a sua volta attiva SREBP ed induce la trascrizione dei suoi geni bersaglio (Robichon and Dugail, 2007); inoltre, in un modello renale che mima uno stato ipossico, è stato osservato un aumento dei livelli di mRNA e proteina di HMG-CoAR (Zager et al., 2008).

L'eventuale effetto indiretto di HIF-1 è stato anche verificato. Analizzando i livelli di alcune proteine coinvolte nella regolazione della reduttasi è stato dimostrato un aumento della proteina SCAP, proteina fondamentale per la traslocazione al nucleo dei fattori trascrizionali della reduttasi. Questo dato è in accordo con un recente lavoro pubblicato da Li et al. (2006), che dimostra un aumento di tale proteina nell'ipossia intermittente in tessuti epatici murini.

In conclusione, si è potuta dimostrare una relazione tra l'aumento di HIF-1, la trascrizione e l'espressione dell'enzima chiave della colesterologenesi, HMG-CoAR. Il meccanismo alla base di

questo processo sembra essere dovuto ad un effetto di HIF-1 sulla trascrizione sia diretto che indiretto; in particolare, l'effetto indiretto sembra essere mediato dalla proteina SCAP.

Questo assume un interesse particolare alla luce di dati che dimostrano come l'ipossia aumenti la proliferazione delle cellule HepG2 (Gwak et al., 2005), processo in cui è nota l'importanza della reduttasi. L'insieme di questi risultati può fornire spunti interessanti per la comprensione dei meccanismi alla base delle relazioni tra ipossia, alterazioni del metabolismo del colesterolo e stati patologici, oggetto attualmente di una crescente attenzione.

Altrettanto interessanti sono i risultati ottenuti durante lo sviluppo. Infatti, è noto che durante lo sviluppo fetale, la rapida divisione cellulare che avviene per il mantenimento di un adeguata velocità di crescita richiede una significativa quantità di colesterolo. Il colesterolo endogeno è sintetizzato *de novo* e il tasso di sintesi è relativamente elevato (Carr and Simpson, 1982; Dietschy et al., 1993). È stato suggerito che l'alto tasso di colesterologenesi fetale sia correlata con la rapida utilizzazione di colesterolo per la steroidogenesi (Parker et al., 1983; Carr and Simpson, 1981). A livello perinatale e prima e dopo l'allattamento sia la biosintesi che l'attività dell'HMGCoAR subiscono oscillazioni in gran parte riferibili alle modalità di alimentazione; per spiegare tali variazioni sono stati analizzati i meccanismi molecolari prendendo in esame le proteine coinvolte nella regolazione a lungo termine dell'HMG-CoAR.

Inizialmente, sono stati analizzati i livelli proteici dell'HMG-CoAR. I risultati mostrano, in analogia all'attività, alti livelli proteici di HMG-CoAR nella vita perinatale, ossia negli stati tardivi della vita fetale e nel primo giorno di vita postnatale, un significativo decremento a 8 giorni di vita postnatale e un aumento successivo fino a raggiungere i livelli dell'adulto. I cambiamenti nei livelli dell'HMG-CoAR risultano essere in accordo con la richiesta di colesterolo durante lo sviluppo. I bassi livelli proteici dell'HMG-CoAR riportati durante le prime fasi dell'allattamento (8 giorni) e la risalita allo svezzamento sono state correlate ad una dieta con latte ricca di grassi ed una successiva dieta povera di lipidi ma ricca di carboidrati allo svezzamento (Innis, 2007).

Per quanto riguarda i livelli di Insig, i risultati mostrano livelli di Insig1 scarsamente correlabili ai livelli di HMG-CoAR osservati, al contrario di quanto avviene per Insig2, i cui livelli ottenuti sembrano essere più riferibili ai livelli di HMG-CoAR riportati. L'analisi delle SREBP ha mostrato una correlazione tra i livelli di nSREBP1, livelli di HMG-CoAR e sensibilità all'insulina misurata valutando la fosforilazione dell'IRS; viceversa per quanto riguarda la variazione dei livelli di nSREBP2, non si mostrano essere in accordo con le modificazioni di livello della reduttasi osservate, almeno fino ad 8 giorni di vita postnatale. Questo comportamento bizzarro delle proteine coinvolte nella regolazione dell'HMG-CoAR può dipendere da due fattori, il fattore dietetico e l'altro ormonale.

Il fattore dietetico è correlato con la composizione del latte materno. Per quanto riguarda il fattore ormonale, si deve invocare una diversa influenza degli ormoni sui processi metabolici come del resto già ampliamente descritto in letteratura.

Infine, anche lo studio del differenziamento ha dato informazioni importanti. Lo studio è partito dalla consapevolezza dell'importanza dell'attività dell'HMG-CoAR nella regolazione di tale processo in differenti tipi cellulari (Viccica et al., 2007; Castellano et al., 1994). Allo scopo di analizzare i meccanismi molecolari e il ruolo della reduttasi, sono state utilizzate come modello sperimentale cellule L6 (mioblasti fetali di ratto). Queste cellule mononucleate, se sottoposte a determinate condizioni di coltura differenziano organizzandosi in miotubi. Il processo differenziativo, ampiamente caratterizzato, prevede l'espressione di *markers* precoci e tardivi che ne consentono la temporizzazione. Pertanto mioblasti L6 (non differenziati, ND) sono stati stimolati con un ormone pro-differenziante, l'insulina (Pontecorvi et al., 1988) ed in tale modello sono stati analizzate le variazioni dell'HMG-CoAR e del suo *network* regolatorio. Oltre a valutare se l'HMG-CoAR subisse variazione durante il differenziamento, si è inteso anche studiarne l'eventuale ruolo. E' stato quindi analizzato il coinvolgimento dell'enzima in una via di segnale in grado di regolare tale processo ed in particolare, nella via della p38/MAPK, che determina la fosforilazione di una serie di substrati che contribuiscono al processo di miogenesi. Tra le varie azioni regolatorie riportate, l'attivazione persistente della p38 induce l'espressione dell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente p21waf1 nei mioblasti, supportando il suo ruolo nel regolare l'uscita dal ciclo cellulare dei mioblasti nella fase G1, che è assolutamente necessario affinché avvenga il differenziamento (Keren et al., 2006)

I risultati ottenuti hanno mostrato che l'HMG-CoAR non solo subisce variazioni dei suoi livelli durante la miogenesi, ma che svolge un ruolo ben preciso. In particolare, l'aumento dei livelli di HMG-CoAR in questo sistema durante il differenziamento risulta essere fondamentalmente indirizzato alla sintesi di prenili. Tali risultati sono in accordo con i dati riportati da Klemm et al. (2001), in cui l'inibizione della prenilazione di p21ras e RhoA arrestavano l'adipogenesi insulino-dipendente, suggerendo anche nel nostro modello il coinvolgimento di tali proteine mevalonato-derivate. Per di più, sia SREBP1 che Insig1 mostrano modificazioni e risultano essere strettamente connesse alle variazioni della reduttasi. Tali variazioni risultano, inoltre, essere in relazione con p21waf. Infatti l'inibizione dell'attività reduttasica determina sia una riduzione dei livelli di p21waf che una prevenuta espressione delle proteine *marker* del differenziamento.

È, inoltre interessante notare, come l'HMG-CoAR ed i suoi fattori regolatori partecipino al processo differenziativo mediato dalla via della p38/MAPK. Infatti l'inibizione di tale chinasi,

determina un'inibizione dell'espressione indotta dall'insulina dell'HMG-CoAR e del suo *network* regolatorio, che si traduce in una mancata induzione di miogenina, MHC e p21waf. L'inibizione della p38 ha come effetto finale lo stesso effetto ottenibile inibendo l'attività reduttasica, ossia la mancata induzione di miogenina, MHC e p21waf, indicando quindi un ruolo attivo dell'enzima nel processo differenziativo.

Risulta, ancora interessante notare come si osservi in questo modello un'iniziale riduzione dei livelli di Insig1, suggerendo quindi che la regolazione dell'HMG-CoAR insulino-dipendente non si esplichi esclusivamente a livello trascrizionale, me che verosimilmente coinvolga anche una modulazione della velocità di degradazione dell'enzima. Insig1, infatti oltre a regolare la trascrizione dell'enzima via SREBP è anche in grado di indurne l'ubiquitinazione e la successiva degradazione. Tale caratteristica è riscontrabile durante le fasi finali del processo differenziativo. Infatti, sia a 72 ore dalla stimolazione con insulina che nei miotubi ottenuti modificando la concentrazione del siero nel terreno di coltura, abbiamo osservato che il processo differenziativo ha come effetto finale una riduzione verosimilmente Insig-dipendente dei livelli di HMG-CoAR.

Quindi, riassumendo si può proporre un modello che prevede l'attivazione della p38 insulina-dipendente che determina a sua volta sia un aumento dei livelli di SREBP1 che una riduzione degli iniziali livelli di Insig1. Tali variazioni inducono un aumento nei livelli di HMG-CoAR, che a sua volta determina un aumento dei prodotti finali della via biosintetica di cui è l'enzima chiave: colesterolo ed in maniera preponderante proteine prenilate. Inoltre, nonostante l'espressione p21waf sia SREBP1a dipendente (Inoue et al., 2005), risulta anche essere correlato con l'induzione dell'HMG-CoAR, come mostrato dal trattamento con la mevinolina, suo inibitore specifico.

D'altra parte però l'induzione di nSREBP1 comporta l'induzione di Insig1, che per un meccanismo a *feedback* negativo determina sia una riduzione dei livelli di SREBP1 che dell'HMG-CoAR, come è possibile osservare a lunghi tempi di stimolazione.

In conclusione dai risultati di queste ricerche emerge che l'HMG-CoAR pur essendo così finemente regolata nell'adulto, nei differenti stati fisiologici presi in esame, sviluppo, differenziamento e invecchiamento, subisce profonde variazioni di attività e di livello e che tali variazioni sono ottenute con differenti meccanismi e finalizzate a scopi diversi.

Mentre nell'adulto la regolazione dell'HMG-CoAR risulta prevalentemente diretta al mantenimento dell'omeostasi del colesterolo, nei modelli considerati i meccanismi di regolazione messi in evidenza non risultano sempre indirizzati al controllo del livello di colesterolo, come è evidente ad esempio nel modello di differenziamento cellulare, o non coordinati come nella deregolazione osservabile durante l'invecchiamento.

Inoltre, sia i risultati ottenuti con la restrizione calorica che con la dieta OMEGA-3 nonché le modificazioni dell'enzima osservate durante le prime fasi dello sviluppo post-natale hanno messo in evidenza l'importanza del regime alimentare nella regolazione dell'attività dell'HMG-CoAR. Analogamente al fattore dietetico, i risultati ottenuti con il modello di invecchiamento, con quello di sviluppo e con il modello di differenziamento, hanno messo in evidenza l'influenza della regolazione ormonale sull'HMG-CoAR.

Infine, l'influenza di ROS e di HIF-1α osservata sull'attività dell'HMG-CoAR può costituire la base per lo sviluppo di nuove strategie nel controllo delle modificazioni metaboliche associate ad un alterato contenuto di colesterolo.

Quindi, i risultati ottenuti in questo dottorato evidenziano il ruolo centrale dell'HMG-CoAR nei processi metabolici che caratterizzano differenti situazioni fisiologiche e suggeriscono che il controllo del *network* regolatorio dell'enzima possa rappresentare il bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche o farmacologiche.

INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI

MATERIALI E METODI

Animali

1.TAA

Ratti maschi Wistar (Harlan, San Pietro Natisone, Italia) dell'età di 3 mesi sono stati mantenuti in un ambiente a temperatura (22°C) ed umidità costante (55%) con un ciclo di luce/buio di 12 ore. Tutti i ratti era mantenuti a dieta liquida (Lieber De Carli senza etanolo, Lab. Piccioni, Milano, Italia). Un gruppo di animali (n=4) era utilizzato come controllo ed era mantenuto alla sola dieta liquida. Un altro gruppo di animali (n=4) (Cr., ratti trattati in cronico) con tioacetammide (TAA) (Merck, Milano, Italia), alla dose di 300mg/L di dieta liquida, preparata ogni giorno per un mese. Un altro gruppo (n=4) (Ac., ratti trattati in acuto) era trattato con TAA 300 mg/kg in una singola dose i.p. e sacrificato dopo 96 ore dal trattamento. Gli animali sono stati forniti dal laboratorio del *Prof.Giorgio Nanni del Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Patologia Generale, Università di Genova*, che ha provveduto alla cura dell'allevamento e al mantenimento a dieta di tali animali.

2.Invecchiamento

Animali di controllo di 3 mesi di vita e venivano alimentati *ad libitum* con una dieta standard (di tipo Teklad autoclavabile, (Harlan, contenente: 12% di acqua, 18% di proteine, 5.5% di grassi, 4.4% di fibre, 5.6% di ceneri), mentre i gruppi sperimentali erano costituiti da ratti dello stesso ceppo ma aventi 24 mesi, alimentati *ad libitum* o sottoposti a restrizione calorica sin dallo svezzamento.

I regimi dietetici, cui venivano sottoposti i ratti dei gruppi sperimentali, erano i seguenti:

-AL (*Ad Libitum*): gli animali sottoposti a tale dieta avevano libero accesso al cibo;

-DR (*Diet Restricted*): gli animali sottoposti a questo tipo di restrizione calorica venivano alimentati con il 60% del normale quantitativo di mangime standard consumato da ratti della stessa età alimentati *ad libitum*;

-EOD (*Every Other Day*): gli animali sottoposti a tale regime calorico erano alimentati *ad libitum*, ma a giorni alterni;

-OMEGA-3: gli animali sono stati alimentati fino all'età di 24 mesi, a partire dall'età di due mesi, con dieta *ad libitum* addizionata con 11,5% di olio di pesce (ricco di acidi grassi poliinsaturi della serie OMEGA-3) (Harlan).

Tutti i ratti avevano libero accesso all'acqua. Gli animali venivano mantenuti ad un ciclo luce e buio controllato (luce dalle 6:00 alle 18:00) e ad una temperatura costante di 20 ±1°C.

I ratti venivano sacrificati in vapori d'etere ed il fegato prelevato, posto subito in ghiaccio e conservato ad una temperatura di –80°C. Gli animali sono stati forniti dal laboratorio del *Prof. Ettore Bergamini del Centro per la ricerca sulla Biologia e Patologia dell'Invecchiamento, Università di Pisa* che ha provveduto alla cura dell'allevamento e al mantenimento a dieta di tali animali.

3.Sviluppo

Ratti maschi Wistar (Harlan) di differenti età sono stati mantenuti in un ambiente a temperatura (22°C) ed umidità costante (55%) con un ciclo di luce/buio di 12 ore.

I gruppi sperimentali erano costituiti da animali di differenti età:

-Fetali, ratti al 21° giorno di gestazione;

-1giorno, ratti di 1 giorno di vita postnatale;

-8giorno, ratti di 8 giorni di vita postnatale;

-15 giorni, ratti di 15 giorni di vita postnatale

-3 mesi, ratti di 3 mesi di vita postnatale (adulti).

I ratti già svezzati venivano alimentati *ad libitum* con una dieta standard (di tipo Teklad autoclavabile, (Harlan, contenente: 12% di acqua, 18% di proteine, 5.5% di grassi, 4.4% di fibre, 5.6% di ceneri).

I ratti venivano sacrificati in vapori d'etere ed il fegato prelevato, posto subito in ghiaccio e conservato ad una temperatura di –80°C.

Gli animali sono stati forniti dal laboratorio della *Dr.ssa Giovannella Bruscalupi del Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, dell'Università La Sapienza di Roma*, che ha provveduto alla cura dell'allevamento e al mantenimento a dieta di tali animali.

Ogni aspetto della cura degli animali e della sperimentazione su di essi è stato soggetto all'approvazione da parte del Ministero della Salute e risultava, quindi, conforme alle linee guida istituzionali dettate a riguardo da quest'ultimo *(D.Lvo 116/92, Comunicazione No. 246/H10 al Ministero Italiano della Salute).*

Colture cellulari

Soluzioni

-PBS:	NaCl	136 mM
	KCl	2 mM
	$Na_2HPO_4x2H_2O$	1 mM
	$CaCl_2x2H_2O$	0.6 mM
	$MgCl_2$	1 mM
	Portato a pH 7.4 con HCl 1M	

1.HepG2 (cellule di epatoma umano)

Terreno di coltura: RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Milano, Italia) addizionato con L-glutammina 2 mM, gentamicina 0.1 mg/ml, penicillina 100 U/ml e miscelato con il 10% di siero fetale bovino delipidato (Sigma).

Le cellule sono fatte crescere in fiasche da 25 cm^2 a 37°C, in presenza di CO_2 al 5%, propagate ogni 4 giorni ed il terreno cambiato ogni 2 giorni.

Prima di ogni esperimento le cellule sono fatte crescere fino a raggiungere il 70% di confluenza. Prima di ogni trattamento è stato cambiato il terreno.

2.L6 (mioblasti fetali di ratto)

Terreno di coltura: DMEM (Sigma) addizionato con L-glutammina 2 mM, gentamicina 100 mg/ml, penicillina 100 U/ml e miscelato con il 10% di siero fetale bovino delipidato (Sigma).

Le cellule sono state fatte crescere in fiasche da 25cm^2, a 37°C, in presenza di CO_2 al 5% e sono state propagate ogni 2 giorni. Prima di ogni esperimento le cellule sono state fatte crescere fino a raggiungere il 70% di confluenza e poi sono state tenute per 24 ore in terreno DMEM senza rosso fenolo (Sigma) addizionato con il 10% di siero fetale bovino delipidato (Sigma).

Stimolazioni e trattamenti

1.Invecchiamento

Le cellule HepG2 al 70% di confluenza in piastre da sei pozzetti vengono stimolate con H_2O_2 200 mM (Sigma). Per studiare il coinvolgimento della PP2A nell'aumentato stato di attivazione dell'HMG-CoAR indotto da ROS, le cellule sono state pretrattate con acido ocadaico (OA) 5nM, Na_2VO_4 100 mM o NaF 100 mM (Sigma). Per studiare il ruolo di p38 nella regolazione dell'HMG-CoAR è stato usato l'inibitore specifico SB203580 (Calbiochem, San Diego, CA).

2.Ipossia

Le cellule HepG2 vengono stimolate con $CoCl_2$ (Sigma), un sostituente del Fe^{2+}, ad una concentrazione pari a 100 μM, secondo tempi stabiliti (da 2 a 24 ore); è noto in letteratura che tale concentrazione risulta essere efficace nel promuovere l'aumento proteico di HIF-1α (Grosfeld et al., 2002). La soluzione è preparata sciogliendo il $CoCl_2$ in un determinato volume di H_2O distillata.

In altri esperimenti le cellule vengono trattate anche con YC-1 [3-(5'-idrossimetil-2'-furil)-1-benzilindazolo] (Sigma), noto in letteratura essere un inibitore delle risposte mediate da HIF-1α (Chun et al., 2001), alla concentrazione di 10 μM; YC-1 è disciolto in un determinato volume di DMSO (dimetilsolfossido).

Infine, in altri esperimenti, le cellule HepG2 vengono sottoposte a condizioni di carenza di ossigeno (2% di O_2) utilizzando delle camerette ipossiche (Forma Scientific, Mountain View, CA): prima dell'incubazione a 37°C secondo i tempi stabiliti, le cellule poste all'interno delle camerette vengono infuse per 20 minuti con una pO_2 pari al 2%.

3.Differenziamento

Le cellule L6 ND, sono state trattate, per il tempo necessario, con il veicolo in cui è sciolto l'insulina (Hepes) o insulina (Sigma) a diverse concentrazioni. In alcuni esperimenti le cellule sono state pretrattate 10 minuti prima della stimolazione con insulina, con l'inibitore della via p38/MAPK, SB 203580 (5 μM).

In alcuni esperimenti è stato utilizzato l'inibitore dell'attività dell'HMG-CoAR, mevinolina (10 μM) o con l'induttore della degradazione dell'HMG-CoAR, 25-idrossi-colesterolo (25 μM) (Sigma).

Preparazione dei lisati totali di cellule

Tamponi e Soluzioni

-PBS

-Tampone HMG-CoAR:	Saccarosio	0.1 M
	KCl	0.05 M
	KH_2PO_4	0.04 M
	EDTA	0.03 M
	Portato a pH 7.4 con NaOH	

-Sample buffer 1X:	Tris-HCl 0.125 M pH 6.8	1ml
	SDS 10%	1ml
	H_2O	1.996ml
	Cocktail di inibitori delle protesasi (Sigma)	4µl

Procedimento

Terminata la stimolazione, viene scartato il terreno di coltura; le cellule vengono lavate per 2 volte con circa 3ml di PBS freddo e incubate a 37°C con 500 µl di tripsina (Sigma) in modo da permetterne il distacco.

Una volta staccate le cellule, si aggiungono 500 µl di terreno completo (RPMI-1640 o DMEM miscelato con il 10% di siero fetale bovino) in modo da neutralizzare l'azione della tripsina.

Si raccoglie, quindi, il contenuto e lo si trasferisce in eppendorf; le cellule vengono centrifugate per 1 minuto a 14000 rpm in modo da separare il terreno contenente la tripsina dalle cellule.

Dopo aver scartato il supernatante, le cellule vengono risospese in 150 µl di tampone HMG-CoAR e sonicate per 3 volte (output control 3, duty cycle 50%, pulsata) per il dosaggio dell'attività dell'HMG-CoAR o risospese in Sample Buffer 1X per l'analisi dei livelli proteici mediante Western Blot.

Infine si prelevano diverse aliquote per effettuare i passaggi successivi: dosaggio proteico attraverso il metodo del Lowry, saggio dell'attività di HMG-CoAR, livelli proteici attraverso il Western Blot (per i protocolli vedere più avanti).

Preparazione del lisato membrane e citosol di cellule HepG2

Tamponi e soluzioni

-Tampone HMG-CoAR

-PBS

Procedimento

Terminata la stimolazione, le cellule vengono lavate con PBS freddo, staccate con tripsina; dopo aver neutralizzato l'azione della tripsina mediante l'aggiunta di terreno, le cellule vengono centrifugate a 14000 rpm per 1 minuto come precedentemente descritto.

Il pellet viene risospeso in tampone HMG-CoAR a cui è stato precedentemente aggiunto l'inibitore delle proteasi; i campioni vengono sonicati e, quindi, centrifugati a 14000 rpm per 1 ora. Il supernatante (citosol) viene prelevato e trasferito in nuove eppendorf; il pellet (membrane), invece, è risospeso in tampone HMG-CoAR.

Preparazione dei microsomi

I microsomi di fegato di ratto venivano preparati, a partire da tessuti conservati a -80°C, secondo la procedura riportata da Erickson et al. (1977) che prevede l'utilizzo dello stesso tampone sia per il subfrazionamento cellulare che per il dosaggio dell'attività dell'HMG-CoAR.

Tamponi e soluzioni

-Tampone HMG-CoAR

Procedimento

1 g di tessuto veniva omogeneizzato in 5 volumi di tampone per microsomi, per mezzo di un omogenizzatore di tipo Potter-Elvejheim con pestello in Teflon, e centrifugato a 10000g per 10 minuti alla temperatura di 4°C.

Il supernatante era trasferito in provette da ultracentrifuga e centrifugato a 100000g per 45 minuti sempre a 4°C, dopodiché il pellet veniva sospeso in 5 volumi di tampone per microsomi con un omogenizzatore a spillo (da usare a mano), curandosi di procedere sempre in ghiaccio.

Si ricentrtifugavano i campioni a 100000g per 45 minuti a 4°C e si risospendeva il pellet in 3 volumi di tampone dei microsomi, procedendo come per la precedente sospensione.

A questo punto veniva effettuato il dosaggio delle proteine presenti nei campioni.

Preparazione delle membrane cellulari totali da tessuto

Le membrane di fegato di ratto vengono preparate, a partire da tessuti conservati a -80°C, secondo una versione modificata della procedura riportata da Erickson et al. (1977).

Tamponi e soluzioni

Tampone per membrane:	Tris HCl	0.01M
	$CaCl_2$	0.05M
	NaCl	0.15M
	Portato a pH 7.5 con NaOH.	

Procedimento

Il tessuto viene omogeneizzato in 2 ml di tampone per membrane, per mezzo di un omogenizzatore di tipo Potter-Elvejheim con pestello in Teflon (8 strokes), e centrifugato a 10000g per 10 minuti alla temperatura di 4°C. Il supernatante viene trasferito in provette da ultracentrifuga e centrifugato a 100000g per 30 minuti sempre a 4°C, dopodiché il pellet viene sospeso in 2 ml di tampone per membrane con un omogenizzatore a spillo (da usare a mano), curandosi di procedere sempre in ghiaccio. Si ricentrifugano i campioni a 100000g per 20 minuti a 4°C e si risospende il pellet in 1 ml di tampone per membrane, procedendo come per la precedente sospensione. Quindi 200 µl vengono trasferiti in eppendorf e centrifugati per 3 minuti a 14000 rpm. Il supernatante viene scartato ed il pellet risospeso in 200 µl di tampone membrane. A questo punto viene effettuato il dosaggio delle proteine presenti nei campioni.

Preparazione del lisato totale da tessuto

Tamponi e soluzioni

-Tampone HMG-CoAR

-Sample Buffer 2X.	TRIS-HCl 0.25 M pH 6.8	1 ml
	20% SDS	1 ml
	H_2O distillata	1.996 ml
	Cocktail di inibitore delle proteasi	4 µl

Procedimento

1 g di tessuto veniva omogeneizzato in 5 volumi di tampone per HMG-CoAR, per mezzo di un omogenizzatore di tipo Potter-Elvejheim con pestello in Teflon, e centrifugato a 10000g per 10 minuti alla temperatura di 4°C. Il supernatante veniva diluito 1:1 con Sample Buffer 2X e sonicato per 3 volte (output control 3, duty cycle 50%, pulsata). Infine si prelevano diverse aliquote per effettuare i passaggi successivi: dosaggio proteico attraverso il metodo del Lowry e preparati i campioni per il Western Blot.

Dosaggio delle proteine

Le proteine verranno dosate secondo il metodo Lowry et al. (1951) usando albumina bovina (Sigma) come standard.

Soluzioni

Le soluzioni utilizzate per il dosaggio delle proteine secondo il metodo Lowry sono:

-Soluzione A:	NaK (tartrato)	200 mg/l
	Na_2CO_3	20 g/l
	NaOH	4 g/l
-Soluzione B:	$CuSO_4$	1% in H_2O distillata
-Soluzione C:	A+B	100 ml di A + 1 ml di B
-Soluzione D:	Folin	diluito 1:1 con H_2O distillata

Procedimento

Si procede all'allestimento della curva standard con soluzioni di albumina bovina frazione V (50 mg in 50 ml di H_2O distillata): 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl portati a volume finale di 1000 µl con H_2O distillata.

Si saggia un'aliquota fissa di campione (5 µl) in un volume finale di 1000 µl con H_2O distillata. Successivamente vengono aggiunti 5 ml di soluzione C. Si agita bene e si attendono 10 minuti a temperatura ambiente.

Si aggiungono 0.5 ml di soluzione D ad ogni campione. Si agita bene e si attendono 30 minuti a temperatura ambiente.

I campioni vengono letti allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 660 nm, contro il bianco.

Western Blot

Preparazione campioni
Tamponi e soluzioni:

-Sample buffer 1X
-Sample Buffer 2X
-BMG blu di bromofenolo 0,1%:β-mercapto-etanolo: glicerolo (in rapporto 2:2:5)

Procedimento
I campioni provenienti da lisato totale risospeso in Sample buffer 1X o membrane totali o microsomi preparati a partire dal tessuto o da cellule diluiti 1:1 con Sample Buffer 2X sono sonicati 3 volte (output control 3, duty cycle 50%, pulsata). Ai campioni viene quindi aggiunto il BMG 10% v/v e bolliti per 10 minuti a 100°C.

Separazione delle proteine mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS PAGE)

L'elettroforesi è eseguita secondo il metodo Laemmli (1970) con un apparato *mini-protean 3* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Soluzioni per la corsa elettroforetica
-Reservoir buffer stock: TRIS/Glicina (BioRad)

Soluzioni per la preparazione del gel (SDS-PAGE)
-Soluzione A: soluzione di acrilamide-bisacrilamide 30% (Sigma)
-Soluzione B: Trizma Base 7.28 g
TEMED 92 μl
Portata a pH 8.9 con HCl 1 M in 40 ml di H_2O distillata
-Soluzione C: Trizma Base 1.21 g
TEMED 92 μl
Portata a pH 6.9 con HCl 1 M in 20 ml di H_2O distillata
-Soluzione D: SDS 10%
-Soluzione E: Persolfato di ammonio 60 mg in 5 ml di H_2O distillata

Procedimento
La concentrazione di acrilamide da utilizzare nel resolving gel è stabilita in base al peso molecolare della proteina da esaminare; viene usato un gel resolving dal 7% al 15% a seconda del peso molecolare.
La soluzione preparata secondo il protocollo Sigma viene versata tra due lastre di vetro, costituenti il supporto del gel, montate su un apposito sostegno e viene lasciata polimerizzare a temperatura ambiente. Successivamente si prepara lo stacking gel (3%):
-2.76 ml di H_2O distillata
-0.4 ml di Soluzione A
-0.5 ml di soluzione C
-0.04 ml di Soluzione D
-0.3 ml di Soluzione E
La soluzione viene colata sopra il resolving gel e, dopo aver inserito un pettine nello spessore trai due vetri, viene lasciata polimerizzare a temperatura ambiente.
La camera elettroforetica viene riempita con tampone Reservoir 10x diluito 1:10 con H_2O distillata.
Una volta caricati i campioni (aliquota corrispondente a 10 μg di proteine) e gli standard di peso molecolare noto all'interno dei pozzetti, viene applicata agli elettrodi della camera elettroforetica una corrente pari a 30 mA costante in modo da consentire il passaggio e il compattamento delle proteine attraverso lo stacking gel. Una volta attraversato lo stacking gel, viene applicata una corrente di 100V costante permettendo la migrazione, in base al loro peso molecolare, delle proteine attraverso il resolving gel per un tratto di lunghezza di circa 9cm.

Trasferimento delle proteine su filtro di nitrocellulosa

Tamponi e soluzioni
-Tampone di trasferimento: TRIS/Glicina/metanolo (BioRad)
-Colorante: 0.5% di Rosso Ponceau in 10% di acido acetico (Sigma)

Procedimento

Il trasferimento delle proteine separate su gel di poliacrilamide è effettuato su filtro di nitrocellulosa, utilizzando un apparecchio BioRad con elettrodi a piastra.

Terminata l'elettroforesi, il gel ed un filtro di nitrocellulosa, di uguali dimensioni, vengono immersi nel tampone di trasferimento per equilibrarsi con esso. Su di un supporto di plastica vengono posizionati in sequenza: uno strato poroso, un foglio di carta 3MM (Whatman, Maidstone, Kent, UK), il gel, il filtro di nitrocellulosa, un secondo foglio di carta 3MM e un altro strato poroso. Il supporto di plastica viene chiuso ed immerso nella camera di trasferimento con il gel collocato sul lato dell'elettrodo negativo.

Si applica agli elettrodi della camera di trasferimento una corrente pari a 100 V costante per circa 90 minuti ad una temperatura di 4°C.

Al termine del trasferimento, il filtro viene colorato con il Rosso Ponceau 0.5% in acido acetico in modo da avere un controllo dell'efficienza del trasferimento.

Il filtro, quindi, viene sottoposto a decolorazione con NaOH 200 mM e a risciacquo con H_2O distillata; su di esso viene eseguito il saggio immunologico.

Saggio immunologico

Tamponi e soluzioni

-TBS 10x: TRIS 24.2 g
NaCl 80 g
Portato a pH 7.6 in 1l di H_2O distillata, all'uso è stato diluito 1:10 con H_2O distillata con l'aggiunta di Tween20 0.1%

-Soluzione di saturazione: TBS 1x + Tween20 0.1%
Albumina al 3%

-Soluzione per la reazione di chemioluminescenza: ECL_1 (H_2O_2, diluente)
ECL_2 (luminolo)
Mantenute in rapporto 1:1

-Restore Western Blot stripping buffer (Pierce, Chemical, Rockford, IL, USA)

Procedimento

Il filtro di nitrocellulosa viene lavato due volte per 10 minuti con TBS 1x + Tween20 0.1% e quindi incubato con lo stesso tampone contenente albumina al 3% per un'ora a temperatura ambiente.

Terminata l'incubazione, il filtro di nitrocellulosa viene nuovamente lavato per tre volte per 10 minuti con TBS 1x + Tween20 0.1% e incubato tutta la notte (over-night) con l'anticorpo primario (vedere tabella 1).

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, il filtro viene lavato due volte per 10 minuti con il tampone e incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario corrispondente (vedere tabella 1).

Si procede, dunque con altri tre lavaggi da 10 minuti e si prosegue con l'attivazione della reazione di chemioluminescenza (ECL, GH Healthcare, Little Chalfont, UK) aggiungendo, in una provetta contenente il filtro, la soluzione di reazione con la quale il filtro è tenuto a contatto per un minuto. Tale filtro è poi trasferito in una cassetta fotografica (Kodak).

Le lastre fotografiche (GH Healthcare) così ottenute, vengono esposte alla reazione di chemioluminescenza per un tempo compreso tra i 2 e i 4 minuti.

Le lastre impressionate vengono scannerizzate e analizzate con il programma ImageJ.

Il peso molecolare delle proteine è determinato confrontandolo con gli standard di pesi molecolari noti (SeeBlue plus 2, Invitrogen, Milano, Italia).

Tabella 1: Anticorpi primari e secondari utilizzati nel saggio immunologico

1.Invecchiamento

Anticorpo primario	Anticorpo secondario	Fattore di diluizione (anticorpo primario)
Anti-P-HMG-CoAR Anti-HMGCoAR (fornito dal Prof. Hardie, University of Dundee, UK)	Anti-sheep (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)	1:3000
Anti-HMG-CoAR (Upstate, Lake Placid, NY)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-P-ACC Anti-ACC (fornito dal Prof. Hardie,University of Dundee, UK)	Anti-sheep (Li-Cor Biosciences, Cambridge, UK)	1:5000
Anti-P-AMPKα Anti-AMPKα (Cell Signaling Technology, Denvers, MA)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-P-p38 Anti-p38 (Cell Signaling)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-PP2A (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-nSREBP2 (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-goat (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-nSREBP1 (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-SREBP2 (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-SREBP1 (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-LDLr (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-goat (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-Insig1 Anti-Insig2 (Southwestern Medical Center, University of Texas, Dallas, USA)	Anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-Caveolina1 (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:5000
Anti-P-IRS-1/2 (Santa Cruz biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-tubulina (MP Biomedicals, France)	Anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-actina (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000

2.Ipossia

Anticorpo primario	Anticorpo secondario	Fattore di diluizione (anticorpo primario)
Anti-HIF-1α (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-HMG-CoAR (Upstate)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-nSREBP2 (Abcam, Cambridge, UK)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-SCAP (Santa Cruz) Biotechnology	Anti-goat (Santa Cruz Biotechnology)	1:200
Anti-actina (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000

3.Sviluppo

Anticorpo primario	Anticorpo secondario	Fattore di diluizione (anticorpo primario)
Anti-HMG-CoAR (Upstate)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-nSREBP1 (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-SREBP2 (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-Insig1 Anti-Insig2 (Southwestern Medical Center, University of Texas, Dallas, USA)	Anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-P-IRS-1/2 (Santa Cruz biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-actina (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000

4.Differenziamento

Anticorpo primario	Anticorpo secondario	Fattore di diluizione (anticorpo primario)
Anti-nSREBP1 (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-HMG-CoAR (Upstate)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-Insig1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:3000
Anti-P-p38 Anti-p38 (Cell Signaling)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-tubulina (MP Biomedicals)	Anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-miogenina (Abcam)	Anti mouse- (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-MHC (Abcam)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
Anti-p21waf (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	1:200

Dosaggio dell'attività di HMG-CoAR mediante saggio radioisotopico

Il metodo radioisotopico utilizzato per la misurazione dell'attività di HMG-CoAR consiste nel valutare la formazione di ^{14}C-Mevalonato (MVA) prodotto dall'enzima a partire da 3-^{14}C-HMGCoA (attività specifica 57 mCi/mmol, GH Healthcare) secondo il metodo di Bruscalupi et al.(1985).

Il ^{14}C-MVA formato viene separato dal precursore, previa lattonizzazione in ambiente acido, utilizzando una cromatografia a scambio ionico su una colonna di resina del tipo AG1X8 (Biorad) in forma formiato (Edwards et al., 1979) che consente degli elevati recuperi (maggiori del 50%). ^{3}H-MVA lattone (attività specifica 24.0 Ci/mmol, GH Healthcare) è aggiunto come standard interno al saggio per valutare la percentuale di recupero del ^{14}C-MVA.

Tamponi e soluzioni

-Cofattori:	EDTA (sale disodico)	0.12 M
	NaCl	0.28 M
	NADP	0.12 M
	Glucosio-6-P	0.12 M
	Ditioteitrolo (DTT)	1.00 M

-Tampone HMG-CoAR

Procedimento

Il saggio enzimatico è eseguito su un'aliquota di lisato totale o di membrane o di microsomi contenente circa 100 µg di proteine.

Ogni campione è contenuto in una provetta nella quale vengono aggiunti: 50 µl di cofattori (20 mM glucosio-6-fosfato, 20 nM di NADP sale sodico, 10 U di glucosio-6-deidrogenasi), l'aliquota di lisato (corrispondente a 100 µg di proteine) ed il tampone HMG-CoAR (fino a 130 µl).

Si effettua una preincubazione per 7 minuti a 37°C avendo preventivamente bloccato ogni possibile reazione nei bianchi con l'aggiunta in essi di 20 µl di KOH 33%.

La reazione viene avviata aggiungendo ad ogni provetta 10 µl di 3-^{14}C-HMGCoA (20000 dpm/nmole; 10 nmoli, attività specifica 0.088 µCi/11.7 nmol).

La reazione viene bloccata dopo 20 minuti con 20 µl di KOH 33% e i campioni vengono mantenuti per 45 minuti a 37°C per permettere l'idrolisi del substrato.

Vengono, poi, aggiunti 50 µl di HCl (5 M) e 10 µl di ^{3}H-MVA (circa 10000dpm) come standard interno; si lascia lattonizzare il MVA a 37°C per 60 minuti o a temperatura ambiente over-night.

I campioni vengono centrifugati per 10 minuti a 14000rpm, al fine di far separare le proteine denaturate; si prelevano 200 µl di supernatante al quale vengono aggiunti 700 µl di H_2O distillata.

Il campione viene caricato su colonne (0.5 x 5 cm) di resina AG1X8 (Biorad) in forma formiato. Il ^{14}C-MVA viene eluito con 2 ml di H_2O distillata. Al ^{14}C-MVA eluito vengono aggiunti 10 ml di liquido di scintillazione Optifluor (CGWallack).

La radioattività ottenuta è letta per mezzo di un apparecchio a scintillazione liquida (Pakard).

I dati sono calcolati come attività specifica (pmoli/min/mg proteine).

Dosaggio di attività dell'AMPKα

L'attività dell'AMPK è stata determinata immunoprecipitando 75 μg di lisato da tessuto o da cellule HepG2 con anticorpi contro l'isoforma α1 e α2 dell'AMPK legati alla proteina G sefarosio e quantificata analizzando la fosforilazione di un peptide *target* (AMARA) secondo il metodo di Cheung et al. (2000).

Tamponi e soluzioni

-Immunoprecipitation Buffer:	Tris-HCl pH 7.4	50mM
	NaCl	150mM
	NaF	50mM
	Na pirofosfato	5mM
	EDTA	1mM
	EGTA	1mM

Da aggiungere prima dell'uso 1mM DTT, 0.1mM benzamidina, 0.1 mM PMSF, 5 μg/ml soyabean trypsin inhibitor, 1% v/v Triton X-100 (Sigma).

Hepes assay buffer:	Hepes pH7.0	50mM
	DTT	1mM
	Brij-35	0.02 %

AMARA Synthetic peptide substrate 1mM stock (200 μm finale)

AMP 1mM stock (200 μm finale)

ATP/Mg (1mM ATP contenente 25 mM MgCl2 (5mM finale) e 20 ul di ATP caldo più ATP freddo fino a 200 μm finale nel saggio)

Acido fosforico (1% v/v)

Procedimento

Si calcola il volume di Proteina G sefarosio (GE Healtcare) necessaria (5-10 μl per reazione di IP) e si effettuano 5 lavaggi in 1ml di *Immunoprecipitation (IP) buffer* (5x 0.5 minuti 13.200 rpm).

Si procede quindi all'aggiunta dell'anticorpo anti AMPK (2 μg per μl di proteina G) e si aggiusta il volume di soluzione di proteina G in modo che le biglie costituiscano il 25% del totale. Si favorisce quindi il legame della proteina G all'anticorpo per 1 ora (o *over-night*) a 4°C sotto agitazione. Si procede quindi al lavaggio della proteina G 5 volte con IP buffer e 3 volte con IP buffer a cui è stato aggiunto NaCl 1M. Si aggiunge quindi il lisato (75 μg) e si aggiusta il volume in modo tale che le biglie costituiscano il 20% del totale

Si favorisce il legame dell'AMPK alla proteina G per 2 ore a 4°C.

Si procede quindi al lavaggio della proteina G in 400 μl di IP buffer+1M NaCl per 4 volte, poi 4 volte in IP buffer e 1 volta in 250 μl di Hepes buffer.

Si risospende quindi la proteina G in 320 μl di Hepes buffer e si al quota la proteina G, prendendo 100 μl in 3 provette differenti. Si Centrifuga la proteina G a 13000rpm e si rimuovono 80 μl di supernatante. Si procede quindi al saggio.

Si preparano 2 mix di ATP:

Mix1

-1mM ^{32}P-ATP/$MgCl_2$ (200 μM ATP/5 mM di $MgCl_2$ finali nel saggio)

-1mM del substrato peptidico AMARA (200 μM nel saggio)

-1mM AMP

Mix2

-1mM ^{32}P-ATP/$MgCl_2$ (200 μM ATP/5 mM di $MgCl_2$ finali nel saggio)

-Hepes buffer

-1mM AMP

Il volume dipendende dal numero di saggi. Ad esempio per 30 saggi (20 in presenza di AMARA, 10 in assenza) sono necessari 600 μl di mix 1 e 300 μl di mix 2. Sono necessari 30 μl di ATP mix per ogni provetta.

Si da inizio alla reazione aggiungendo la mix di ATP ai 20 μl di immunoprecipitato ad intervalli di 15-20 secondi ed incubando in un agitatore orbitalico a 30°C per 10-20 minuti.

Si interrompe la reazione ad intervalli di 15-20 minuti rimuovendo 20 μl di campione e pipettandolo in quadrati di carta fosfocellulosa P81 (Whatman). Una volta che la goccia è stata assorbita dal quadrato di fosfocellulosa, si pone in un beaker contenente 500 ml acido fosforico 1% per fermare la reazione.

Una volta fermata la reazione, si procede all'agitazione dei quadrati nel beaker per 5 minuti a temperatura ambiente. Si svuota il beaker e si lava ancora con 200-400 ml di acido fosforico per 2 minuti.

Si fanno quindi seccare i quadrati e si legge la radioattività di ogni quadratino allo scintillatore insieme ad uno standard di ATP (5 µl sulla carta da filtro)

L'attività viene espressa in unità per mg di proteina (U/mg prot.) utilizzando la seguente equazione:

U=(cpm campione-cpm background) x (1/ cpm ATP standard) x (50 µl /20 µl vol) x 3

dove 50 µl rappresentano il volume del saggio;

20 µl rappresentano il volume del campione posto su ogni quadrato

3 perché ogni campione immunoprecipitato è stato diviso in 3 provette.

Dosaggio delle specie ROS

Soluzioni e reagenti

-PBS
-Diclorodiidrofluoresceina diacetato (H_2DCFDA) 10 μM

Procedimento

L'omogenato di fegato di ratti o cellule HepG2 risospese in sono stati saggiati per i livelli di ROS incubando 2×10^6 cellule o 2 mg di proteina (nel caso degli omogenati) con diclorodiidrofluoresceinafluoresceina diacetato 10 μM (H_2DCFDA, Molecular probes, Eugene, OR, USA) per 30 minuti a 37°C al buio.

La fluorescenza è stata misurata sotto leggera agitazione magnetica a 37°C tramite il fluorimetro Perkin Elmer LS-50B (Waltham, MA, USA). La lunghezza d'onda di eccitazione era regolata a 498 nm mentre la lunghezza d'onda di emissione era fissata a 530 nm. Le fessure per il passaggio della luce venivano fissate a 5 e 10 nm per i due cammini ottici. La misurazione è stata effettuata su 10 μl sia di cellule o di proteine in 3 ml di PBS in una cuvetta di quarzo. La lettura dei valori basali di fluorescenza è stata effettuata per almeno 5 minuti.

Ad i campioni di cellule HepG2 sono stati aggiunti concentrazioni crescenti di H_2O_2 a partire da 30 μM fino a 600 μM. Ad i campioni di fegato è stato aggiunto solfato ferroso 10 μM, per mettere in evidenza le specie perossidate (reazione di Fenton). I valori di fluorescenza sono stati registrati dopo 15 minuti dall'aggiunta di solfato ferroso.

Quantificazione dei livelli di mRNA

I livelli di mRNA del gene dell'HMG-CoAr e del LDLr sono stati ottenuti mediante real time RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction). L'RNA totale da 50 mg di fegato di ratto è stato isolato con l'utilizzo del TRI-Reagent (Mol. Res. Centre Inc., Cincinnati, OH).

Il tessuto è stato omogenato in 0.25 ml di NaCl 0.9% w/v, sono stati successivamente aggiunti 0.75 ml di TRI-Reagent e 0.2 ml di cloroformio. I campioni sono stati agitati e centrifugati e l'RNA presente nella fase acquosa è stato precipitato con l'aggiunta di 0.5 ml di isopropanolo.

Il pellet di RNA è stato quindi lavato una volta con 1 ml di etanolo 75% v/v, fatto essiccare, risospeso in acqua sterile e quantificato mediante lettura allo spettrofotometro.

20 μg di RNA è stato usato per la reazione trascrittasica inversa svolta in 20 μl di volume finale a 41°C per 60 minuti, utilizzando 30 pmoli di primer antisenso (Tabella 2), per le analisi del gene dell'HMG-CoAR, LDLr e β-actina. La β-actina di ratto è stata utilizzata come standard interno.

La reazione di Real-Time PCR si è svolta in 25 μl di volume finale contenente 2 μl di cDNA, la master mix contenente SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix BioRad) e i primer senso ed antisenso per ogni gene in esame. Ogni gene è stato analizzato in provette separate.

La reazione di Real-time PCR è stata effettuata in un apparato iCycler Thermal Cycler System (Biorad) utilizzando i seguenti parametri: 1 ciclo a 95°C per 1.5 minuti, seguito da 45 cicli a 94°C per 10 secondi, a 55°C per 10 secondi e 72°C per 30 secondi e un passaggio successivo di "melting" a 55-95°C con un tasso di aumento di temperatura di 0.5 °C per ciclo per 80 cicli.

I prodotti di PCR sono stati quantificati con una curva di calibrazione esterna per ogni gene in esame, ottenuta con diluizioni seriali di quantità note di molecole (10^2 -10^7 molecole).

Tutti i risultati sono stati normalizzati divendoli per i risulati ottenuti per la β-actina, usata come controllo interno per ogni campione. La specificità dei prodotti di PCR di ogni gene testato è stata confermata mediante elettroforesi.

Tabella 2: Sequenze dei primer utilizzati per la reazione di PCR

Gene	Primer
HMG-CoAR	Sense 5'-GCTTGAGCATCCTGACATAC-3' Antisense 5'-GAACCATAGTTCCCACGTCT-3'
LDLr	Sense 5'-CGAGTTCCAGTGTAGAGACG-3' Antisense 5'-GGGAGCAGTCTAGTTCATCC-3'
β-actina	Sense 5'-GCCTCTGGTCGTACCACTGGC-3' Antisense 5'-AGGGAGGAAGAGGATGCGGCA-3'

Coimmunoprecipitazione dell'HMG-CoAR con PP2A e AMPKα

Tamponi e soluzioni

Buffer di lisi:	Tris-HCl pH7.5	10mM
	EDTA	1mM
	EGTA	0.5mM
	NaCl	10mM
	Triton X-100	1%v/v
	Na-colato	1%w/v

Da aggiungere all'uso inibitori delle protease e fosfatasi (0.5mM PMSF, 1μg/ml leupeptina, 5μg/ml aprotinina, 50 mM NaF).

Sample buffer 1X

Procedimento

Per analizzare l'associazione della subunità catalitica della PP2A e dell'AMPK, 100 μg di lisato di cellule HepG2 o 5 mg di lisato di tessuto epatico in 50 μl di buffer di lisi, sono stati centrifugati ed immunoprecipitati con il TrueBlot™ (eBioscience), che riconosce la forma nativa dei ponti disolfuro delle IgG di topo o coniglio riducendo l'interferenza delle catene pesanti di 55kDa o leggere 23kDa dell'anticorpo utilizzato per l'immunoprecipitazione.

Dopo la stimolazione 100 μg di lisato cellulare o di fegato sono stati incubati con 10 μl di anticorpo anti-HMG-CoAR (Upstate). I lisati e l'anticorpo sono stati incubati a 4°C per 1 ora e sono stati quindi aggiunti 20 μl di biglie anti-rabbit IgG (eBioscience, San Diego, CA, USA) ed incubati 1 ora a 4°C. I campioni sono stati quindi centrifugati a 10000g per 5 minuti ed è stato rimosso il supernatante, mentre le biglie (pellet) sono state lavate 3 volte con 100 μl di buffer di lisi.

Sono, quindi, stati aggiunti ai campioni 20 μl di Sample buffer contenente 50 mM di DTTe bolliti a 100°C per 5 minuti. I campioni sono poi sottoposti a Western Blot in accordo con il protocollo precedentemente riportato. La nitrocellulosa è stata saturata con latte non grasso (BioRad) in TBS 1x + Tween20 0.1% ed incubato con anticorpo anti PP2A (Santa Cruz), anti P-AMPKα, anti AMPKα (Cell Signaling) e anti HMG-CoAR (Upstate). Si procede quindi allo sviluppo della lastra in accordo al protocollo del Western Blot.

Dosaggio dei livelli plasmatici di colesterolo

Al momento del sacrificio, dagli animali è stato prelevato un campione di sangue periferico e su questo è stato saggiato il quadro lipemico (livelli plasmatici di colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL e trigliceridi). Il sangue è stato raccolto in EDTA (0.4 mg/ml di sangue) ed il plasma è stato separato tramite centrifugazione. L'analisi del colesterolo plasmatico totale e delle lipoproteine ad esso associate è stata eseguita usando kit diagnostici per il colesterolo totale, colesterolo HDL e colesterolo LDL (Sigma).

Saggio di degradazione *in vitro*

La degradazione dell'HMG-CoAR *in vitro* è valutata su lisati di cellule HepG2, preparati come precedentemente descritto e risospesi nel tampone di degradazione.

Tamponi e soluzioni

– Tampone per la degradazione:	TRIS-HCl	10 mM pH 7.4
	Saccarosio	150 mM

-Sample Buffer 2x

Procedimento

20 µl di lisato di cellule HepG2, trattate con $CoCl_2$ (100 µM) per 20 ore, vengono trasferiti in apposite eppendorf e messi ad incubare a 37°C per vari tempi (da 0 a 24 ore).

A tempi stabiliti, l'incubazione viene bloccata aggiungendo un volume di Sample Buffer 2x uguale a quello dei campioni in modo da raggiungere una concentrazione finale di 0.125 M di TRIS-HCl (pH 6.8), 10% SDS.

I campioni vengono, infine, bolliti per 2 minuti previa aggiunta del 10% v/v di miscela di BMG (0.1% di Blu di bromofenolo/β mercapto-etanolo/glicerolo in rapporto 2:2:5). I livelli della reduttasi sono saggiati mediante Western Blot.

Trasfezione

Plasmide utilizzato

Negli esperimenti di trasfezione transiente effettuati nelle cellule HepG2 si utilizza un plasmide contenente il gene reporter pHMG-CoAR-luciferasi (fornito gentilmente dal Prof. Demoulin, Universitè Catholique de Lowain), vettore di espressione costituito dal promotore del gene di HMG-CoAR coniugato con il gene della luciferasi.

Amplificazione e purificazione del plasmide

Il plasmide utilizzato per le procedure di trasfezione transiente è amplificato in batteri *E. coli* DH5α; le procedure sperimentali per la manipolazione del DNA quali elettroforesi su gel di agarosio, preparazione delle cellule competenti, trasformazione batterica e preparazione di plasmidi sono state descritte da Sambrook e collaboratori (1989).

Preparazione del DNA plasmidico con il metodo della lisi alcalina

Una singola colonia del clone ricombinante di interesse viene prelevata con uno stecchino di legno sterile, inoculata in 4 ml di terreno di coltura "L-Broth" (contenente Ampicillina 50 µg/ml) in un tubo da 10 ml e incubata per circa 16 ore a 37°C. Avvenuta la crescita, i batteri sono centrifugati per 15 minuti a 3000 rpm ed il precipitato risospeso in 150 µl di una soluzione contenente saccarosio 20%, EDTA 50 mM (pH 8) e Tris-HCl 50 mM (pH 8) e trasferito in una provetta eppendorf. Si aggiungono, quindi, 350 ml di NaOH 0.2 M e SDS 1% per provocare la lisi batterica e si lascia in ghiaccio per 7 minuti. Dopo la lisi si aggiungono 250 µl di K-acetato 3M (pH 4.8) per neutralizzare la soda e far precipitare l'SDS; dopo 15 minuti in ghiaccio, si centrifuga a 14000 rpm per eliminare i residui batterici e l'SDS. Il supernatante è prelevato e ad esso si aggiunge un uguale volume di isopropanolo freddo, dopo aver mescolato bene si centrifuga 10 minuti a 14000 rpm per far precipitare il DNA. Il DNA è lavato con 1 ml di etanolo 80%, liofilizzato e risospeso in H_2O. Al termine il DNA è incubato con RNAsi (1 µg/ml) al fine di frammentare l'RNA contaminante.

Come controllo, il DNA estratto è digerito con l'enzima di restrizione *EcoRI* (Sigma). La presenza dell'inserto nel DNA plasmidico è verificata tramite separazione elettroforetica dei prodotti della digestione enzimatica su gel di agarosio 1%.

Trasfezione transiente

Per gli esperimenti di trasfezione vengono usate cellule HepG2 in RPMI senza rosso fenolo ed in assenza di siero. Al terreno si aggiunge la miscela di trasfezione, preparata con 0.250 µg di plasmide/ml di terreno e 12 µl di *Lipofectamine Reagent* (Invitrogen)/ml di terreno; la quantità di plasmide è quella che, nella curva dose-risposta, si è dimostrata avere la massima efficienza. Le cellule vengono lasciate 6 ore a contatto con la miscela, dopo di che il terreno viene cambiato e le cellule lasciate per 24 ore in RPMI senza rosso fenolo addizionato con il 10% di siero fetale bovino.

Saggio della luciferasi

Per il saggio della luciferasi, cellule HepG2 vengono trasferite dalle fiasche a piastre da sei pozzetti, vengono fatte crescere fino a raggiungere il 50% di confluenza a tenute per 24 ore in RPMI senza rosso fenolo addizionato con il 10% di siero fetale bovino. Successivamente sono vengono trasfettate con il plasmide e con il terreno privo di siero fetale bovino; dopo 6 ore il mezzo viene sostituito con terreno completo e dopo 24 ore le cellule sono stimolate con $CoCl_2$ in presenza o in assenza di YC-1. La procedura e la misurazione dell'espressione del gene della luciferasi sono compiute utilizzando il kit *Luciferasi* e seguendo le istruzioni della ditta produttrice (Promega Italia, Milano) tramite lettura al luminometro Berthold Wallack (Perkin-Elmer, Italia). L'attività della luciferasi (RLU) è normalizzata rispetto ai mg di proteina valutati con il metodo Bradford (Biorad).

Analisi delle proteine prenilate

Tamponi e soluzioni

-PBS
-Acetone freddo
-Cloroformio:Metanolo 2:1 (v/v)
-Etanolo 95%
-PMSF 1mM
-Sample Buffer 1x

Procedimento

A tre ore dal termine della stimolazione, alle cellule è stata aggiunta mevinolina (30 μM) e ^{3}H-mevalonato (3 μCi), per valutare l'incorporazione di mevalonato radioattivo nelle proteine prenilate. Dopo le varie stmolazioni, le cellule sono state lavate 2 volte con 2 ml di PBS freddo e poi staccate con 0,5 ml di tripsina che è stata neutralizzata con 0,5 ml di terreno. I campioni sono stati centrifugati per 1 minuto a 14.000 rpm e i pellet, privati di ogni residuo di terreno o tripsina, sono stati risospesi ed omogenati in 100 μl di PBS. Sono state quindi omogenate le proteine con 1ml di acetone freddo per 30 minuti. Si è proceduto alla delipidazione del campione lavando il pellet per 3 volte con acetone freddo (1ml), 3 volte con la miscela cloroformio:metanolo (1ml) ed infine 2 volte con etanolo (1ml). I campioni sono stati quindi solubilizzati in Sample buffer. È stata prelevata un'aliquota per il dosaggio delle proteine mentre alla parte restante sono stati aggiunti 10 ml di liquido di scintillazione Optifluor (CGWallack).

La radioattività ottenuta è letta per mezzo di un apparecchio a scintillazione liquida (Pakard).

I dati sono calcolati come dpm/mg proteine.

Dosaggio del colesterolo mediante Cromatografia su strato sottile (TLC)

Tamponi e soluzioni

-PBS
- Cloroformio:Metanolo:Acqua 4:2:1
-Etere di etilico
-Etere di petrolio:Etere dietilico:Acido acetico75:25:1

Procedimento

Dopo le varie stmolazioni, le cellule sono state lavate 2 volte con 2 ml di PBS freddo e poi staccate con 0,5 ml di tripsina che è stata neutralizzata con 0,5 ml di terreno. I campioni sono stati centrifugati per 1 minuto a 14.000 rpm e i pellet, privati di ogni residuo di terreno o tripsina, sono stati omogenati in una miscela cloroformio:metanolo:acqua distillata in rapporto 4:2:1. L'omogenato veniva agitato per due minuti su un agitatore per provette e quindi lasciato riposare per 15 minuti a temperatura ambiente.

Successivamente i campioni venivano centrifugati per 10 minuti a 600g, velocità che permetteva la formazione di tre fasi: una superiore di metanolo e acqua, una intermedia di proteine ed una inferiore di cloroformio e lipidi. La fase inferiore veniva trasferita in nuove provette e portata a secco in atmosfera di azoto.

I campioni venivano nuovamente sciolti in 100 µl di etere dietilico e caricati su una lastra di gel di silice (60Å, 20x20) per cromatografia su strato sottile (Whatman), precedentemente attivata per un'ora a 100°C.

I lipidi venivano separati in una camera cromatografica satura contenente etere di petrolio:etere dietilico:acido acetico in rapporto 75:25:1. Le bande erano evidenziate con vapori di iodio e comparate con lo standard (colesterolo).

Analisi statistica dei dati

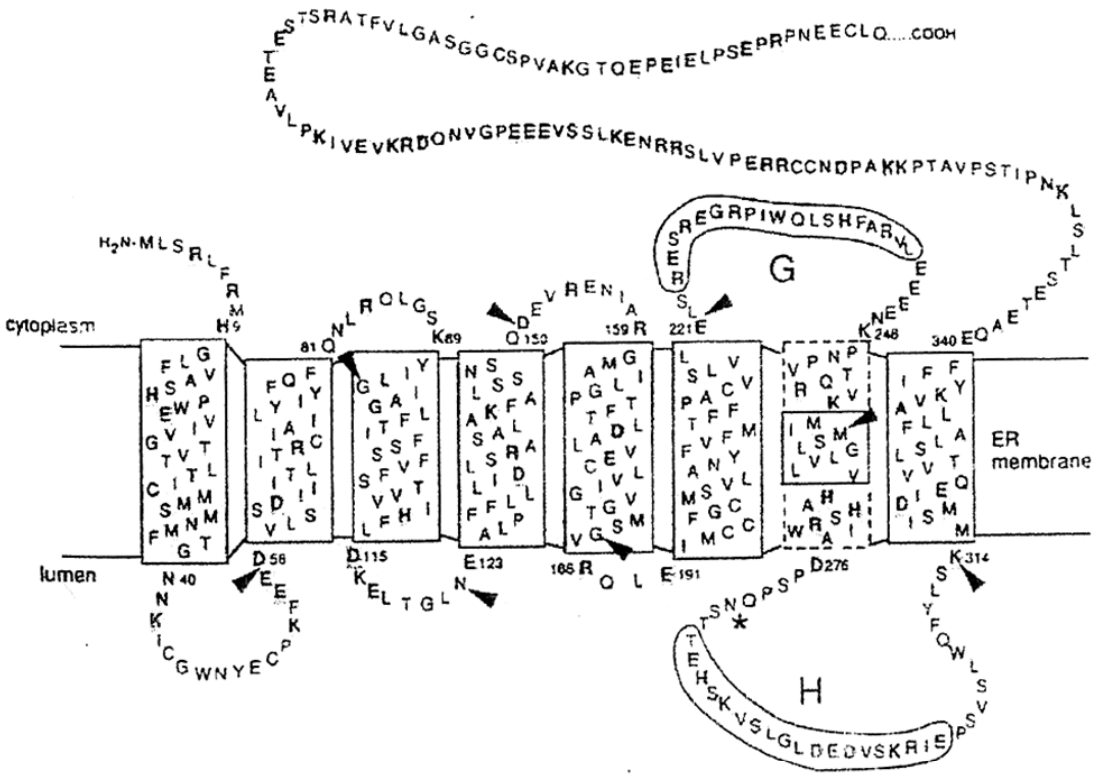
L'analisi statistica è effettuata mediante il programma GraphPAD InStat 3 utilizzando il metodo ANOVA per il calcolo della varianza ed il test di Tukey.

[1]HMG-CoAR

1.1 Struttura dell'HMG-CoAR

L'enzima HMG-CoAR umana è una glicoproteina formata da 888 amminoacidi, del peso di 97 kDa, che attraversa otto volte la membrana del reticolo endoplasmatico liscio (Istvan and Deisenhofer, 2000) (figura 3). Tale enzima è costituito da un dominio NH_2-terminale, di 339 amminoacidi, che include le otto regioni transmembrana; un dominio COOH-terminale in cui è situata l'attività catalitica, che si proietta nel citoplasma (residui 460-888); una regione di collegamento (regione linker, amminoacidi 340-459), che connette i due domini (Roitelman et al., 1992).

Fig.3 ***Modello proposto per la possibile struttura ed orientamento nel reticolo endoplasmatico della porzione transmembrana dell'HMG-CoAR (Roitelman et al., 1992).***



Il dominio NH_2-terminale àncora la proteina alla membrana del reticolo endoplasmatico (Liscum et al., 1983) tramite le sue otto regioni transmembrana idrofobiche ricche di residui di cisteina (Roitelman et al., 1992). Questo dominio di membrana contiene un segmento di 167 residui amminoacidici, chiamato dominio sensibile agli steroli (*sterol sensig domain*, SSD), che possiede approssimativamente il 25% di identità di sequenza con regioni di membrana di altre proteine che sono influenzate dal colesterolo (Brown and Goldstein, 1999). Tale dominio è responsabile della degradazione accelerata dell'enzima, in risposta ad un incremento della concentrazione di ossisteroli (Gil et al., 1985). La porzione idrofilica tra la settima e l'ottava regione transmembrana, contiene la sequenza Asn-Ser-Thr, che si proietta nel lume del reticolo endoplasmatico e viene glicosilata da una catena di mannosio (Roitelman et al., 1992).

La porzione catalitica dell' HMG-CoAR umana (residui 460-888), è relativamente idrofilica e può essere rilasciata dalla membrana, sotto forma di un frammento solubile di 53kDa, da un taglio proteolitico (Liscum et al., 1983). Recentemente, è stato descritto il sito catalitico della reduttasi (Istvan et al., 2000). Tale dominio forma un tetramero, in cui ogni singolo monomero si avvolge intorno all'altro in maniera complessa. I monomeri sono arrangiati in due dimeri (chiamati "1" e "2"), ognuno dei quali possiede due siti attivi. Entrambi i monomeri (chiamati "α" e "β"), con i loro residui partecipano alla formazione dei siti attivi. Il monomero reduttasi è formato da tre domini: un dominio ad elica N-terminale (N-domain), un dominio più grande ("Large domain" o L-domain), la cui architettura ricorda un prisma con 27 residui disposti ad α-elica formanti l'elemento centrale della struttura, e un dominio piccolo ("Small domain" o S-domain) che è inserito nel L-domain. Il sito di legame dell'HMG-CoA è localizzato nel L-domain, mentre il NADPH lega principalmente l'S-domain. In particolare, il sito di legame dell'HMG-CoA, contiene

un inusuale motivo strutturale (residui 682-694), definito *cis-lo*op, che permette un appropriato posizionamento di alcuni residui amminoacidici (Ser684, Asp690, Lys691 e Lys692), in grado di legare l'HMG-CoA.

L'esistenza di grandi regioni di contatto tra i monomeri e la presenza di residui amminoacidici sulle interfacce tipici delle interazioni proteina-proteina, fanno ipotizzare che anche *in vivo* possa esistere tale arrangiamento tetramerico del sito catalitico (Istvan and Deisenhofer, 2000).

Le statine, potenti inibitori dell' HMG-CoAR, ampiamente utilizzate nel trattamento farmacologico dell'ipercolesterolemia, hanno una componente strutturale che è molto simile alla porzione HMG dell' HMG-CoA. In relazione alla presenza del motivo HMG-like, tutte le statine agiscono da inibitori competitivi dell'enzima rispetto al legame dell' HMG-CoA , ma non del NADPH (Istvan, 2002).

Nei procarioti l'architettura del sito attivo dell'enzima si presenta in modo abbastanza differente; e a questo viene attribuita l'inefficacia degli inibitori dell'enzima umano su quello batterico (Istvan et al., 2000).

Il promotore del gene dell' HMG-CoAR di mammifero manca della caratteristica TATA box e CCAAT box: è ricco di residui G e C (65%) e contiene sequenze ripetute omologhe alle ripetizioni di 21 bp del promotore di SV40 (Reynolds et al., 1984). Vari studi su cellule di ovaio di criceto cinese (CHO) hanno mostrato che la reduttasi è trascritta a partire da un promotore regolato dal colesterolo e si genera un insieme eterogeneo di mRNA con regioni 5' non tradotte che vanno da 68 a 670 nucleotidi di lunghezza. La sintesi di queste molecole indica, quindi, siti multipli di inizio della trascrizione. Anche la reduttasi umana mostra questa serie complessa di siti inizianti la trascrizione (Chen and Shapiro, 1990).

1.2 Regolazione dell'HMG-CoAR

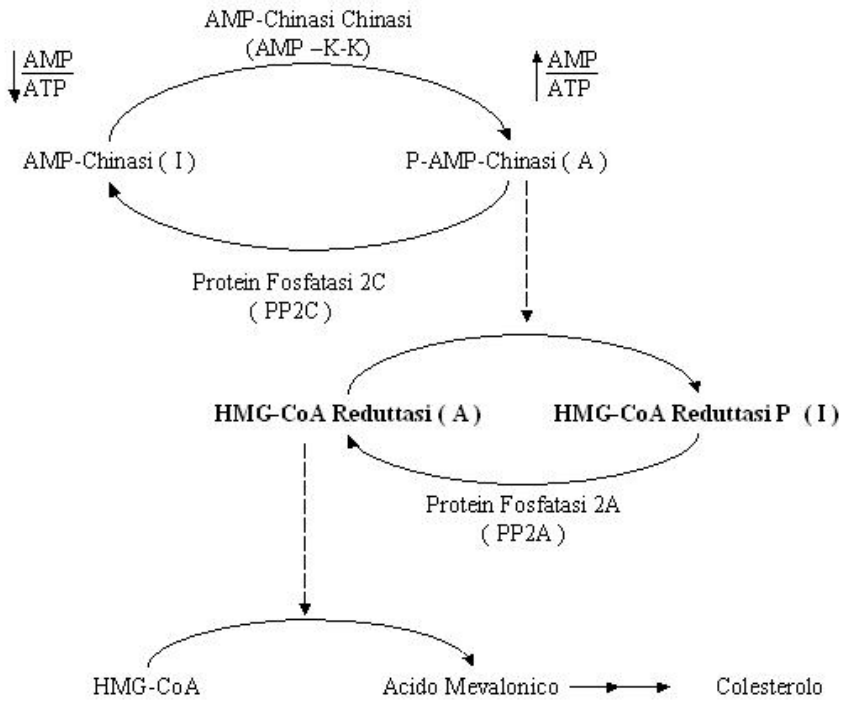
1.2.1 Regolazione dell'attività del sito catalitico

Il sito catalitico dell'HMG-CoAR può essere regolato in diversi modi, tra i quali assume particolare importanza la regolazione da fosforilazione/defosforilazione.

La possibilità che l'efficienza catalitica dell' HMG-CoAR potesse essere regolata da un meccanismo di fosforilazione/defosforilazione fu avanzata per la prima volta da Beg et al. (1973); egli, infatti, riportò che l'incubazione con Mg^{2+}, ATP, e una frazione citosolica inibiva rapidamente l'attività dell'enzima (*in vitro*).

Fisologicamente la reduttasi è attiva quando si trova in forma defosforilata, mentre diviene inattiva quando è soggetta a fosforilazione. Nel ratto adulto, circa il 30% della quantità totale dell'enzima è presente in forma defosforilata, quindi in forma attiva. L'HMG-CoAR viene fosforilata sulla serina 871 e quindi inattivata, da una protein chinasi AMP dipendente (AMPK) (Ingebritsen, 1983; Parker et al., 1989; Clarke and Hardie, 1990; Hardie, 1992; Omkumar et al., 1994) (figura 4).

Fig.4 ***Schema di modulazione dell'attività dell'HMG-CoAR (Serra et al., 1990 modificata).***



L'AMPK è un eterotrimero costituito da una subunità catalitica (α) e due subunità non catalitiche (β e γ) (Mitchelhill et al., 1994; Dyck et al.,1996; Stapleton et al., 1996). Tale enzima è importante per la risposta delle cellule agli stress metabolici: l'attivazione dell'AMPK, determinata dall'incremento cellulare dell'AMP e quindi una diminuzione di ATP, provoca rapidi cambiamenti nella velocità di trasporto del glucosio, nell'ossidazione degli acidi grassi, nella lipogenesi, nella sintesi degli steroli e nella gluconeogenesi, che hanno lo scopo di mantenere un'adeguata concentrazione di ATP (Hardie et al., 1997). Sia la subunità α che β sono soggette a modificazioni post-traduzionali. Il sito di fosforilazione meglio caratterizzato sulla subunità α è la Thr172, un residuo localizzato sul *loop* di attivazione "T" di un largo lobo della struttura della chinasi. Per l'attivazione dell'AMPK è richiesta la fosforilazione di questo residuo da parte di una o più AMPKK, identificate come LKB1 o CAMKKβ, in grado di fosforilare l'AMPK nelle cellule intatte ed *in vivo* (Hardie et al., 2006); la mutazione della Thr, sito di fosforilazione, in Ala comporta l'inattivazione della subunità catalitica (Dyck et al., 1996;).

La mutazione della reduttasi nella Ser871 in Ala la rende non più suscettibile all'inattivazione da deplezione di ATP, ma mantiene la regolazione a feedback. Inoltre, l'enzima mutante mostra una normale accelerazione del suo grado di degradazione dopo l'aggiunta di steroli (Sato et al., 1993).

La defosforilazione ossia l'attivazione dell' HMG-CoAR è operata dalla protein fosfatasi-2A (PP2A) (Ching et al., 1997; Gaussin et al., 1997). La PP2A fa parte di una famiglia più ampia di protein fosfatasi fosfoserina/treonina specifiche, presenti in tutte le cellule eucariotiche, in cui svolgono un ruolo cruciale nella regolazione di un ampio spettro di funzioni cellulari tra cui il ciclo cellulare, la trasduzione del segnale e l'apoptosi (Wera and Hemmings, 1995; Lechward et al., 2001). L'incubazione di epatociti con acido ocadaico, un potente inibitore della PP1 e della PP2A (Cohen et al., 1990), inattiva completamente l'HMG-CoAR in pochi minuti (Zammit and Caldwell, 1990). La PP2A, tuttavia, rende conto della maggior parte dell'attività di defosforilazione della reduttasi, in quanto la PP1 rappresenta solo una piccola percentuale delle fosfatasi dell'enzima in estratti di fegato. L'attività di defosforilazione sull' HMG-CoAR è operata da due forme della PP2A: PP2A-1 e PP2A-2 (Gaussin et al., 1997).

Un altro possibile meccanismo coinvolto nella regolazione dell'efficienza catalitica dell'HMG-CoAR potrebbe interessare lo stato redox dei gruppi tiolici dell'enzima. È stato osservato, infatti, che il potenziale redox dei gruppi tiolici è strettamente correlato al rapporto cellulare di glutatione ridotto e ossidato (Cappel and Gilbert, 1993).

1.2.2. Regolazione trascrizionale

I livelli di mRNA di HMG-CoAR possono subire delle variazioni in funzione degli incrementi o delle riduzioni del colesterolo all'interno della cellula; tali effetti sono mediati dall'attività delle SREBP (sterol regulatory element binding proteins). Queste proteine appartengono alla famiglia dei fattori trascrizionali bHLH-LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper) e sono sintetizzati come precursori inattivi di 1150 aminoacidi associati alla membrana del reticolo endoplasmatico (Hua et al., 1995). Le cellule di mammifero producono tre isoforme chiamate SREBP1a,

SREBP1c, prodotte dallo stesso gene, e SREBP2 (Brown and Goldstein, 1997). Le SREBP sono organizzate in tre domini: un dominio N-terminale di circa 480 aminoacidi che contiene la regione di transattivazione e quella bHLH-LZ necessaria per il legame al DNA e la dimerizzazione; due regioni transmembrana interrotte da un'ansa che si proietta nel lume del reticolo; infine, un dominio regolatorio C-terminale di circa 590 residui (Eberlè et al., 2004; Goldstein et al., 2006).

Le SREBP, quando sono localizzate nel reticolo endoplasmatico, formano un complesso con la proteina SCAP (SREBP cleavage activating protein), costituita da un dominio transmembranario N-terminale dotato di otto eliche, contenente un dominio SSD (eliche 2-6), e da un dominio C-terminale (Nohturfft et al., 1998).

In assenza di colesterolo, SCAP media il passaggio del complesso SCAP/SREBP dal reticolo endoplasmatico all'apparato del Golgi attraverso l'interazione con proteine vescicolari (proteine COPII) (Nohturfft et al., 2000; Espenshade et al., 2002; Sun et al., 2005) (figura 5). Una volta raggiunto l'apparato del Golgi, due distinte proteasi, S1P e S2P (site 1 protease, site 2 protease), tagliano in modo sequenziale SREBP rilasciando la regione N-terminale (nSREBP, nuclear SREBP) (Wang et al., 1994; Sakai et al., 1998); successivamente la nSREBP raggiunge il nucleo dove si legherà a sequenze specifiche sul DNA (SRE, sterol regulatory element, box-E) favorendo l'espressione di geni bersaglio importanti nella sintesi del colesterolo e degli acidi grassi, tra cui HMG-CoAR ed il recettore per le LDL (Eberlè et al., 2004).

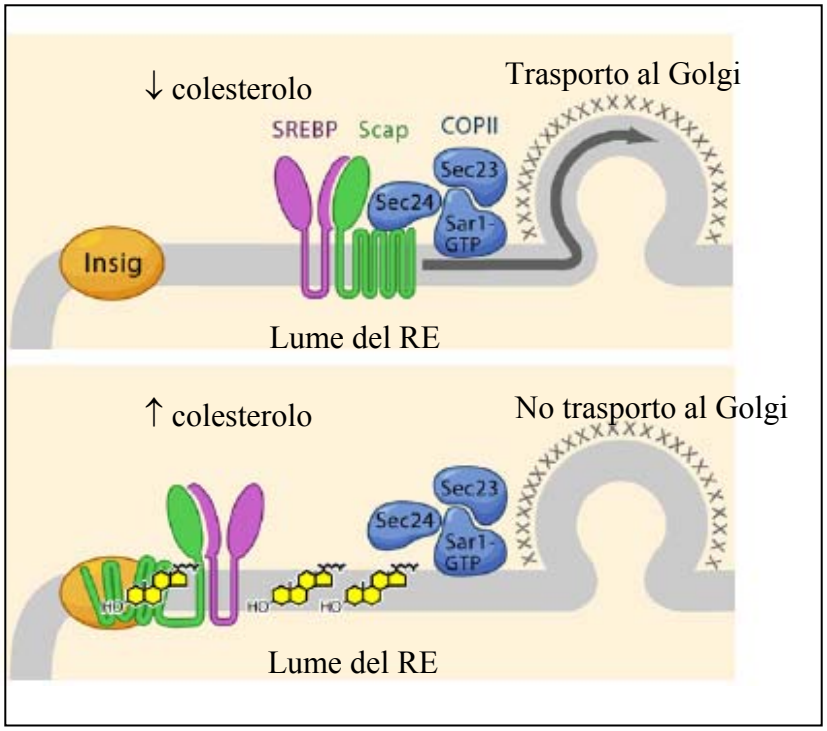
In seguito ad incrementi del colesterolo nella cellula, il legame tra lo SSD di SCAP e lo sterolo induce un cambiamento conformazionale della proteina causando due eventi: il blocco del trasporto nel Golgi del complesso ed il legame con un'altra proteina di membrana chiamata Insig (insulin induced gene), la quale favorisce la ritenzione del complesso SCAP/SREBP nel reticolo (figura 5). Nell'uomo esistono due forme delle proteine Insig (Insig1 e Insig2), entrambe in grado di legare SCAP; sembra che le Insig aumentino la risposta al colesterolo favorendo il legame di quest'ultimo con SCAP (Goldstein et al., 2006). Come vedremo nel prossimo paragrafo, le proteine Insig svolgono un'ulteriore funzione nella regolazione di HMG-CoAR, ossia quella di favorire la sua degradazione in seguito ad aumento di steroli nella cellula.

1.2.3 Regolazione della degradazione

Il livello proteico di HMG-CoAR può essere determinato anche da variazioni della sua degradazione. Nelle cellule prive di steroli, l'enzima viene degradato molto lentamente con un'emivita superiore alle 12 ore; quando gli steroli o altri isoprenoidi si accumulano, la degradazione risulta accelerata con una riduzione dell'emivita inferiore ad un'ora (Goldstein et al., 2006). Essendo una proteina del reticolo endoplasmatico, la reduttasi viene degradata secondo il meccanismo ubiquitina-mediato, definito ERAD (endoplasmic reticulum-associated protein degradation) (Meusser et al., 2005).

Il meccanismo della degradazione sterolo-dipendente di HMG-CoAR è mediato dalle proteine Insig (Sever et al., 2003b) (figura 6); studi effettuati *in vitro* hanno mostrato che il lanosterolo, un precursore del colesterolo, è un potente induttore della degradazione (Song et al., 2005).

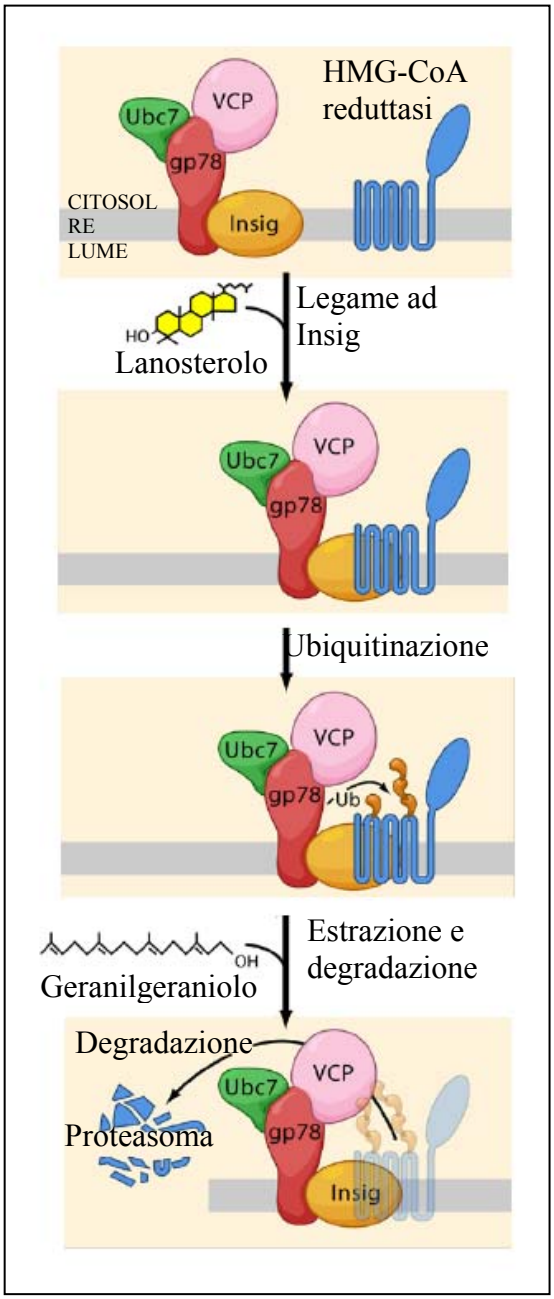
Fig.5 ***Regolazione del trasporto di SREBP/SCAP mediata da Insig (Goldstein et al., 2006 modificata)***



Quando il lanosterolo si accumula nelle membrane del reticolo endoplasmatico, sia Insig1 che Insig2 possono legarsi a HMG-CoAR attraverso lo SSD; questo legame favorisce l'ubiquitinazione dell'enzima a livello di residui di lisina (89 e 248), esposti sul lato citosolico e immediatamente adiacenti alle eliche transmembrana 3 e 7 (Sever et al., 2003a). La completa estrazione dal reticolo e degradazione dell'enzima ubiquitinato richiede la presenza di isoprenoidi non-sterolici derivati dal mevalonato (per esempio, geranilgeraniolo, un isoprenoide con 20 atomi di carbonio) (Goldstein and Brown, 1990; Sever et al., 2003a): se il pathway del mevalonato viene bloccato da un inibitore della reduttasi, quale la compactina, il lanosterolo induce l'ubiquitinazione dell'enzima ma la sua estrazione dal reticolo non avviene rapidamente fino a che non venga aggiunto mevalonato oppure geranilgeraniolo (Sever et al., 2003a).

Il lanosterolo ed il colesterolo non sono le sole molecole in grado di stimolare la degradazione dell'enzima: è stato descritto che anche gli ossisteroli, steroli resi più idrofilici grazie alla presenza di gruppi idrossilici alle posizioni 24, 25 o 27, possono essere degli induttori. L'aggiunta del 25-idrossicolesterolo a cellule in coltura causa sia il legame di Insig sia con SCAP (Adams et al., 2004) che con la reduttasi (Sever et al., 2003b) avviando i vari meccanismi regolatori.

Fig.6 ***Schema della degradazione di HMG-CoAR mediata da Insig (Goldstein et al., 2006 modificata)***



Quindi le proteine Insig svolgono un duplice ruolo nella regolazione di HMG-CoAR: da una parte causano indirettamente la riduzione della sua trascrizione impedendo il trasporto all'apparato del Golgi del complesso SCAP/SREBP, dall'altra stimolano direttamente la sua ubiquitinazione e degradazione.

1.2.4 Regolazione ormonale

Diversi ormoni sono coinvolti nella regolazione dell'espressione genica dell'HMG-CoAR epatica. Questi includono: insulina, glucagone, ormoni tiroidei e glucocorticoidi.

Per quanto riguarda l'insulina sono stati descritti numerosi dati su effetti a breve e a lungo termine che risultano spesso contraddittori. Infatti è stato riportato che l'insulina mostra un'azione volta ad un incremento rapido dell'attività dell'HMG-CoAR. Ratti diabetici trattati con insulina mostravano, a due ore dal trattamento, un aumento di dieci volte dell'attività dell'enzima, determinato da alterazioni nel grado di fosforilazione o dello stato redox dei gruppi tiolici dell'enzima (Ingebritsen et al., 1979; Beg et al., 1980; Henneberg and Rodwell, 1985). Anche in epatociti isolati da ratto, l'insulina aumentava l'attività della reduttasi, aumentando lo stato di attivazione dell'enzima (Leoni et al., 1985b). Altri studi hanno mostrato, che i livelli di mRNA della reduttasi si riducevano del 12% rispetto al controllo in ratti resi diabetici entro 18 ore dalla somministrazione di streptozotocina. Il trattamento con insulina riportava i livelli di mRNA alla norma entro un'ora (Ness et al., 1994 a, b).

Recentemente, sono state identificate due regioni responsive all'insulina nel promotore dell'HMG-CoAR, una delle quali contiene un elemento di risposta all'AMP ciclico (CRE), in una linea cellulare di epatoma di ratto (H4IIE) responsiva all'insulina. La stimolazione con insulina di queste cellule determina un aumento di 10 volte dell'HMG-CoAR (Osborne et al., 2004). Altri lavori hanno tentato di chiarire l'effetto trascrizionale dell'insulina, dimostrando che l'ormone è in grado di stimolare la trascrizione di SREBP1c e, allo stesso tempo, deprimere la trascrizione di Insig2 (Shimomura et al., 1999). Tale processo ridurrebbe la formazione del legame tra Insig ed il complesso SCAP/SREBP, promuovendo, in tal modo la trascrizione del gene dell' dell'HMG-CoAR, mediante la traslocazione di SREBP al nucleo. D'altra parte, come detto in precedenza, è stato anche riportato che l'insulina svolge un'azione di repressione della trascrizione della reduttasi, dovuta ad un'induzione della sintesi dell'mRNA di Insig1, che determina in tal modo la ritenzione del complesso SCAP/SREBP nel reticolo endoplasmatico. In particolare, la sovraespressione di Insig1 nel fegato di topi transgenici inibisce il processamento di SREBP e riduce la lipogenesi stimolata dall'insulina (Engelking et al., 2004). È stato ipotizzato che, normalmente, SREBP1-c continui ad essere processato, dato che l'insulina deprime la trascrizione di Insig2 e la quantità residua di Insig1 potrebbe risultare insufficiente nel bloccare il processamento di SREBP1c, con il risultato di stimolare la trascrizione dell'HMG-CoAR (Yabe et al., 2003).

Il glucagone mostra, invece, un'azione volta alla diminuzione dell'attività dell'HMG-CoAR, aumentandone il grado di fosforilazione, come è stato dimostrato su epatociti isolati di ratto (Leoni et al., 1985b). Inoltre, la somministrazione di glucagone a ratti diabetici trattati con insulina, inibisce l'atteso aumento dell'attività dell'enzima. Questo effetto, è correlato sia con l'incremento del grado di fosforilazione dell'enzima, ma anche con una riduzione dei livelli di mRNA (Ness et al., 1994b).

Il digiuno provoca una diminuzione dei livelli sierici di insulina mentre innalza i livelli di glucagone. È stato osservato che 24 e 48 ore di digiuno determinano una progressiva riduzione della reduttasi e del livello di mRNA della proteina. Il crollo dei livelli di proteina attiva coincide con la riduzione dell'attività dell'HMG-CoAR che si osserva durante il digiuno (Ness et al., 1994b).

La somministrazione di L-triiodiotironina (T_3) a ratti ormone-deficienti (ipofisectomizzati), comporta un aumento di oltre 30 volte nell'attività della reduttasi (Ness et al., 1973; Sample et al., 1987; Simonet and Ness, 1988). Questo incremento dell'attività dell'enzima è associato ad un parallelo aumento dei livelli di mRNA e di proteina (Sample et al., 1987). Inoltre, l'emivita dell'mRNA della reduttasi è prolungata fino a 15 ore. Esperimenti condotti su cellule di tiroide di ratto (FRTL-5), mostrano che il TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*, ormone stimolante la tiroide) aumenta l'attività dell'HMG-CoAR con un meccanismo trascrizionale, mediato dal cAMP che si lega ad una box CRE simile, presente nel promotore dell'enzima; tuttavia, pur aumentando l'attività della reduttasi e la produzione di colesterolo, il T_3 così come i tireomimetici, non determina un incremento dei livelli di colesterolo sierico, ma piuttosto ne comporta una diminuzione. Tale effeto è dovuto ad un aumento dei livelli di colesterolo HDL e ad una diminuzione di colesterolo LDL, determinato dall'induzione epatica di apo A-I e del gene per il recettore LDL (Ness et al., 1998).

I glucocorticoidi si comportano, invece da antagonisti del T_3, bloccando l'aumento dell'attività dell'HMG-CoAR, determinato dall'ormone tiroideo (Simonet and Ness, 1989). L'azione dei glucocorticoidi sembra esplicarsi attraverso una destabilizzazione dell'mRNA della reduttasi, accorciandone l'emivita da 13.5 a 2.5 ore.

Gli estrogeni agiscono aumentando l'attività della reduttasi (Carlson et al., 1980); infatti, la somministrazione di estradiolo benzoato a ratti ovarioctomizzati determina un incremento dell'attività dell'enzima (Abul-Hajj, 1981). Anche nell'uomo il trattamento con dosi farmacologiche di estrogeni innalza l'attività della reduttasi epatica di 2 volte (Angelin et al., 1984). Studi condotti su *Xenopus laevis* hanno rivelato che il trattamento con 17β-estradiolo stimola nel fegato l'attività della reduttasi (Philipp and Shapiro, 1981). Studi successivi mostrano che i livelli di mRNA dell'HMG-CoAR aumentano di 23 volte. Tuttavia, questo effetto non è dovuto ad un aumento della velocità della trascrizione (Chen and Shapiro, 1990), suggerendo la mancanza di una box ERE (*Estrogen Responsive Element*, elemento responsivo agli estrogeni) nel promotore della reduttasi. È stata però identificata una sequenza palindromica simile alla box ERE nella regione compresa tra -81 e -93 del promotore dell'HMG-CoAR che risulta, tuttavia, non funzionante a causa di un probabile ingombro sterico da parte di box vicine, quali le CRE (Di Croce et al., 1999).

L'attività dell'HMG-CoAR mostra un marcato ritmo giornaliero, elevato quando l'animale si nutre e basso quando è a digiuno: le variazioni raggiungono una differenza di 10 volte (Shapiro and Rodwell, 1971). Il picco di

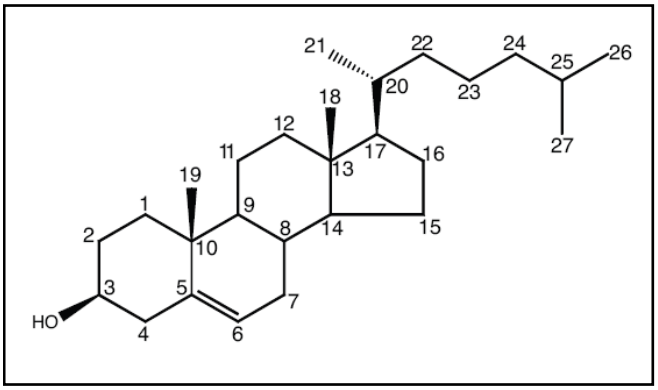
attività dell'enzima si osserva durante la notte quando gli animali consumano la maggior parte del cibo. Studi recenti indicano che le fluttuazioni nell'attività dell'enzima sono associate con corrispondenti cambiamenti nei livelli di proteina (Ness and Chambers, 2000), anche in accordo con le variazioni ormonali che seguono il consumo del pasto, mentre lo stato di attivazione rimane costante.

1.3 Il colesterolo

1.3.1 Stuttura e proprietà del colesterolo

Il colesterolo, che appartiene alla famiglia degli steroli, è un componente importante delle membrane plasmatiche dei mammiferi, è presente in quantità molto ridotta anche nei vegetali e manca del tutto nei procarioti, dove l'attività della reduttasi determina la sintesi di composti isoprenoidi (Boucher et al., 2001). Il colesterolo può essere definito come uno sterolo (alcol steroideo) per la presenza di un gruppo –OH in posizione C-3; come gli altri steroidi, la molecola è costituita da quattro anelli condensati: tre anelli a sei atomi di carbonio e un anello a cinque atomi di carbonio, come si può vedere in figura 7.

Fig.7 ***Struttura del colesterolo (Radhakrishnan et al., 2007)***



Il colesterolo ha anche gruppi metilici in posizione C-10 e C-8 e una catena laterale a otto atomi di carbonio legati al C-17. La struttura a quattro anelli del colesterolo è rigida; quindi questa molecola è meno flessibile della maggior parte degli altri lipidi. Ciò fa si che la presenza del colesterolo costituisca un fattore di regolazione della fluidità delle membrane cellulari dei mammiferi (Moran et al., 1996).

L'esterificazione di acidi grassi, operata dall'ACAT (Acil-CoA-Colesterolo Acil Transferasi), al gruppo ossidrilico in C-3 del colesterolo dà luogo alla formazione degli esteri del colesterolo. Dato che il gruppo acilico è un sostituente non polare, l'estere del colesterolo è più idrofobico dello stesso colesterolo. Gli esteri del colesterolo sono presenti nelle lipoproteine sieriche e sono una componente dell'omeostasi epatica del colesterolo. Infatti, sotto questa forma si ha un deposito di colesterolo nel fegato che viene rimosso con le lipoproteine secrete.

1.3.2 Trasporto del colesterolo

Il colesterolo è una molecola insolubile in acqua che viene trasportata nel circolo ematico sia in forma libera che esterificata con acidi grassi a lunga catena, impaccati all'interno di un core idrofobico di lipoproteine plasmatiche. Le lipoproteine sono macromolecole con una porzione centrale idrofoba e una superficie idrofila. La parte centrale contiene i trigliceridi e gli esteri del colesterolo, mentre la superficie è costituita da molecole anfipatiche, cioè colesterolo, fosfolipidi e apolipoproteine, le quali conferiscono stabilità strutturale alle lipoproteine e svolgono un ruolo fondamentale nel trasporto dei lipidi (Brown and Goldstein, 1985). La classificazione delle lipoproteine plasmatiche è il prodotto del lavoro di molti laboratori, tra questi vanno ricordati quelli di Oncley (1956), Gofman (1954) e Friedrickson (1974).

Le lipoproteine sono classificate, in base alla loro densità, in:

-chilomicroni (d<0.094 g/ml), che trasportano essenzialmente trigliceridi di origine dietetica e che rilasciano una gran parte di questo componente ai tessuti periferici tramite l'interazione con l'enzima lipasi lipoproteica;

-lipoproteine a bassissima densità (VLDL) (d=0.95-1.006 g/ml), che assicurano il trasporto dei trigliceridi, del colesterolo e degli esteri del colesterolo, di origine esogena, a tessuti periferici dove agisce la lipasi lipoproteica;

-lipoproteine a bassa densità (LDL) (d=1.006-1.063 g/ml), che sono il principale veicolo del colesterolo endogeno, derivano dalla degradazione delle VLDL;

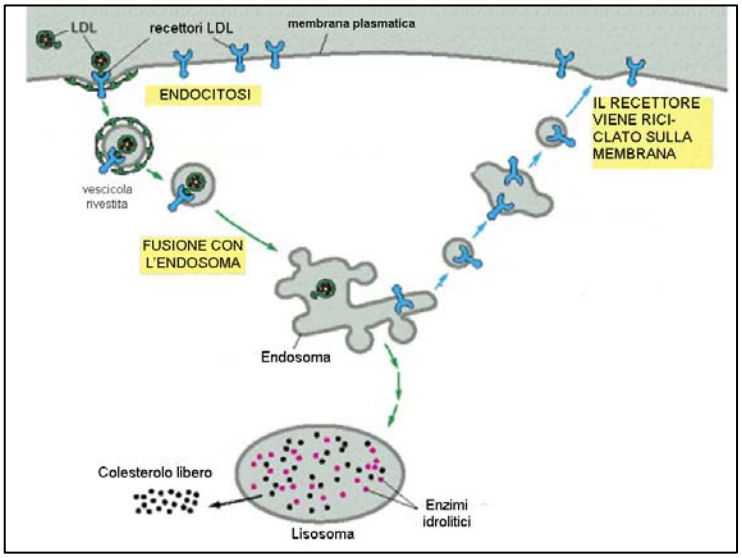
-lipoproteine ad alta densità (HDL) (d=1.063-1.21 g/ml), che si arricchiscono si proteine e riportano il colesterolo in eccesso e i suoi esteri dai tessuti al fegato.

Ogni classe lipoproteica dispone delle sue caratteristiche apoproteine, che ne determinano la specificità di interazione con i recettori di membrana. Da un individuo all'altro la concentrazione di determinate lipoproteine può variare anche di mille volte. Questa variazione riveste una notevole importanza diagnostica, dal momento che il

riscontro di un elevato rapporto tra la concentrazione di alcune lipoproteine è associato ad un aumento del rischio dei disturbi cardiovascolari. Esiste inoltre una variabilità genetica che si esprime attraverso la sintesi di forme diverse di apolipoproteine, che hanno ricevuto grande attenzione, in quanto l'aumento di alcune è associato ad una maggiore incidenza di alcune malattie: ad esempio l'aumento di Apo E è stato associato ad una maggiore incidenza del morbo di Alzheimer (Moran et al., 1996).

Una volta raggiunti i tessuti periferici, gli esteri del colesterolo possono entrare all'interno delle cellule attraverso un meccanismo di endocitosi mediata da recettore (Brown e Goldstein, 1985). Infatti, uno specifico recettore per le LDL (LDLr) (figura 8), esposto sulla superficie cellulare, riconosce l'apoproteina B-100 e tramite essa lega una particella LDL. I recettori caricati con le LDL si associano e formano con la clatrina (una proteina strutturale intracellulare) le cosiddette *coated pits* (fossette rivestite). Successivamente si ha l'invaginazione delle *coated pits*, le quali, poi, mediante una strozzatura, gemmano dalla membrana sotto forma di vescicole endocitolitiche rivestite di clatrina. All'interno della cellula queste vescicole si fondono con lisosomi, che contengono diversi enzimi idrolitici: proteasi, che degradano le apoproteine in aminoacidi liberi, fosfolipasi che idrolizzano i fosfogliceridi, lipasi che degradano gli esteri del colesterolo in colesterolo libero e acidi grassi. Dai lisosomi gemmano vescicole con recettori per le LDL scarichi, i quali vengono ritraspostati alla superficie della membrana, dove verranno riutilizzati. Il tempo di ricircolo di un recettore è di circa10 minuti; nel processo è probabilmente coinvolto il suo dominio EGFP-simile descrivere. Un recettore va incontro a circa 150 cicli di endocitosi prima di essere degradato.

Fig.8 ***Meccanismo di endocitosi mediata da recettore (Alberts et al., 2002 modificata)***



1.3.3 Omeostasi del colesterolo

Fisiologicamente, il livello di colesterolo ematico viene mantenuto entro un intervallo di valori piuttosto ristretto. Il fegato, gioca il ruolo principale nella regolazione dei livelli di colesterolo (Dietschy et al., 1993): esso esprime la maggior parte dei LDLr dell'organismo ed è il sito principale di degradazione del colesterolo tramite la sua conversione in acidi biliari (Bilheimer et al., 1984; Turley et al., 1995).

Il fegato esprime uno dei più alti livelli di HMG-CoAR e la sua regolazione a feedback si attua principalmente in quest'organo, nonostante questo enzima si trovi virtualmente in tutti i tessuti (Andersen et al., 1982).

I meccanismi deputati alla regolazione dell'omeostasi del colesterolo nel fegato comprendono: biosintesi del colesterolo, assunzione di colesterolo (endogeno ed esogeno) attraverso i recettori delle lipoproteine, e la degradazione e l'eliminazione del colesterolo attraverso la conversione in acidi biliari. La biosintesi del colesterolo viene regolata, principalmente, modulando l'attività dell'HMG-CoAR, in relazione al fabbisogno dello sterolo nella cellula. La diminuzione dell'attività della reduttasi in risposta ad un aumento del colesterolo che raggiunge il fegato attraverso i *remnant* dei chilomicroni, rappresenta effettivamente un mezzo valido nel mantenere livelli di colesterolo ottimali (Kita et al., 1982). Inoltre, o in alternativa, la cellula può aumentare il numero di recettori per le lipoproteine sulla membrana plasmatica, determinando così una maggiore assunzione di colesterolo, che può essere direttamente utilizzato oppure immagazzinato previa esterificazione. Il contenuto cellulare di colesterolo è regolato principalmente tramite un meccanismo a feedback negativo che coinvolge il recettore LDL e l'HMG-CoAR (Goldstein and Brown, 1990). Il colesterolo derivato dalle LDL, è anche in grado di attivare l'enzima esterificante il colesterolo (ACAT) provvedendo all'immagazzinamento del colesterolo in eccesso nel citoplasma (Goldstein et al., 1974), e deprimendo la sintesi di LDLr, a livello trascrizionale (Brown et al., 1975; Russell et al., 1983).

La degradazione e la trasformazione del colesterolo producono due classi di composti principali: gli acidi biliari e gli steroidi. Gli acidi biliari sono importanti emulsionanti dei grassi esogeni e attivatori delle lipasi pancreatiche; sono prodotti nel fegato, secreti nell'intestino tenue con la bile e utilizzati più volte dopo riassorbimento: si parla di ricircolo enteroepatico.

Gli steroidi hanno un ruolo di primo piano nel controllo ormonale dei processi di crescita, sviluppo, differenziamento e metabolismo. Un ruolo molto importante nella degradazione e nella trasformazione del colesterolo hanno gli enzimi del tipo delle monoossigenasi citocromo P450-dipendenti, che idrolizzano i loro substrati in reazioni $NADPH/O_2^-$ dipendenti. Anche il calcitriolo, un derivato della vitamina D3 e importante regolatore del metabolismo del calcio e del fosfato, ha origine dal colesterolo.

1.4 I Prenili

Le modificazioni post-trascrizionali delle proteine sono fondamentali per la regolazione della loro funzione fisiologica. In particolare la prenilazione è una modificazione lipidica che prevede l'aggiunta di intermedi della via biosintetica del colesterolo, ossia farnesolo a 15 atomi di carbonio e geranilgeraniolo a 20 atomi di carbonio. Lo studio della prenilazione rappresenta un campo di studio di grande interesse poiché molte proteine prenilate sono coinvolte in circuiti di trasduzione del segnale le cui disfunzioni portano al cancro (Glomset et al., 1990; Sebti and Der, 2003; Zhang and Casey, 1996).

Esistono 3 preniltransferasi: la farnesiltransferasi (FTasi), la geranilgeraniltransferasi I e la geranilgeraniltransferasi II (GGTasi I e II). Questi 3 enzimi catalizzano la formazione covalente di legami tioetere tra il gruppo prenile e il gruppo tiolo di cisteine all'estremità carbossi-terminale di circa 300 proteine nell'uomo (Sebti, 2005).

La FTasi e la GGTasi I prenilano proteine che contengono la sequenza CAAX (dove C=cisteina, A=amminoacido alifatico e X=qualsiasi amminoacido) al loro carbossi-terminale. La FTasi mostra una preferenza nella sua attività di prenilazione per proteine con X uguale a Met, Ser, Ala o Gln, mentre la GGTasi I per X uguale a Leu o Ile. La FTasi e la GGTasi I sono eterodimeri che condividono la subunità α ma distinte subunità β (Zhang and Casey, 1996).

La GGTasi II (conosciuta anche come RabGGTasi) modifica proteine che di solito terminano con la sequenza CXC. La RabGGTasi è anch'essa un eterodimero, con la sua subunità α che mostra un 27% di identità con la subunità α di FTasi e GGTasi I e con la sua subunità β che mostra un 29% di identità con la subunità β della FTasi (Zhang and Casey, 1996).

Eleganti studi hanno messo in luce il ruolo della prenilazione proteica nell'embriogenesi, nello sviluppo postnatale, nell'omeostasi dell'adulto, nella tumorigenesi e nella prevenzione e terapia del cancro (Sebti, 2005; Mijimolle et al., 2005; Lackner et al., 2005).

[2]INVECCHIAMENTO, RADICALI LIBERI E RESTRIZIONE CALORICA

L'invecchiamento è un processo fisiologico, apparentemente irreversibile, che provoca modificazioni biologiche, morfologiche e psicologiche. Durante l'invecchiamento si verifica una riduzione delle abilità psicofisiche e una progressiva involuzione morfologica e strutturale che interessa da un lato i tessuti e gli organi di un individuo, dall'altro le facoltà mentali e psichiche. L'inizio cronologico dell'invecchiamento è molto variabile, e legato anche a fattori socioculturali; l'evoluzione è condizionata anche dall'ambiente in cui l'anziano vive oltre che dalla sua personalità. L'organismo è un sistema aperto nel quale ogni singolo distretto comunica e collabora con gli altri per garantire quell'equilibrio dinamico, metabolico e psicofisico, che ci permette di essere vivi, efficienti ed in buona salute. Con l'invecchiamento questo equilibrio comincia a perdersi, dando avvio ad una fase di progressivo aumento della vulnerabilità dell'organismo nei confronti delle malattie (Chung et al., 2002). L'invecchiamento è definito come un processo multifattoriale che prevede il coinvolgimento dell'instabilità genomica, della variazione dell'espressione genica, dell'alterata risposta cellulare e dell'alterazione della proliferazione cellulare. Alcuni autori sostengono l'ipotesi della presenza nel genoma di *geni dell'invecchiamento*, cioè di geni la cui normale attività sia quella di promuovere la successione degli eventi che determinano l'invecchiamento delle cellule e dell'organismo; altri, invece, ritengono che l'invecchiamento sia il risultato di una disposizione genetica (Rogina et al., 2000), su cui operano, con effetti ben maggiori, lo stile di vita e le condizioni ambientali.

2.1 La natura multifattoriale dell'invecchiamento

Negli ultimi decenni sono state formulate molte teorie per spiegare il processo dell'invecchiamento. La maggior parte di teorie è basata su dati settoriali derivanti da specifici studi sperimentali.

Basandosi sulla dimostrazione che molti meccanismi possono interagire simultaneamente operando a diversi livelli di organizzazione funzionale, la visione dell'invecchiamento come processo multifattoriale complesso ha sostituito le precedenti teorie *monofattoriali* che vedevano una singola causa come responsabile di tale fenomeno (Kowald and Kirkwood., 1996). Di seguito verranno descritte più nel dettaglio alcune delle teorie sull'invecchiamento.

TEORIA DELL'INVECCHIAMENTO PROGRAMMATO Questa teoria afferma che il patrimonio genetico conterrebbe le informazioni necessarie a codificare le modificazioni progressive che comportano il deterioramento delle funzioni cellulari fino al raggiungimento della morte. Ad esempio, le cellule sarebbero programmate per un numero limitato di replicazioni, dopo di che non sarebbero più rimpiazzate, con atrofia e perdita di funzione del tessuto (Rattan, 1995).

TEORIA NEUROENDOCRINA Questa teoria considera la senescenza quale espressione di un progressivo squilibrio funzionale del sistema neuroendocrino. Infatti ci sono molti studi che mettono in relazione le alterazioni cellulari età-dipendenti con il declino senile delle funzioni neuroendocrine (Brody, 1980). Il sistema neuroendocrino funziona a circuito chiuso, con meccanismi d'interferenza e di controllo reciproci, che regolano la produzione degli ormoni in rapporto alle necessità dell'organismo, assai variabili nel tempo, in rapporto alle più svariate circostanze. Un meccanismo biologico così delicato può col tempo andare incontro ad alterazioni funzionali ed innescare alterazioni irreversibili in tutti gli organi ed apparati. Questa teoria, però, non spiega l'universalità del processo d'invecchiamento, perché può essere valida solo per gli esseri viventi che hanno un sistema neurologico ed endocrino.

TEORIA IMMUNOLOGICA Secondo questa teoria l'invecchiamento sarebbe una conseguenza di disordini del sistema immunitario, con produzione di autoanticorpi (che hanno come bersaglio i costituenti stessi di ciascun individuo) (Hartwig, 2002) e ridotta capacità di difesa a fronte di aggressioni esogene. Ad esempio, l'efficienza della risposta immunitaria anticorpale è inversamente proporzionale all'età (Weng, 2006) Anche la teoria immunitaria, come quella neuroendocrina, manca del concetto di *universalità*, non essendo applicabile agli organismi più semplici privi del sistema immunitario.

TEORIA DEI LEGAMI CROCIATI Questa teoria afferma che, con l'età, aumenta la formazione di legami anomali fra molecole del connettivo (collage ed elastina), con conseguente alterazione funzionale delle cellule e dei tessuti (Kohn, 1971). Questa teoria non ha ottenuto molti consensi per la mancanza di validi supporti sperimentali.

TEORIA DELLE MUTAZIONI SOMATICHE Secondo questa teoria l'insufficienza funzionale nelle cellule somatiche tipica dell'età senile sarebbe causata dall'accumularsi di mutazioni genetiche, prodotte dall'esposizione prolungata ad agenti mutageni (es. radiazioni ionizzanti o agenti radio-mimetici) (Failla, 1958). Diversi esperimenti hanno successivamente invalidato questa teoria (Martin et al., 1980).

TEORIA DELLA CATASTROFE DA ERRORI Secondo questa teoria, l'invecchiamento sarebbe la conseguenza di errori nella sintesi di proteine di importanza critica per la sintesi del materiale genetico o per lo stesso sistema di sintesi delle proteine. Fu elaborata da Orgel, basandosi sull'osservazione che nel genoma degli eucarioti molte sequenza nucleotidiche sono ripetute tante volte mentre altre non lo sono affatto (Orgel, 1995). Le ripetizioni funzionerebbero come una forma di *protezione dell'informazione* contenuta nel genoma. Mutazioni a livello delle sequenze non ripetute del DNA porterebbero alla formazione di proteine alterate che, se coinvolte nella sintesi di

materiale genetico e proteico, amplificherebbero il danno fino alla morte cellulare quando l'accumulo divenga incompatibile con la vita stessa. È stato dimostrato che, durante l'invecchiamento, l'accumulo di proteine alterate non è attribuibile alla produzione di più proteine con errori, ma piuttosto ad una minore efficienza dei meccanismi di rimozione e di degradazione delle proteine alterate stesse (Dice, 1989). Questa teoria non viene ritenuta oggi più valida.

TEORIA DEI RADICALI LIBERI

Nella metà degli anni'50, Harman elaborò la *teoria dei radicali liberi* (Harman, 1956), secondo la quale l'invecchiamento è correlato con una ridotta capacità di neutralizzare i radicali liberi. Harman postulò che "una diminuita formazione di ATP dai mitocondri senescenti, e la presenza di anioni superossido e perossido d'idrogeno" (Harman, 1994) inducessero la generazione di una varietà di prodotti ossidati: in realtà, si assiste ad un innalzamento, età-dipendente, dei livelli di proteine ossidate (Stadtman and Levine, 2000), di prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs) (Kristal and Yu, 1992; Onorato et al., 1998), di acidi nucleici ossidati (Bohr et al, 1998), di prodotti di ossidazione sterolici (Sevanian et al., 1991; Schröpfer, 2000), e di prodotti di perossidazione lipidica (LPO).

Non esistendo né una sola causa, né un meccanismo unico per i quali invecchiamo (Ferrara et al., 2005), la teoria oggi maggiormente accettata è quella *unificante*, che ingloba tutte le teorie precedenti e ne effettua una sintesi. Le teorie precedenti sono riconducibili essenzialmente a due: l'invecchiamento sarebbe un processo controllato da geni regolatori che causerebbero, secondo uno schema preordinato, i cambiamenti caratteristici dell'età senile; l'invecchiamento sarebbe un processo stocastico di deterioramento, dovuto ad un progressivo accumulo di errori a diversi livelli (DNA, RNA, proteine, ecc.) come inevitabile conseguenza degli effetti di agenti esogeni e/o endogeni danneggiati. Secondo la teoria unificante nessuna delle ipotesi sovraesposte è in grado da sola di spiegare il fenomeno dell'invecchiamento nella sua complessità, pur contenendo elementi di validità che derivano da inoppugnabili dati sperimentali. Secondo questa teoria unitaria, si accetta a priori che l'invecchiamento dipenda da fattori sia genetici che ambientali. I vari costituenti dell'organismo animale sono esposti continuativamente all'azione di agenti lesivi, sia endogeni che esogeni. Per neutralizzare questi insulti e per mantenere l'omeostasi, le cellule hanno sviluppato una serie di meccanismi di difesa e riparazione. L'ipotesi prevede che l'invecchiamento sia dovuto al deterioramento di questi meccanismi e che la diversa longevità delle varie specie dipenda dal livello d'efficienza di questo sistema, controllato a sua volta su base genetica.

2.2 I radicali liberi

L'esistenza dei radicali liberi come entità chimica, venne postulata circa 100 anni fa, ma non venne universalmente accettata per circa 30-40 anni. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) furono considerate, per la maggior parte del ventesimo secolo, agenti biochimici in grado di causare danni tessutali e patologie. Solo nel ventunesimo secolo, la biochimica dei radicali liberi e' maturata come disciplina. Inoltre, solo recentemente e' stato riconosciuto che i ROS sono prodotti in maniera regolata e che svolgono un ruolo nel mantenimento dell'omeostasi cellulare nei tessuti sani (Hensley and Floyd, 2002). Questo, chiaramente, ha contribuito alla comprensione del ruolo e della richiesta dei nutrienti antiossidanti, poiché ci si aspetta che essi funzionino da modulatori nei processi cellulari in cui agiscono i radicali liberi. La conoscenza dell'effetto di ossidanti e nutrienti è, inoltre, fondamentale per valutare la funzione degli antiossidanti nei processi patologici cronici, nell'invecchiamento e nella morte cellulare. La definizione dei processi mediante i quali i ROS agiscono da modulatori della funzione cellulare o comportano un danno cellulare può contribuire ad una migliore individuazione del tipo di antiossidante più utile. E questo assume una notevole importanza alla luce delle relazioni che stanno emergendo tra ossidanti cellulari, antiossidanti, stato ossido-riduttivo della cellula e controllo di processi biologici quali le vie di segnale e l'espressione genica (Sen and Packer, 1996).

2.2.1 Regolazione della produzione delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

Gli organismi producono ROS durante tutta la loro vita. Esse includono il radicale idrossile ($HO^{\cdot}$), l'anione superossido radicalico ($O2^{\cdot-}$), l'ossido nitrico ($NO^{\cdot}$), i radicali perossidici ($ROO^{\cdot}$), il perossinitrito ($ONOO^{-}$), l'ossigeno singoletto ($^1O_2$), l'acido ipocloroso (HOCl), il perossido d'idrogeno (H_2O_2), l'idrossiperossile ($HOO^{\cdot}$), l'ozono (O_3). I ROS sono generati da molteplici vie metaboliche quali le catene di trasporto di elettroni (mitocondriali e del reticolo endoplasmatico), alcune reazioni enzimatiche (ad esempio nelle reazioni in cui sono coinvolte lipossigenasi, cicloossigenasi, perossidasi, ed altre proteine contenenti l'eme) (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Nella fagocitosi, si assiste alla generazione di radicali liberi. Infatti, uno degli eventi più significativi della fagocitosi è il vistoso mutamento del metabolismo ossidativo cui vanno incontro i fagociti. Durante la fagocitosi (sia da parte dei polimorfonucleati che da parte dei monociti-macrofagi) si verifica un notevole aumento della respirazione (*esplosione respiratoria*), che consta di quattro eventi fondamentali: incremento del consumo di ossigeno, del catabolismo glucidico, della produzione di perossido d'idrogeno, della formazione di anione superossido. Questi quattro eventi metabolici sono collegati tra loro e dipendono dall'attività di un unico enzima localizzato sul versante citoplasmatico della membrana dei fagociti, la NADPH-ossidasi, che catalizza la riduzione dell'ossigeno in anione superossido usando il NADPH come donatore di elettroni. L'anione superossido è poi ridotto a perossido d'idrogeno mediante una reazione di dismutazione, che può anche decorrere spontaneamente ma che è notevolmente accelerata

dall'enzima superossido dismutasi (SOD); questa reazione ha luogo in corrispondenza della superficie cellulare e all'interno del fagosoma.

Le due forme ridotte di ossigeno molecolare rese disponibili dall'esplosione respiratoria, lo O_2 e lo H_2O_2, sono di per sè scarsamenta reattive, possono essere substrato della reazione catalizzata dall'enzima mieloperossidasi, che porta alla formazione dello ione ipocloroso (OCl^-), e dalla reazione catalizzata da metalli di transizione (fondamentalmente il ferro) che genera il radicale idrossile ($HO^{\cdot}$). La mieloperossidasi (MOP), enzima presente nei granuli azzurrofili dei granulociti e nei lisosomi precoci dei monociti, ha un optimum di attività a pH acido ed utilizza la H2O2 generata nel fagolisosoma in seguito all'esplosione respiratoria per ossidare vari substrati principalmente lo ione cloro. Il sistema $H_2O_2/MOP/Cl^-$ amplifica di circa 50 volte il potere ossidante del perossido d'idrogeno. I fagociti sono poi in grado di convertire lo $O_2^{\cdot-}$ e lo H_2O_2 in radicali idrossilici altamente reattivi mediante la reazione di Harber-Weiss. Tale reazione, che a pH fisiologico avviene molto lentamente, è notevolmente accelerata (reazione di Fenton) dalla presenza di metalli di transizione ridotti, come lo ione ferroso (Fe^{2+}). Nei fagociti, la generazione di queste specie reattive dell'ossigeno concorre attivamente alla degradazione del materiale inglobato durante il processo di fagocitosi (Pontieri, 1996). Esistono, comunque, anche agenti esogeni in grado di provocare la produzione di ROS, come ad esempio, i raggi ultravioletti (UV). In particolare, i raggi UVB catalizzano reazioni fotochimiche e foto-ossidazioni, danneggiano proteine, lipidi e DNA; tali modificazioni possono provocare l'insorgenza del cancro e sono considerati una delle cause dell'invecchiamento (Tedesco et al., 1997; Sarasin, 1999). La radiazione ultravioletta è un potente induttore di radicale superossido ($O_2^{\cdot-}$), di perossido d'idrogeno (H_2O_2) e di radicale idrossile ($HO^{\cdot}$), che sono implicati nell'invecchiamento cutaneo, nell'insorgenza di tumori benigni e maligni della pelle e in varie malattie infiammatorie (Cerutti, 1985).

2.2.2 Descrizione dei meccanismi di difesa cellulari dai radicali liberi

Esistono numerosi meccanismi di difesa cellulari che contrastano l'azione dei ROS, e aiutano a proteggere gli organismi dal danno ossidativo. Questi sistemi sono rappresentati da: Enzimi; Chelanti di metalli; *Scavenger*a basso peso molecolare. Tra gli enzimi antiossidanti ricordiamo la già citata Superossido dismutasi (SOD), la Catalasi e la Glutationeperossidasi.La SOD è un enzima di cui esistono due forme: una contenente rame e zinco (CuZnSOD), presente nel citosol e nel plasma; una contenente manganese (MnSOD), presente, invece, nei mitocondri. La SOD catalizza la dismutazione dell'O_2^- ad H_2O_2 e $O_2^{\cdot}$ La catalasi è un enzima che contiene ferro nel sito attivo. Esso determina la conversione dell'H_2O_2 ad acqua e O_2. La catalasi è presente principalmente nei perossisomi, nel citoplasma di eritrociti e nel plasma. La glutatione perossidasi è un enzima presente nel citoplasma e contiene selenio nel sito attivo. Le reazioni in cui è coinvolta sono (Sarvazyan, 2002):

Se-GLUTATIONE PEROSSIDASI

a) H2O2 + 2GSH----------GSSG + 2 H2O

b)LOOH + 2GSH----------LOH + GSSG + 2 H2O

in cui: LOOH=idroperossido di un acido grasso polinsaturo GSH=Glutatione ridotto GSSG=Glutatione ossidato Appartengono, invece, ai chelanti di metalli di transizione la Ferritina, la Transferrina, l'Albumina, la Ceruloplasmina e l'Urato. La ferritina è una proteina costituita da più subunità che circondano un nucleo centrale contenente Fe^{3+}, il cui spiazzamento deve essere preceduto dalla sua riduzione a Fe^{2+}. La transferrina lega il Fe^{3+}, ed insieme alla ferritina, agisce da proteina di trasporto ed accumulo di tale metallo di transizione, minimizzando in tal modo la formazione di alcuni radicali liberi da questo catalizzata (Sarvazyan, 2002). L'albumina è una proteina che lega il rame (II) strettamente ed il ferro debolmente. La sua azione antiossidante deriva appunto dalla sua capacità di sequestrare questi metalli di transizione, riducendo la formazione di alcune specie di radicali liberi (Sarvazyan, 2002). La ceruloplasmina gioca un importante ruolo regolatorio nel metabolismo del ferro, favorendo il rilascio del ferro dalle cellule prima del suo legame alla transferrina. La ceruloplasmina è la proteina principale coinvolta nell'immagazzinamento del rame nell'organismo; si stima che il 95% del rame plasmatico sia legato a tale proteina mentre il rimanente sembra sia legato all'albumina (Sarvazyan, 2002).

L'acido urico è un antiossidante che deriva dalla degradazione delle basi puriniche, adenina e guanina. L'acido urico reagisce pricipalmente con l'acido ipocloroso, il radicale idrossile, i radicali perossidici e il perossido d'idrogeno, esplicando una potente azione antiossidante (Becker, 1993) Tra gli "scavenger" a basso peso molecolare figurano la Vitamina E, la Vitamina C, i Carotenoidi, il Glutatione e i Flavonoidi. La Vitamina E fa parte di un gruppo di tocoferoli strettamente correlati, composti che hanno un sistema biciclico contenente un atomo di ossigeno con una catena laterale idrofoba (Moran et al., 1996). Lo "stress ossidativo" origina da uno squilibrio fra la produzione e lo spegnimento dei ROS, quando la formazione di radicali è grandemente aumentata o vi è carenza assoluta o relativa delle molecole implicate nella difesa dell'organismo (Pontieri, 1996). Le cellule possono rispondere a cambiamenti nell'esposizione allo stress ossidativo e alla produzione endogena di radicali liberi innalzando o diminuendo la proliferazione cellulare. Tutto sembra essere regolato da vie di segnale strettamente integrate. Il perdurare di questa condizione o, comunque, una condizione di elevatissimo stress ossidativo genera una diffusa ossidazione di biomolecole, che può determinare l'instaurarsi di fenomeni patologici, e morte cellulare per necrosi (Darzynkiewicz et al., 1997; Samali et al., 1999).

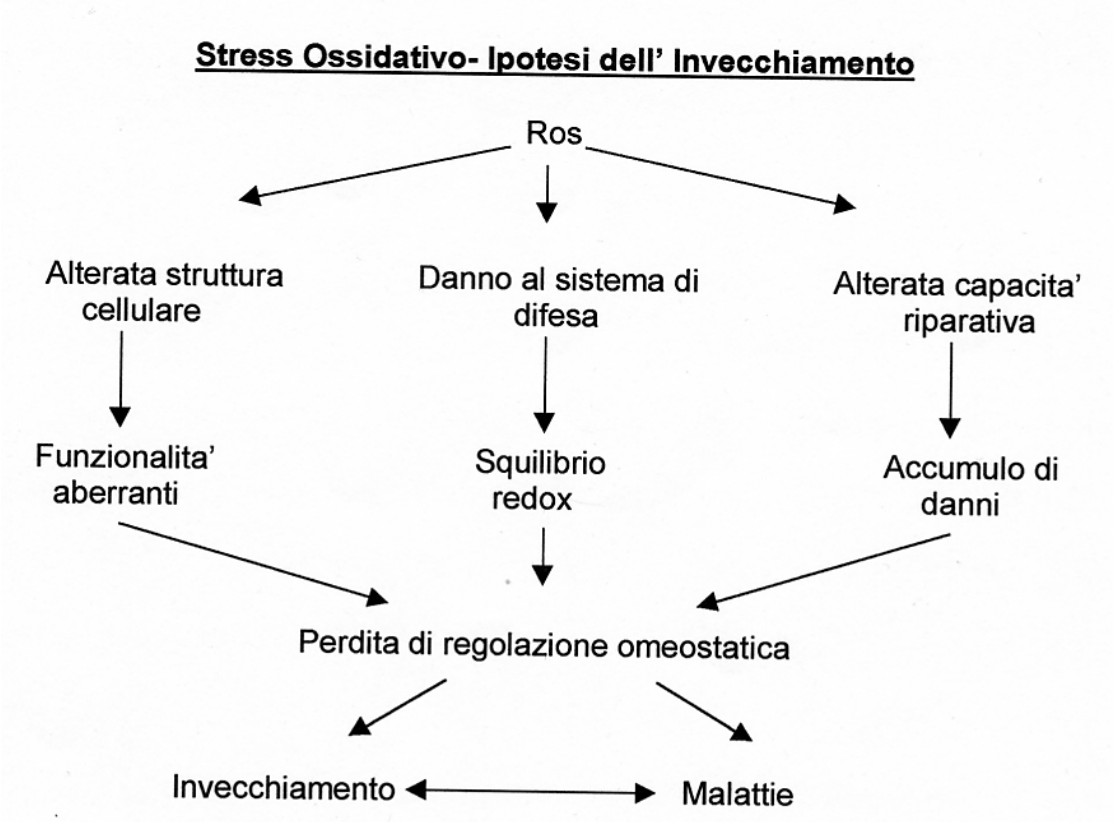
2.2.3 Radicali liberi ed invecchiamento

I radicali liberi e le ROS sono state correlate con l'eziologia e/o la progressione di alcune patologie e con l'invecchiamento (Moskovitz et al., 2002). La teroria del danno ossidativo dell'invecchiamento postula che l'accumulo età-dipendente del danno ossidativo alle macromolecole causa un progressivo deterioramento delle cellule, tessuti ed organi che si manifesta con la senescenza e culmina con la morte (Harman, 1956). Il danno ossidativo a lipidi, proteine e DNA avviene primariamente attraverso l'azione dei ROS. Nonostante le cellule siano dotate di una gran varietà di antiossidanti e sistemi enzimatici per prevenire e riparare il danno ossidativo, tale danno è riscontrabile anche in animali giovani in condizioni fisiologiche normali (Agarwal and Sohal, 1994). Ciò suggerisce che i meccanismi di protezione endogeni non possono eliminare tutti i danni ossidativi anche in condizioni di livelli delle ROS basali (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Una predizione fondamentale dell'ipotesi del danno ossidativo è che tale danno debba aumentare con l'età. In accordo con tale ipotesi, molti lavori riportano effettivamente un aumento di acidi nucleici, lipidi e proteine danneggiati dallo stress ossidativo in vari tessuti di molti specie (Sohal et al., 2002). Ad esempio, i radicali liberi, come O_2^- e $HO^\cdot$, reagiscono con le catene laterali dei residui di lisina, arginina, prolina, treonina e acido glutammico generando derivati carbonilici (Stadtman and Berlett, 1997; Taborsky, 1973; Amici et al., 1989). I gruppi carbonilici delle proteine rappresentano un indicatore dell'ossidazione delle proteine indotta dai radicali liberi. Il contenuto di proteine carbonilate aumenta durante l'invecchiamento in vari tessuti (Oliver et al., 1987; Garland et al., 1988; Smith et al., 1991). Durante l'invecchiamento, i sistemi antiossidanti divengono meno efficaci per inattivazione progressiva degli enzimi, incluse le proteasi, nonchè delle proteine antiossidanti, e di molecole antiossidanti più piccole (Martin and Grotewiel, 2006).

Il coinvolgimento dei radicali liberi nella progressione di alcune patologie, indica che un individuo normale potrebbe divenire più suscettibile alle malattie, come quelle neurodegenerative, quando il livello di proteine carbonilate inizia ad aumentare autocataliticamente. Concentrazioni elevate di proteine carbonilate sono state, infatti, riscontrate anche in soggetti affetti dal morbo di Alzheimer (AD), dal morbo di Parkinson (PD), e nella sclerosi laterale amiotrofica (ALS). Tuttavia, in questi casi, il danno ossidativo è selettivo e riguarda preferenzialmente l'inattivazione di particolari proteine (Beal, 2002).

Fig.9 ***Azione dei ROS (Yu, 1996 modificata)***



ALTERAZIONI GENOMICHE I radicali liberi, e in particolare il radicale idrossile, possono causare modificazioni chimiche al DNA o tramite rotture di elica o tramite alterazioni nucleotidiche (O'Neill and Fielden, 1993); comunque, la maggior parte delle cellule possiede meccanismi di difesa contro il danno ossidativo, come enzimi di riparo di excisione di base e di rottura dell'elica, che rimuovono questi danni per mantenere l'integrità del

genoma (Friedberg et al., 1995). Tuttavia, alterazioni genetiche deleterie possono accumularsi nelle cellule con l'età a causa di errori (nel riparo e nella replicazione e ricombinazione), o a seguito dei diminuiti livelli di proteine di riparo che si verificano durante l'invecchiamento della cellula. Due dei principali danni al DNA, spontaneamente indotti nelle cellule, sono l'8-oxoguanina e la timina glicole. E' stato stimato che il livello di 8-oxoguanina indotto dal metabolismo ossidativo per cellula è di circa 0.2 per 10^6 basi nel DNA cellulare (Pouget et al., 2000). L'effetto mutageno dell'8-oxoguanina potrebbe giocare un ruolo nello sviluppo del cancro e nel processo di invecchiamento (Ames, 1989; Lindahl, 1993). La timina glicole, invece, blocca la replicazione (Ide et al., 1985) e la trascrizione del DNA (Hatahet et al., 1994) e deve essere efficientemente rimossa e riparata per mantenere la stabilità genetica.

Nonostante le principali lesioni indotte al DNA dal metabolismo ossidativo siano lesioni singole, esiste la possibilità di arrecare lesioni multiple all'interno di poche paia di basi, ad esempio lesioni in tandem (due lesioni indotte su nucleotidi adiacenti). Lesioni del DNA in tandem, sono iniziate dall'interazione di un motivo di DNA con un $HO^{\cdot}$ (Box et al., 1995).

ALTERAZIONI LIPIDICHE Gli acidi grassi non rappresentano solo il principale carburante metabolico per l'organismo, ma sono anche i componenti delle membrane delle quali regolano la fluidità. La perossidazione lipidica può essere avviata da qualsiasi radicale libero primario che può sottrarre un atomo d'idrogeno da un gruppo metilene reattivo di un acido grasso insaturo. Ad esempio, il radicale ossidrile è una specie altamente reattiva (Stadtman and Berlett, 1997), che è in grado di sottrarre idrogeno dai legami C-H. Sono particolarmente soggetti alla sottrazione di idrogeno gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), costituenti dei glicerolipidi e dei fosfolipidi delle membrane cellulari. La sottrazione di un idrogeno dai gruppi CH_2 di un PUFA genera un radicale, che reagisce con l'ossigeno per generare, a sua volta, radicali che sono in grado di sottrarre idrogeno da un altro PUFA, avviando così una reazione a catena (Frankel, 1984). La quantità dei prodotti di perossidazione aumenta con l'avanzare dell'età. Questo aumento è legato sia ad una maggiore produzione di lipidi perossidati, che ad una riduzione della capacità di rimozione di tali prodotti. L'incremento di prodotti di perossidazione lipidica, ematico e tissutale, è stato osservato non solo durante l'invecchiamento ma anche in patologie ad esso correlate, come, in malattie croniche neuronali (Markesbery, 1997; Smith et al., 1999), caratterizzate da danno cellulare o processi infiammatori (Spiteller, 1996).

ALTERAZIONI PROTEICHE Nell'invecchiamento è particolarmente importante il danno indotto dai radicali liberi alle proteine. Si osserva infatti, l'accumulo di proteine ossidate, che deriva o da un incremento dell'ossidazione proteica, o da una ridotta eliminazione delle proteine ossidate, o da entrambi. L'invecchiamento è accompagnato dalla perdita della capacità proteolitica, e dall'accumulo di forme cataliticamente meno attive e termosensibili di un certo numero di enzimi (Rothstein, 1977). È stato suggerito che il tasso di turnover proteico sia ridotto e che le proteine vadano incontro a cambiamenti conformazionali spontanei che le rendono meno attive e/o più sensibili alla denaturazione termica (Gafni, 1981).

Questa ipotesi si basa su una serie di osservazioni:

-Cambiamenti nell'attività catalitica, nella stabilità termica e nella suscettibilità alla degradazione proteolitica esponendo enzimi purificati a sistemi produttori di radicali liberi *in vitro* (De La Cruz et al., 1996);

-Alterazioni enzimatiche generate *in vivo* esponendo animali giovani a condizioni di stress ossidativo (Yan et al., 1997);

-Aumento esponenziale del contenuto di proteine carbonilate in funzione dell'età dell'animale.

-Stretta correlazione tra l'aumento dei livelli di proteine ossidate in tutte le aree del cervello implicate nelle funzioni cognitive e la perdita età-dipendente delle funzioni cognitive (Smith et al., 1991);

-La riduzione nei livelli intracellulari di proteine ossidate (misurate come contenuto di proteine carbonilate) si osserva in animali mantenuti a diete o a condizioni anti-invecchiamento, e viceversa (Sohal et al., 1993);

-Maggiore sensibilità al danno ossidativo delle proteine dei tessuti di animali vecchi rispetto a quelle dei tessuti di animali giovani (Sohal et al., 1995);

-Incremento età-correlato nella idrofobicità superficiale e sua correlazione con un aumento dei livelli dei residui ossidati, in particolare metionine (Bohley and Riemann, 1977).

Le specie reattive dell'ossigeno possono reagire direttamente con le proteine o con zuccheri e lipidi, generando prodotti che possono reagire a loro volta con le proteine. All'interno di una proteina, possono essere alterati sia i legami peptidici che le catene laterali. Generalmente i radicali liberi reagiscono in maniera sito-specifica (Stadtman and Levine, 2000).

Il contenuto di proteine ossidate aumenta con l'età, giungendo anche al 30% delle proteine totali nelle ultime fasi del ciclo vitale (Stadtman and Levine, 2000). Gli amminoacidi solforati cisteina e metionina, contenenti zolfo, sono altamente suscettibili al danno ossidativo. La metionina è prontamente ossidata a metionina sulfossido (Levine et al., 1996), mentre l'ossidazione di gruppi sulfidrilici di residui di cisteina determina la formazione di ponti disolfuro, che possono causare aggregazione di proteine o peptidi. Queste modificazioni possono essere rimosse, dagli enzimi metionina sulfossido reduttasi (Levine et al., 1996) e proteina disolfuro isomerasi. Modificazioni dei gruppi SH delle cisteine in acido sulfonico e sulfinico, rappresentano modificazioni irreversibili. Si ritiene che il pool di glutatione intracellulare svolga un ruolo critico nella protezione dei gruppi sulfidrilici dall'ossidazione irreversibile.

Nell'invecchiamento la riduzione della concentrazione di glutatione (Chen et al., 2000) e la riduzione dei meccanismi degradativi possono determinare l'accumulo di proteine con gruppi sulfidrilici danneggiati.

2.4 La restrizione calorica come intervento anti-invecchiamento

All'inizio del ventesimo secolo, in un lavoro di Osborne et al. (1917) si osservava come una diminuzione dell'assunzione di cibo nei ratti ne ritardasse la crescita e ne incrementasse la durata della vita. Successivamente, negli anni Trenta, McCay et al. (1935) mostrarono chiaramente come una marcata restrizione nell'assunzione di cibo nei ratti, a partire dallo svezzamento o nel periodo appena successivo, risultasse in un'estensione della durata della vita.

Comparati con i roditori alimentati *ad libitum* (AL), infatti, i processi fisiologici degli animali vecchi sottoposti a restrizione calorica (CR) sono più simili a quelli degli animali giovani (Masoro, 2005). Questo aspetto è stato interpretato come l'evidenza che la CR rallenta la progressione dell'invecchiamento. La CR, è, inoltre, in grado di rallentare o impedire la progressione di molte patologie correlate all'invecchiamento, incluse le neoplasie, le malattie neurodegenerative e quelle immunitarie (Maeda et al., 1985; Bronson and Lipman, 1991; Roe et al., 1995).

Fin dal 1935, molti meccanismi sono stati proposti come basi biologiche dell'azione di prolungamento della vita e dell'azione *anti-invecchiamento* delle CR. Tuttavia, nessun meccanismo è totalmente supportato da evidenze schiaccianti. È, invece, probabile che le azioni della CR coinvolga una combinazione dei seguenti meccanismi proposti.

IPOTESI DEL RITARDO DELLA CRESCITA Nel già citato lavoro del 1935 di McCay, era ipotizzato che la CR incrementasse la longevità dei ratti ritardandone la crescita. Questa ipotesi venne in parte sconfessata dal gruppo di Walford (Weindruch and Walford, 1982), che mostrava come la CR iniziata a 12 mesi di età estende significativamente la durata della vita nei topi, ma non così marcatamente rispetto alla CR iniziata a partire dallo svezzamento o nel periodo successivo. Tale ipotesi è stata riproposta solo recentemente, perché uno studio di Miller et al. (2002), mostra come in una popolazione di topi geneticamente eterogenea, il peso dell'animale a 2 mesi di età sia significativamente predittivo della longevità.

IPOTESI DELLA RIDUZIONE DEL GRASSO CORPOREO Berg and Simms (1960) ipotizzarono che l'estensione della vita da parte della CR sia dovuta ad un decremento nel contenuto di grasso corporeo. Tuttavia Bertrand et al. (1980) non hanno riportato alcuna correlazione tra la quantità di grasso corporeo e la lunghezza della vita di ratti maschi F344 alimentati AL mentre è stata osservata una correlazione positiva nei ratti maschi dello stesso ceppo mantenuti ad un regime di CR. Recentemente, il gruppo di Guarente ha messo in luce il ruolo di una proteina sirtuina ad attività deacetilasica, SIR2, necessaria per l'azione di estensione della durata della vita ad opera della CR (Lin et al., 2004). Inoltre, Picard et al. (2004) hanno mostrato come l'azione deacetilasica diminuisca la deposizione di grasso ed ne aumenti la mobilizzazione, determinando in tal modo una riduzione nella massa grassa nel tessuto adiposo bianco dei mammiferi e ristabilendo così la possibile validità di questa ipotesi nella spiegazione dell'azione della CR.

IPOTESI DELLA RIDUZIONE DEL TASSO METABOLICO Sacher (1977) propose che la CR fosse in grado di estendere la durata della vita riducendo il tasso metabolico, basandosi su molti studi in cui si osservava che la riduzione dell'assunzione di cibo nell'uomo ne diminuisse il tasso metabolico (Garrow, 1978). Tuttavia, numerosi studi hanno mostrato come il tasso metabolico per grammo di massa magra diminuisca con l'inizio della CR, ma ritorni pari a quello degli animali AL con il continuo della CR (Masoro et al., 1982; McCarter and Palmer, 1992), confutando così tale ipotesi.

IPOTESI DELL'ATTENUAZIONE DEL DANNO OSSIDATIVO Harman (1956) propose che l'invecchiamento sia causato dal danno ad opera dei radicali liberi. Come detto in precedenza, le ROS possono danneggiare importanti molecole biologiche quali DNA, proteine e lipidi, alterando le funzioni cellulare. È, ormai largamente provato che le CR ritardino l'accumulo età-correlato delle molecole danneggiate dallo stress ossidativo nei roditori (Yu, 1996). Questa attenuazione dell'accumulo del danno ossidativo può essere spiegata come il risulato sia di una riduzione del tasso di generazione delle ROS, sia da un incremento nell'attività di riparo o dell'efficienza dei processi protettivi (Masoro, 2005).

IPOTESI DELL'ALTERAZIONE DEL SISTEMA GLUCOSIO-INSULINA Già dal 1990, è noto che i livelli di glucosio ed insulina plasmatici a digiuno sono più bassi nei roditori sottoposti ad un regime di CR. È ormai, chiaramente provato che l'azione della CR si esplichi effettivamente mantenendo un livello di insulina più basso attraverso tutta la durata della vita (Masoro, 2005).

ALTERAZIONE DELL'ASSE GH (GROWTH HORMONE, ORMONE DELLA CRESCITA)-IGF-I (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I, FATTORE DI CRESCITA INSULINO SIMILE) All'inizio degli anni Novanta, il gruppo di Bill Sonntag riportava che la CR determinava livelli marcatamente più bassi di IGF-I in topi e ratti (Breese et al., 1991; Sonntag et al., 1992). Tale ipotesi è stata successivamente supportata da uno studio di Coschigano et al. (2000), in cui topi in cui era stato il gene del recettore del GH, mostravano alti livelli plasmatici di GH, livelli molto bassi di IGF-I ed un estensione nella durata della vita.

IPOTESI DELL'ORMESI L'ormesi è l'azione benefica che risulta dalla risposta di un organismo ad uno stressore di bassa intensità. Molti studi supportano questa ipotesi. Innanzitutto, molte ricerche suggeriscono che la CR rappresenti uno stressore (Sabatino et al., 1991). Inoltre, i roditori a CR esibiscono una maggiore capacità nella risposta a forti stress, come operazioni chirurgiche, agenti tossici (Masoro, 1998, Berg et al., 1994). In tal senso, l'ipotesi dell'ormesi sembra quindi abbracciare molte delle altre ipotesi proposte.

[3]IPOSSIA

3.1 HIF-1

3.1.1 Struttura di HIF-1

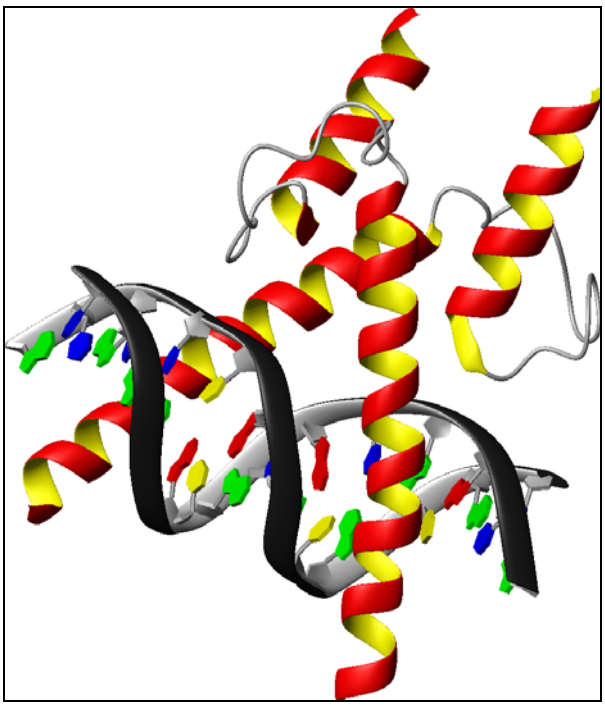
HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) è un fattore trascrizionale che svolge un ruolo chiave nel garantire l'omeostasi di ossigeno nelle cellule di mammifero (Semenza, 2001); è stato identificato in tutte le specie di metazoi che sono state analizzate, da *Caenorhabditis elegans* a *Homo sapiens,* suggerendo il fatto che tale molecola ha rappresentato un adattamento essenziale nell'evoluzione dei metazoi (Semenza, 2004).

La sua funzione principale è quella di aumentare l'espressione di numerosi geni *target* importanti nell'adattamento e nella sopravvivenza della cellula sottoposta a condizioni di carenza di ossigeno (ipossia). Fino ad oggi sono stati scoperti numerosi geni indotti da HIF-1 coinvolti nell'angiogenesi, nel metabolismo glucidico, nel rimodellamento vascolare, nell'eritropoiesi, nel metabolismo del ferro (Semenza, 2003; Ke and Costa, 2006).

HIF-1 è stato identificato per la prima volta in cellule sottoposte ad ipossia come fattore legante il gene dell'eritropoietina, un ormone che stimola la proliferazione degli eritrociti (Goldberg et al., 1988; Semenza et al., 1991; Wang et al., 1995); solo successivamente è stata osservata la sua interazione con altri geni coinvolti nelle risposte ipossiche.

Tale fattore trascrizionale è un eterodimero costituito da due componenti: una subunità α di peso molecolare pari a 120 KDa ed una subunità β di circa 91-94 KDa conosciuta anche come ARNT (aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator) (Wang and Semenza, 1995; Wang et al., 1995); entrambe le subunità appartengono alla famiglia proteica bHLH-PAS (acronimo che sta per basic-helix-loop-helix Per-ARNT-Sim), che comprende tutte quelle proteine caratterizzate da un dominio elica-ansa-elica ed un dominio PAS (Wang et al., 1995).

Fig.10 ***Struttura di HIF-1***
(*www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/hypoxia/structure.html*)



HIF-1 è dotato di diversi domini funzionali importanti per la dimerizzazione, regolazione e attivazione della trascrizione (figura 10). Sia HIF-1α che HIF-1β sono caratterizzati da una stessa regione amino terminale (N-terminale) che presenta un dominio bHLH e due domini PAS, PAS-A e PAS-B, necessari per la dimerizzazione delle

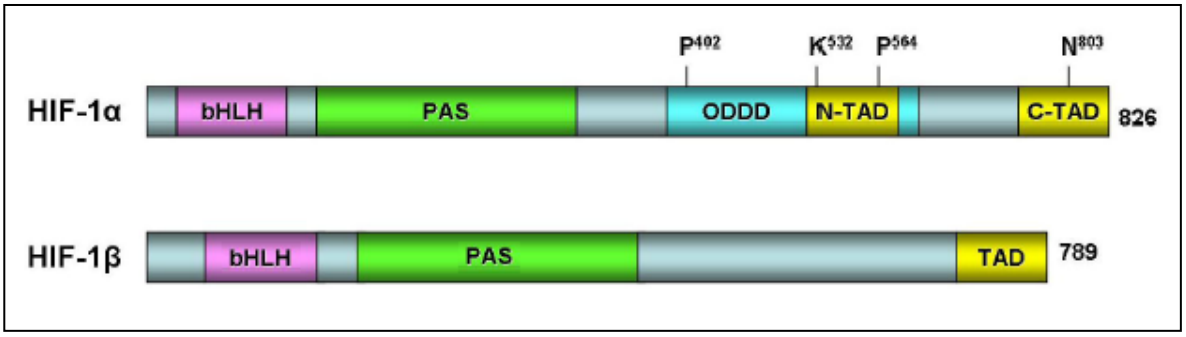
due subunità e per il legame con la sequenza consensus (HRE, hypoxia-response element) presente sul promotore del gene bersaglio (Lee et al., 2004; Jiang et al., 1996).

La parte carbossi terminale (C-terminale) distingue le due subunità: HIF-1α, infatti, è dotata di domini importanti nell'attivazione trascrizionale e nella degradazione che sono assenti nella subunità β; sono denominati C-TAD (carboxyl-terminal transactivation domain, residui aminoacidici 786-826), N-TAD (amino-terminal transactivation domain, residui 531-575) ed ODD (oxygen-dependent degradation domain, residui 401-603). I domini di transattivazione, in particolare C-TAD, interagiscono con coattivatori, quali CBP/p300, SRC-1 e TIF-2, favorendo l'attivazione trascrizionale (Arany et al., 1996; Carrero et al., 2000; Ruas et al., 2002); questi due domini sono fiancheggiati da una regione inibitoria che, quando viene deleta, incrementa la funzione dei domini N-TAD e C-TAD in condizioni normossiche (Pugh et al., 1997; Semenza, 1999).

Il dominio ODD, che si sovrappone parzialmente con N-TAD, è coinvolto nella degradazione della componente α (Jiang et al., 1997; Huang et al., 1998; Bardos and Ashcroft, 2004).

HIF-1β assolve la funzione di partner nella dimerizzazione; pur essendo un traslocatore nucleare, non è richiesto nel trasferimento al nucleo di HIF-1α (Chilov et al., 1999), anzi è la stessa subunità α che entra autonomamente nel nucleo grazie a sequenze di localizzazione nucleare presenti sia nella metà N-terminale e sia in quella C-terminale (rispettivamente i residui 17-74 e 718-721) (Kallio et al., 1998).

Fig.11 ***Domini funziOnali delle subunità HIF-1α e HIF-1β (Ke and Costa, 2006)***



Oltre ad HIF-1α, sono stati recentemente scoperti altri membri appartenenti alla famiglia bHLH-PAS. HIF-2α, conosciuto anche come EPAS (endothelial PAS protein), condivide molte somiglianze con HIF-1α: ha il 48% di omologia nella sequenza aminoacidica, ha la stessa regolazione ossigeno-dipendente, dimerizza con HIF-1β e lega la sequenza HRE (Ema et al.,1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997). Al contrario di HIF-1α che è espresso in maniera ubiquitaria in tutte la cellule, HIF-2α è principalmente localizzato nei polmoni, nell'endotelio e nei corpi carotidei (Ema et al.,1997; Tian et al., 1997; Tian et al., 1998).

HIF-3α pur condividendo alcune caratteristiche con HIF-1α (degradazione, dimerizzazione, legame ad HRE), sembra agire da regolatore negativo (Gu et al., 1998). È stata identificata una variante di splicing di HIF-3α, chiamata IPAS (inhibitory PAS domain protein), priva del dominio di transattivazione ed espressa principalmente nelle cellule del Purkinjie, nel cervelletto e nell'epitelio corneale; IPAS interagisce con la regione N-terminale di HIF-1α impedendo l'associazione con HRE e l'espressione dei geni *target* (Makino et al., 2001). È stato osservato che IPAS può contribuire alla regolazione di HIF-1α mediante un meccanismo feedback negativo in diversi distretti, tra i quali cuore e polmoni (Makino et al., 2002).

3.1.2 Regolazione di HIF-1

La regolazione di HIF-1 si basa sulla modulazione della subunità α mediante due meccanismi principali: un meccanismo ossigeno-dipendente che influenza la degradazione e l'attività di HIF-1α ed uno ossigeno-indipendente che, invece, agisce a livello della sua sintesi.

Regolazione ossigeno-dipendente

HIF-1α è una proteina O_2-dipendente dal momento che la sua degradazione, stabilità e attività sono influenzate dalla presenza o meno di ossigeno, diversamente dalla subunità β che risulta essere costitutivamente espressa e i cui livelli proteici e di mRNA rimangono costanti indipendentemente dall'ossigeno (Li et al., 1996). In condizioni normossiche (21% di O_2) la subunità α ha un'emivita piuttosto breve (circa 5 minuti) poiché subisce delle modificazioni posttraduzionali che favoriscono la sua poliubiquitinazione e successiva degradazione proteosomale (Wang et al., 1995); la trascrizione e la sintesi della proteina, invece, non sembrano essere influenzati dalle variazioni di ossigeno (Kallio et al., 1997; Wang et al., 1995).

La regolazione ossigeno-dipendente della subunità α (figura 12) è mediata dall'attività di un enzima: la prolina-4-idrossilasi. Nell'uomo sono presenti tre isoforme diverse chiamate PHD 1-3 (prolyl hydroxylase domain protein 1-3) oppure HPH 1-3 (HIF-1α prolyl hydroxylase 1-3) (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Huang et al., 2002); esse appartengono alla famiglia delle diossigenasi 2-oxoglutarato (α-chetoglutarato) dipendente e, per poter esplicare la loro azione, necessitano di ossigeno, 2-oxoglutarato, di Fe^{2+} e ascorbato come cofattori (Schofield and Zhang, 1999). Il processo di idrossilazione, infatti, consiste nello scindere l'O_2 in modo tale che un atomo venga trasferito al residuo prolinico mentre l'altro vada a legarsi al 2-oxoglutarato dando origine al succinato. Il Fe^{2+}, coordinato con due residui di istidina ed un aspartato, è importante per l'attività dell'enzima: la ridotta disponibilità del ferro bivalente dovuta all'azione di agenti chelanti o di suoi sostituenti (Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}) impedisce l'interazione con l'ossigeno bloccando l'attività enzimatica (Semenza, 2004; Schofield and Ratcliffe, 2005; Masson and Ratcliffe, 2003); questa situazione è definita *ipossia chimica* in quanto mima l'effetto della carenza di ossigeno (aumento dei livelli di HIF-1α) pur in presenza di condizioni normossiche. L'ascorbato aiuta a mantenere il ferro allo stato ferroso (Fe^{2+}) ed è importante nel mantenimento della piena attività delle PHD (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001).

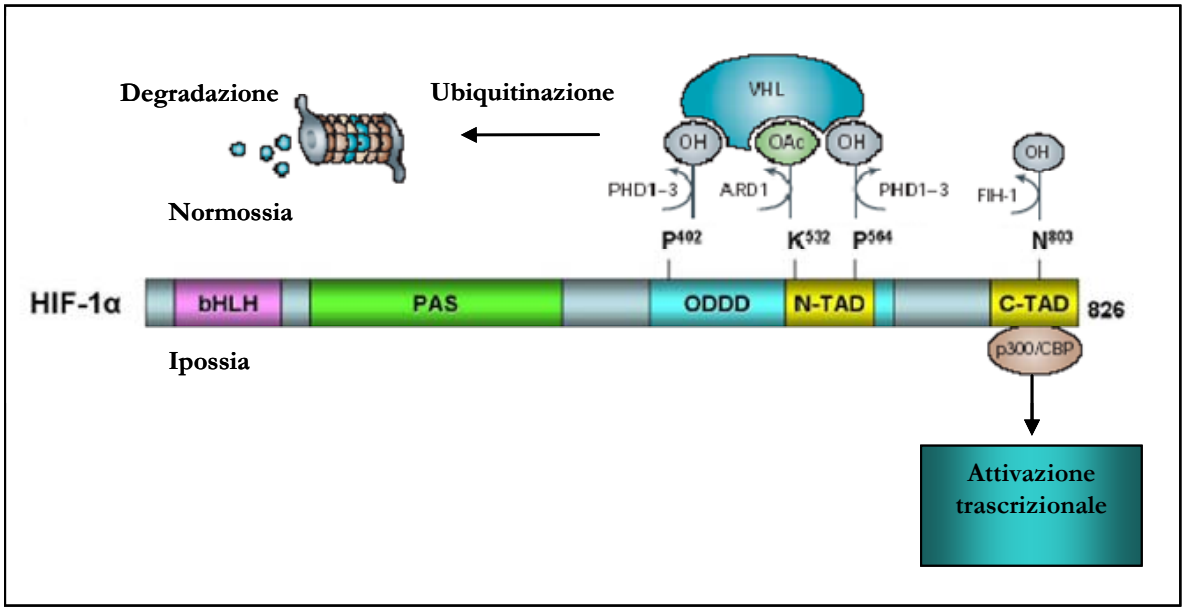
In condizioni di normossia le PHD vanno ad idrossilare specifici residui di prolina presenti all'interno del domino ODD (P402 e P564); tali residui prolinici fanno parte di una sequenza aminoacidica consenso costituita da Leucina-X-X-Leucina-Alanina-Prolina (Masson and Ratcliffe, 2003; Masson et al., 2001). L'idrossilazione prolinica è necessaria per il riconoscimento e interazione di HIF-1α con pVHL (Von Hippel Lindau protein): pVHL è un componente di un complesso multiproteico utilizzato nel trasferimento di ubiquitine a proteine bersaglio; il complesso è formato da elongina B, elongina C, cullina 2, RBX e pVHL e costituisce una E3-ubiquitina ligasi. Il legame tra pVHL e HIF-1α idrossilata causa la poliubiquitinazione della subunità proteica indirizzandola al proteosoma 26S dove verrà degradata (Kamura et al., 2000). È stato osservato che cellule di carcinoma renale prive di una pVHL funzionale mostrano un'espressione costitutiva di HIF-1α e dei suoi geni *target* anche in normossia (Cockman et al., 2000; Maxwell et al., 1999).

L'interazione con pVHL è favorita, anche, dall'acetilazione di un determinato residuo di lisina (K532) presente all'interno del dominio ODD, dovuta all'azione di un enzima, l'acetiltransferasi, chiamato ARD1 (arrest-defective-1) (Jeong et al., 2002); ciò è confermato anche dal fatto che la sostituzione della lisina con una arginina aumenta la stabilità di HIF-1α (Tanimoto et al., 2000).

Un altro meccanismo ossigeno-dipendente in grado di inibire l'azione di HIF-1α è l'idrossilazione di uno specifico residuo di asparagina (N803) presente all'interno di C-TAD ad opera di FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) (Hewitson et al., 2002); l'idrossilazione impedisce il legame con i coattivatori, in genere acetiltransferasi (CBP/p300), e quindi l'attivazione della funzione trascrizionale. FIH-1 è un enzima appartenente alla stessa famiglia delle PHD e quindi necessita di Fe^{2+} e di ascorbato per la sua attività enzimatica (Lando et al., 2002). Infine l'enzima può interagire con pVHL in modo da reclutare delle deacetilasi istoniche opponendosi all'azione acetiltransferasica dei coattivatori e contribuendo, così, al blocco dell'attività di HIF-1 (Hewitson et al., 2002; Sang et al., 2002).

In condizioni ipossiche, invece, tali modificazioni (idrossilazione e acetilazione) non possono avvenire e ciò aumenta la stabilità della molecola; una volta stabilizzata, HIF-1α entra nel nucleo, dimerizza con la subunità β e va ad aumentare l'espressione dei geni bersaglio.

Fig.12 ***Regolazione ossigeno-dipendente di HIF-1α (Semenza, 2003 e Ke and Costa, 2006 modificata)***



In conclusione, la regolazione ossigeno-dipendente agisce su due aspetti fondamentali di HIF-1: la degradazione della molecola e la sua attività trascrizionale; quindi, per avere una molecola funzionale è necessario non solo garantire la sua stabilità ma anche la sua capacità di interagire con coattivatori, indispensabili per il corretto funzionamento. Inoltre, la presenza di enzimi ossigeno-dipendenti, quali PHD e FIH-1, suggerisce come tali proteine possano agire da sensori dell'ossigeno, fondamentali per una risposta immediata a variazioni dell'ambiente extracellulare.

Regolazione ossigeno-indipendente

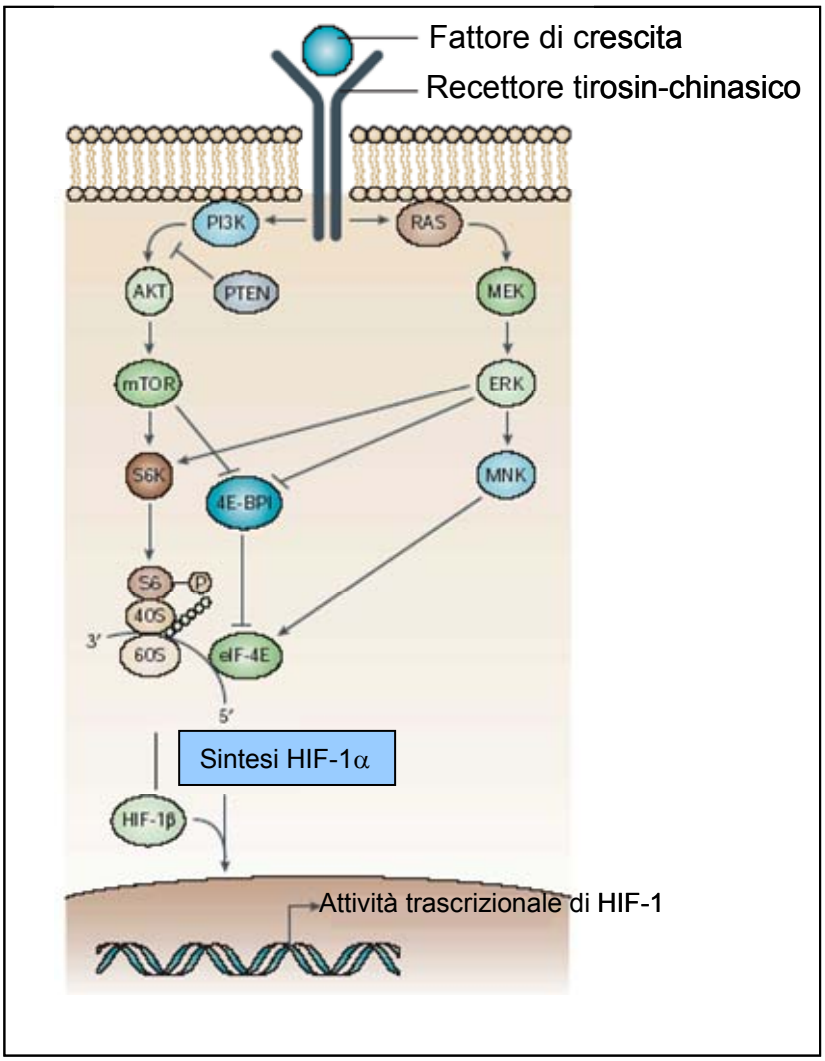
La subunità HIF-1α può essere regolata anche da meccanismi ossigeno indipendenti. È stato visto che molti fattori di crescita e citochine possono indurre l'attivazione di HIF-1α anche in condizioni normossiche (Wenger et al., 2002); tra questi fattori vanno ricordati: l'insulina (Zelzer et al., 1998), IGF1 e IGF2 (insulin-like growth factor 1, 2) (Feldser et al., 1999), EGF (epidermal growth factor) (Zhong et al., 2000), FGF2 (fibroblast growth factor 2), IL1β (interleukin 1β) (Stiehl et al., 2002), il TNFα (tumor necrosis factor α) (Hellwig-Burgel et al., 1999), l'angiotensina II, la trombina (Gorlach et al., 2001), HGF (hepatocyte growth factor) (Tacchini et al., 2001).

L'aumento dei livelli di HIF-1α conseguente alla stimolazione dei fattori di crescita differisce da quello in risposta all'ipossia per due motivi fondamentali: l'ipossia, infatti aumenta la concentrazione della subunità α in tutti i tipi cellulari, la stimolazione dei fattori di crescita, invece, induce un'espressione cellulo-specifica. Mentre l'ipossia è associata alla diminuzione della degradazione di HIF-1α, i fattori di crescita, le citochine ed altre molecole segnale ne stimolano la sintesi mediante l'attivazione di due vie di trasduzione del segnale: la via della PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) e la via delle MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Li et al., 2004; Zelzer et al., 1998).

Il meccanismo di attivazione di HIF-1 mediato da fattori di crescita è piuttosto complesso: coinvolge recettori tirosin-chinasici e numerosi fattori citoplasmatici e nucleari che vengono attivati attraverso una cascata di reazioni, che conduce ad un aumentato livello di mRNA della subunità alfa di HIF-1 (Semenza, 2003) (figura 13).

Tale via di traduzione del segnale non interviene solamente nell'induzione della sintesi di HIF-1α; è noto che la subunità α vada incontro a fosforilazione ad opera della via di segnale delle MAPK: è stato osservato *in vitro* che HIF-1α/HIF-2α vengono fosforilate da p42/p44 (Erk2/Erk1) e dalla chinasi p38 (Richard et al., 1999; Sodhi et al., 2000). Sembra che la fosforilazione non abbia influenza sulla stabilità della proteina o sul legame al DNA, ma piuttosto aumenti l'attività trascrizionale, probabilmente perché HIF-1β si legherebbe in modo preferenziale alla componente α fosforilata (Suzuki et al., 2001).

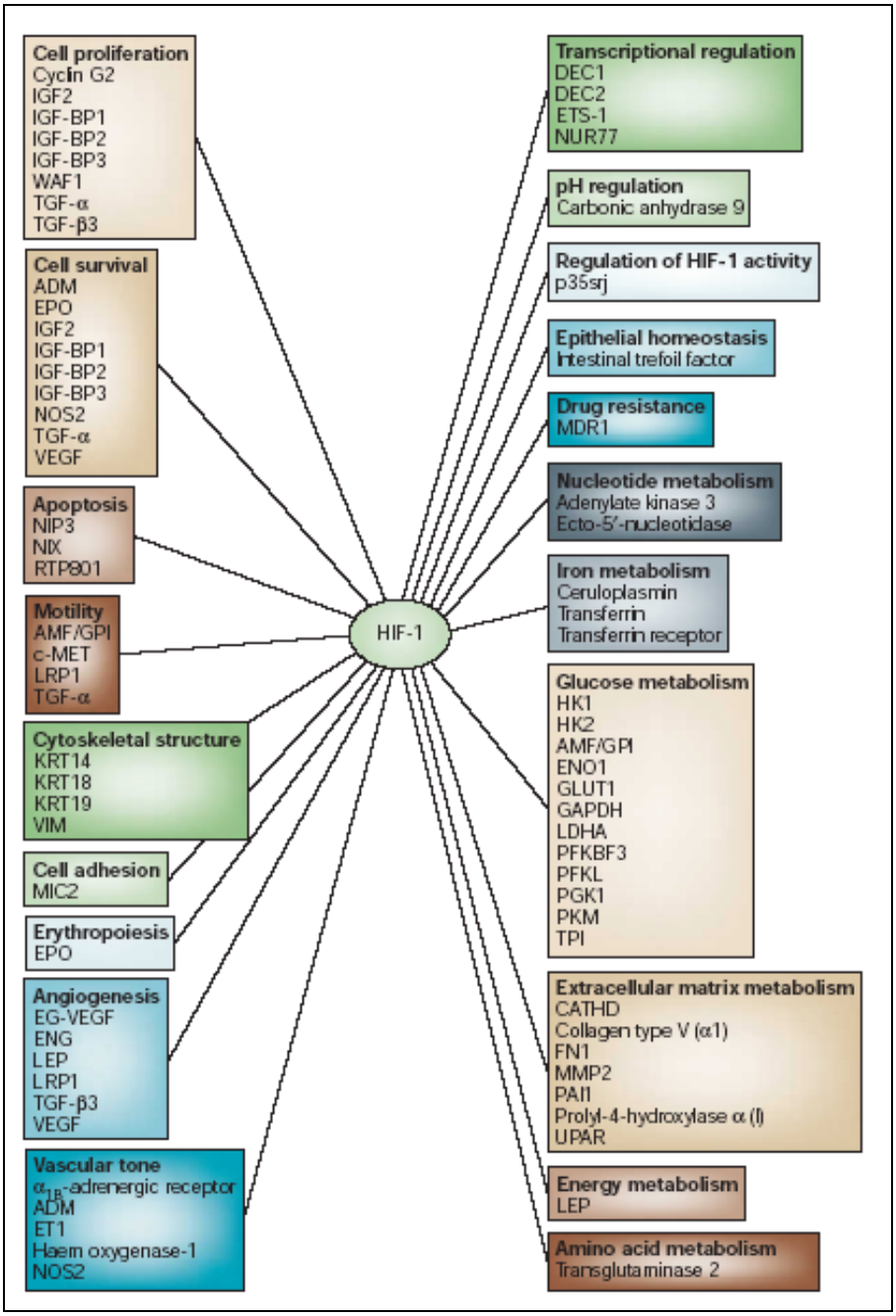
Fig.13 ***Regolazione ossigeno-indipendente di HIF-1α (Semenza, 2003 modificata)***



3.1.3 Funzione di HIF-1

Una volta stabilizzato e attivato, HIF-1 si lega ad una sequenza consensus (5'-RCGTG-3') presente all'interno di HRE (hypoxia-response element) dei geni bersaglio regolati dall'ossigeno (Wang et al., 1995). In questo contesto verranno analizzati i principali geni bersaglio la cui espressione viene aumentata grazie all'attivazione di HIF-1; nella figura 14 sono riportati alcuni dei principali geni bersaglio di HIF-1.

Fig.14 ***Principali geni bersaglio di HIF-1 (Semenza, 2003)***



Eritropoiesi e metabolismo del ferro

L'aumento dell'espressione dei geni coinvolti nell'eritropoiesi e nel metabolismo del ferro favorisce un incremento della capacità dei globuli rossi di trasportare l'ossigeno a tutte le cellule dell'organismo.

L'eritropoietina, un ormone glicoproteico dal peso molecolare di 30,4 kDa, è prodotto dal fegato durante la vita fetale mentre nell'adulto è secreto dal rene; questo ormone è un regolatore umorale della produzione di globuli rossi in quanto stimola l'eritropoiesi. In condizioni ipossiche, le cellule secernenti eritropoietina sono stimolate da HIF-1 a sintetizzarla ed a secernerla (Wang et al., 1995; Semenza et al., 1991); l'ormone secreto circola nel sangue e si lega a recettori espressi in modo specifico sulle cellule eritroidi progenitrici presenti nel midollo osseo, promuovendone l'attivazione, la proliferazione ed infine la differenziazione in eritrociti.

Il ferro è un componente importante del gruppo eme, presente nelle molecole di emoglobina e mioglobina ed essenziale nell'interazione con l'ossigeno. Il ferro è anche uno dei fattori limitanti nell'eritropoiesi. In condizioni ipossiche HIF-1 agisce sia sul gene della transferrina, proteina trasportatrice del ferro, sia sul gene codificante il

recettore della transferrina (Rolfs et al., 1997; Bianchi et al., 1999; Tacchini et al., 1999); in questo modo sono promossi il trasporto e l'assorbimento del ferro da parte dei tessuti emopoietici (fegato e milza nell'embrione, colonna vertebrale, le coste, la pelvi e le estremità prossimali delle ossa lunghe nell'adulto). Inoltre HIF-1 stimola la trascrizione della ceruloplasmina, una ferrossidasi che catalizza l'ossidazione del ferro convertendolo dallo stato ferroso (Fe^{2+}) allo stato ferrico (Fe^{3+}); questo risulta positivo perché solo il Fe ferrico può legarsi con la transferrina ed essere quindi trasportato. (Lok and Ponka, 1999; Wenger, 2002).

Angiogenesi

L'ipossia stimola la formazione di nuove strutture vascolari (angiogenesi) consentendo un maggior afflusso di sangue (e quindi di ossigeno) a tutte le cellule dell'organismo. Uno dei maggiori fattori angiogenetici è VEGF (vascular endothelial growth factor), la cui funzione è quella di richiamare le cellule endoteliali in un'area ipossica e priva di vasi, stimolandone la proliferazione (Conway et al., 2001; Josko et al., 2000; Neufeld et al., 1999). In realtà i meccanismi coinvolti nell'induzione dell'angiogenesi sono molto più complessi della semplice espressione di VEGF; HIF-1, infatti, aumenta la trascrizione di diversi geni coinvolti in questo processo: induce l'espressione della NOS2 (nitric oxide synthase 2) (Melillo et al., 1995), dell'eme ossigenasi 1 (Lee et al., 1997), dell'ET1 (endothelin 1) (Hu et al., 1998), la quale, agendo su un recettore specifico (ET_AR), promuove la sintesi ed il rilascio di VEFG, amplificando l'effetto angiogenetico.

Proliferazione cellulare e apoptosi

HIF-1 sembra svolgere un duplice ruolo sul ciclo cellulare: da una parte stimola la proliferazione cellulare, dall'altra promuove l'apoptosi. Come è stato sottolineato precedentemente, diversi fattori di crescita ed altri stimoli esterni promuovono la sintesi di HIF-1α mediante due vie principali: quella mediata dalla PI3K e quella mediata dalle MAPK. Tali pathway contribuiscono non solo alla sintesi della subunità α e alla sua attività (mediante la fosforilazione), ma anche alla sopravvivenza e proliferazione cellulare (Semenza, 2003).

Paradossalmente HIF-1 induce anche morte cellulare attraverso l'apoptosi. L'ipossia indurrebbe l'incremento HIF-1-mediato dell'espressione di Nip3, un gene pro-apoptotico appartenente alla famiglia Bcl-2 (Bruick, 2000); inoltre è stata dimostrata una correlazione tra l'espressione di HIF-1 e quella di fattori favorenti la morte programmata, come caspasi 3, Fas e ligando di Fas (Volm and Koomagi, 2000).

La carenza di ossigeno indurrebbe anche un aumento della stabilità di p53, un fattore trascrizionale coinvolto in seguito a danno del DNA che induce arresto del ciclo cellulare (mediante p21) ed apoptosi attraverso la trascrizione di geni pro-apoptotici (Graeber et al., 1994). Inoltre è stata dimostrata un'associazione diretta tra p53 ed il dominio ODD di HIF-1α che favorirebbe la maggiore stabilità ed attivazione di p53 (An et al., 1998; Hansson et al., 2002; Goda et al., 2003).

D'altro canto, è stato riportato in diversi lavori che l'ipossia può indurre proliferazione in cellule di epatoma umano (Gwak et al., 2005) o ridurre la morte apoptotica in cellule HepG2 (cellule di epatoma umano) (Piret et al., 2002a). Gwak e i suoi collaboratori hanno dimostrato che cellule di epatocarcinoma (per esempio le linee cellulari HepG2, Huh-BAT, SNU-475) mostrano un'efficiente proliferazione in condizioni ipossiche dovuta ad un'induzione di HK II (hexokinase II), enzima della via glicolitica, mediata da HIF-1. Tali linee cellulari sono state sottoposte a condizioni ipossiche (1% di O_2, 5% di CO_2 e 94% di N_2) per tempi diversi (da 12 a 48 ore): in ipossia si osserva un aumento di HIF-1α e di HK II che risulta assente in presenza dell'inibitore della subunità α. Piret e il suo gruppo di ricerca (2002a) hanno dimostrato come la carenza di ossigeno o la stimolazione con $CoCl_2$ favorirebbero la stabilità e l'attivazione di HIF-1 e che tale effetto proteggerebbe le cellule HepG2 dalla morte apoptotica: ciò è stato dimostrato non solo attraverso l'osservazione morfologica ma anche dalla verifica di diversi parametri apoptotici, quali l'attivazione delle caspasi.

Da questi dati possiamo dedurre che HIF-1 svolge il duplice ruolo di fattore pro- ed anti-apoptotico: in condizioni di grave ipossia (anossia) o per prolungati periodi, sembra favorita l'associazione tra HIF-1α e p53 e quindi l'apoptosi; brevi periodi di ipossia stimolerebbero la dimerizzazione fra le due subunità di HIF-1 e l'aumento dell'espressione dei geni ipossia inducibili (Piret et al., 2002b).

Metabolismo glucidico

Quando le cellule sono sottoposte a carenza di ossigeno, il processo metabolico predominante è la glicolisi, che si sostituisce al meccanismo O_2 dipendente degli acidi tricarbossilici (Dang and Semenza, 1999; Seagroves et al., 2001). Molti geni coinvolti nel riassorbimento del glucosio e nella glicolisi sono stati identificati come geni bersaglio di HIF-1 (Wenger, 2002). HIF-1 regola l'espressione di tutti gli enzimi del processo glicolitico e delle molecole deputate al trasporto del glucosio quali GLUT1 e GLUT3 (glucose transporter 1, 3) (Chen et al., 2001). Inoltre, è stato

dimostrato che i prodotti metabolici della glicolisi, quali lattato e piruvato, determinerebbero l'accumulo di HIF-1α in normossia e la regolazione dell'espressione dei geni ipossia-inducibili, suggerendo un possibile meccanismo a feedback positivo (Lu et al., 2002).

[4]SVILUPPO E DIFFERENZIAMENTO

Gli organismi pluricellulari non vengono generati già completamente formati, al contrario essi hanno origine da un lento processo costituito da cambiamenti progressivi, chiamato sviluppo. Lo sviluppo assolve a due funzioni principali:generare la diversità e l'ordine delle cellule all'interno di ogni generazione, ed assicurare la continuità della vita da una generazione alla successiva. La prima funzione comporta la produzione e l'organizzazione di tutti i tipi diversi di cellule del corpo. Una singola cellula, l'uovo fecondato, dà origine a cellule muscolari, cellule epidermiche, neuroni, linfociti, cellule ematiche e tutti gli altri tipi di cellule. Tale genesi della diversità cellulare è chiamata differenziamento.

4.1 Lo sviluppo del fegato

Durante lo sviluppo embrionale, il sacco vitellino ricopre le funzioni precoci del fegato; quindi, il fegato rappresenta il sostituto del sacco vitellino (Elias and Sherrick, 1969) ed in ogni vertebrato, il fegato sviluppa una stretta associazione con questo.

Nell'embrione umano, il fegato gemma o il diverticolo epatico si sviluppa al diciottesimo giorno di gestazione come ispessimento dell'endotelio endoblastico nella parete ventrale della parte prossimale dello stomaco (Dubois, 1963). A questo stadio precoce dello sviluppo, viene espresso lo mRNA della α-fetoproteina, destinando questa parte dello stomaco ventrale alla linea delle cellule epatiche (Shiojiri et al., 1991). La parte caudale del diverticolo epatico dà origine al dotto biliare e alla cistifellea; la parte rostrale forma escrescenze irregolari di epatoblasti che invadono il setto trasverso, uno strato di mesenchima che separa il cuore che si sta sviluppando dal sacco vitellino. Le cellule precursori del fegato crescono tra piccoli spazi avvolti da endotelio collegati al plesso capillare delle vene vitelline, gettando così le basi dell'architettura del parenchima epatico.

Nel ratto, la traduzione del trascritto della α-fetoproteina nel prodotto proteico si ritrova per la prima volta quando i cordoni epatici sono formati, mentre lo mRNA dell'albimina un giorno più tardi (Shiojiri et al., 1991).

Gli epatoblasti precoci nell'uomo sono caratterizzati dall'espressione delle citocheratine 8, 18 e 19 (Marceau et al., 1992). La via del differenziamento degli epatociti porta poi alla perdita graduale della citocheratina 19 (Desmet et al., 1990). I canalicoli bilari intercellulari, sono inizialmente rivestiti da molte cellule ed appaiono a partire dalla settima all'ottava settimana di gestazione. La sintesi degli acidi bilari inizia verso la dodicesima settimana (Suchy et al., 1987). La capacità di trasporto dell'acido biliare appare tardi nello sviluppo fetale ed aumenta drammaticamente in proporzione all'espressione di una proteina di trasporto dell'acido biliare (Von Dippe and Levy, 1990). Nella fase iniziale, l'espressione di geni epatociti specifici è soggetta ad una complessa regolazione a livello trascrizionale e tradizionale (Van Roon et al., 1989) ed è regolata dalle interazioni tra gli epatoblasti ed il mesenchima (Reif et al., 1990). Per molti enzimi, l'etereogenità tra epatociti periportali e pericentrali si sviluppa solo gradualmente durante la vita postatale precoce.

Una parte minore degli epatoblasti primitivi destina sé stessa alla linea delle cellule del dotto biliare. Durante le prime sette settimane di vita dell'embrione, non ci sono dotti biliari intraepatici. L'albero biliare intraepatico si sviluppa in stretta associazione con la vena portale in sviluppo. Gli epatoblasti in contatto con il mesenchima che circonda le ramificazioni della vena portale si trasformano in cellule del dotto biliare, con aumentata espressione delle citocheratine 8, 18 e 19, e successivamente della citocheratina 7 e *marker* addizionali fenotipici biliari. Il cilindro iniziale di epitelio del dotto biliare che circonda la vena portale è gradualmente rimodellato fino a formare i dotti biliari che vengono incorporati nel mesenchima (Van Eyken et al., 1988).

Quindi, riassumendo i dotti biliari intrepatici si sviluppano dagli epatoblasti in contatto con il mesenchima periportale durante l'intero periodo dello sviluppo fetale. La completa maturazione delle ramificazioni più fini del dotto biliare non è completamente raggiunta alla nascita e richiede alcune settimane aggiuntive durante la vita postatale nell'uomo.

I sinusoidi epatici iniziali sono rivestiti da endotelio. Altri tipi di cellule diventano identificabili durante il terzo mese di gestazione. Le cellule di Kupffer sembrano originare dai macrofagi primitivi derivati dal sacco vitellino che colonizzano il fegato o potrebbero svilupparsi *in loco* da cellule staminali ematopoietiche. Le cellule di Ito compaiono dalla sesta all'ottava settimana di gestazione (Bioulac-Sage et al., 1988).

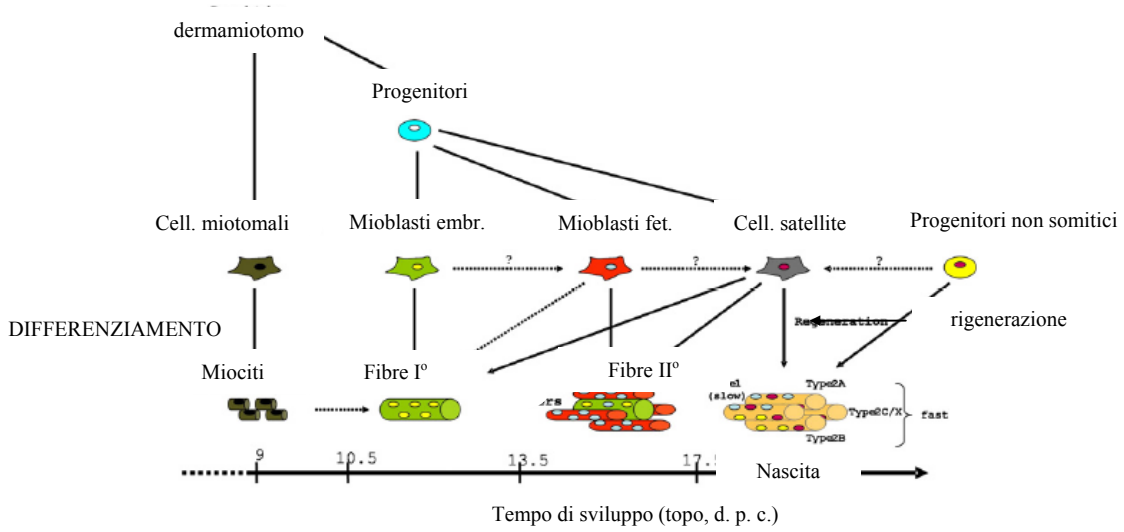
Le vene vitelline afferenti divengono la vena portale. La rete sinusoidale si forma da rami venosi confluenti, che si sviluppano poi nelle vene epatiche.

4.2 Lo sviluppo del muscolo scheletrico

Lo sviluppo del muscolo scheletrico è regolato da fattori di crescita extracellulari che trasmettono segnali ancora largamente sconosciuti nella cellula agendo sul programma di trascrizione muscolare. La formazione del muscolo scheletrico dal somite che si sta sviluppando è un processo con passaggi multipli in cui cellule del mesoderma pluripotenti sono destinate a diventare cellule della linea miogenica attraverso segnali che provengono dai tessuti vicini. Questi segnali, includono Wnts, BMP4 (da Bone Morphogenic Protein 4, Proteina Morfogenica delle Ossa 4),

Sonic Hedgehog and Noggin, che determinano l'espressione di fattori di trascrizione della famiglia MyoD e Myf5 nelle cellule e le fanno trasformare in mioblasti. Come schematizzato nella Figura 15 la formazione del muscolo scheletrico è un processo multifasico che coinvolge un gran numero mioblasti (cellule muscolari indifferenziate).

Fig.15: ***Schema delle linee cellulari durante la miogenesi. Le cellule satellite (che derivano dalle cellule che coesprimono Pax3 e Pax7), appaiono alla fine della gestazione e sono responsabili della crescita post-natale e della rigenerazione (Biressi et al., 2007 modificata).***



Nelle prime fasi della formazione del somite, una qualsiasi delle sue cellule è in grado di dare origine a qualsiasi struttura di derivazione somitica. Tuttavia, man mano che il somite matura, le varie regioni del somite diventano indirizzate alla formazione solo di determinati tipi di cellule. Le cellule somitiche più vicine al tubo neurale migrano ventralmente sotto la rimanente porzione epiteliale del somite, formando un duplice strato epiteliale il dermamiotomo. Lo strato dorsale di questa struttura è detto dermatomo, e darà origine al derma, mentre lo strato interno di cellule viene chiamato miotomo, dal quale originano i precursori miogenici (Gilbert, 1996). Solo una frazione di progenitori muscolari differenzia durante la formazione del miotomo primario. Questi tipi cellulari sono facilmente riconoscibili perché coesprimono Pax3 e Pax7 e sono in grado sia di differenziare in fibre muscolari scheletriche durante l'embriogenesi, sia di rimanere quiescenti ed attivarsi successivamente durante il periodo peri e post-natale. Topi doppi *knock-out* per Pax3 e Pax7 non mostrano alcun problema nella formazione del miotomo primario, ma si presenta seriamente compromessa la successiva fase della miogenesi (Biressi et al., 2007). Nel topo intorno all'undicesimo d. p. c. (*days post coitum*), i mioblasti embrionali invadono il miotomo e si fondono in miotubi, probabilmente incorporando i miociti mononucleati del miotomo precoce. Nello stesso momento, durante la fase che viene comunemente definita miogenesi primaria, i precursori miogenici cominciano a differenziare in fibre muscolari multi-nucleate, chiamate fibre primarie. Questa fase embrionale sembra essere regolata e dipendere da fattori che regolano la miogenesi MRF, fattori di trascrizione che appartengono alla famiglia delle *helix-loop-helix,* tra cui Myf5, MyoD, Mrf4 e miogenina. Topi *knock-out* per Myf5 non presentano anomalie per questa fase, anomalie che sono invece presenti in topi doppi *knock-out* per Mrf4 e Myf5. Mrf4 sembra quindi avere un ruolo essenziale nella regolazione della sola fase embrionale della miogenesi (Kassar-Duchossoy et al., 2004), mentre la miogenina ha un ruolo importante solo per il differenziamento nel periodo che precede la nascita (Knapp et al., 2006). Una nuova fase della miogenesi, chiamata miogenesi secondaria, si ha tra il 14,5 e 17,5 d. p. c. ed è caratterizzata dalla fusione dei mioblasti fetali tra di loro o con le fibre primarie, a formare le fibre secondarie, di diametro più piccolo di quelle primarie (Dunglison et al., 1999).

La miogenina e i membri della famiglia MEF2 cooperano nell'attivazione di molti geni strutturali del muscolo durante il differenziamento e la formazione di miotubi multinucleati (Keren et al., 2006).

Numerose vie di segnale sono coinvolte nella miogenesi. L'attivazione della via della p38/MAPK determina la fosforilazione di una serie di substrati che contribuiscono al processo di miogenesi. Ad esempio, la p38 è in grado di fosforilare le proteine MEF2 (Han et al., 1997; Zhao et al., 1999), inducendone le attività trascrizionali (Wu et al., 2000; Zetser et al., 1999); è in grado di fosforilare E47, promuovendone l'eterodimerizzazione con MyoD (Lluis et al., 2005). La p38 induce, inoltre l'espressione di Myf5 (Keren et al., 2006) ed agisce anche sul rimodellamento della cromatina a livello di *loci* muscolo-specifici, attraverso la fosforilazione e il reclutamento dei complessi SWI-SNF a livello delle regioni con i promotori dei geni muscolo-specifici (Simone et al., 2004; de la Serna, 2001;2005).

Una delle vie di segnale essenziali per il differenziamento così come per la sopravvivenza dei miotubi è la via della PI3-K (phosphoinositide 3-kinase, fosfoinositolo 3-chinasi) che agisce, a sua volta su bersagli a valle quali Akt e mTOR/p70S6 chinasi, inducendo la sintesi proteica ed incrementando in tal modo il compartimento citoplasmatico nelle fibre muscolari (Keren et al., 2006; Guttridge, 2004). Bersagli di questa via sono rappresentati da MEF2 e Tsc2, la cui fosforilazione ed in attivazione ad opera dell'Akt determina un aumento nella grandezza della cellula (Guttridge, 2004).

Anche la via delle ERK/MAPK sembra sia coinvolta nel differenziamento cellulare. La p38 è in grado di ridurre l'attività delle ERK portando all'uscita dal ciclo cellulare dei mioblasti (Keren et al., 2006).

[5]Gli OMEGA-3 sono acidi grassi polinsaturi (PUFA). I PUFA possono essere divisi in due categorie: acidi grassi ω-3 (o OMEGA-3 o n-3) ed acidi grassi ω-6 (o Omega 6 o n-6). Gli acidi grassi ω-3 presentano il loro primo doppio legame al terzo atomo di carbonio (C-3), mentre gli ω-6 presentano il loro primo doppio legame al C-6. (Harper et al., 2003). Gli acidi grassi ω -3 includono, l'acido α-linolenico (ALA) 18:3, l'acido eicosapentaenoico (EPA) 20:5, l'acido docosaesaenoico (DHA) 22:6. Questi tre polinsaturi presentano rispettivamente 3, 5 e 6 doppi legami in una catena carboniosa di 18, 20 e 22 atomi di carbonio.

BIBLIOGRAFIA

- Abul-Hajj YJ. (1981) Effect of estrogens on beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol levels. Steroids. 37:601-607
- Adams CM, Reitz J, DeBrabander JK, Feramisco JD, Brown MS, Goldstein JL. (2004) Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. J Biol Chem. 279:52772-52780
- Agarwal S, Sohal RS. (1994) Aging and protein oxidative damage. Mech Ageing Dev. 75:11-19
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) Molecular Biology of the Cell. New York and London: Garland Science
- Ames BN. (1989) Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. Free Radic Res Commun. 7:121-128
- Amici A, Levine RL, Tsai L, Stadtman ER. (1989) Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. J Biol Chem. 264:3341-3346
- An WG., Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. (1998) Stabilization of wild-type of p53 by hypoxia-inducible factor 1 alpha. Nature 392:405-408
- Andersen JM, Turley SD, Dietschy JM. (1982) Relative rates of sterol synthesis in the liver and various extrahepatic tissues of normal and cholesterol-fed rabbits. Relationship to plasma lipoprotein and tissue cholesterol levels. Biochim Biophys Acta. 711:421-430
- Angelin B, Einarsson K, Liljeqvist L, Nilsell K, Heller RA. (1984) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in human liver microsomes: active and inactive forms and cross-reactivity with antibody against rat liver enzyme. J Lipid Res. 25:1159-1166
- Arany Z, Huang LE., Eckner R, Bhatacharya S, Jiang C, Goldber MA., Bunn HF, Livingston DM. (1996) An essential role for 300/CBP in the cellular response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA. 93:12969-12973
- Bardos JI, Ashcroft M. (2004) Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. Bioessay 26:262-269
- Beal MF. (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. Free Radic Biol Med. 32:797-803
- Becker BF. (1993) Towards the physiological function of uric acid. Free Radic Biol Med. 14:615-631
- Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. (1973) Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol". Biochem Biophys Res Commun. 54:1362-1369
- Beg ZH, Stonik JA, Brewer HB. (1980) In vitro and in vivo phosphorylation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and its modulation by glucagons. J Biol Chem 255:8541-8545
- Berg BN, Simms HS (1960) Nutrition and longevity in the rat. II. Longevity and onset of disease with different levels of food intake. J Nutr. 71:255-263
- Berg TF, Breen PJ, Feuers RJ, Oriaku ET, Chen FX, Hart RW. (1994) Acute toxicity of ganciclovir: effect of dietary restriction and chronobiology Food Chem Toxicol. 32:45-50
- Bertrand HA, Lynd FT, Masoro EJ, Yu BP. (1980) Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet. J Gerontol. 35:827-835
- Bianchi L, Tacchini L, Cairo G. (1999) HIF-1-mediated activation of transferring receptor gene transcription by iron chelation. Nucleic Acids Res. 27:4223-4227

- Bilheimer DW, Goldstein JL, Grundy SM, Starzl TE, Brown MS. (1984) Liver transplantation to provide low-density-lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia. New Engl J Med. 311:1658-1664
- Bioulac-Sage P, Lafon ME, Le Bail B, Balabaud C. (1988) Perisinusoidal and pit cells in liver sinusoids. In: Bioulac-Sage P, Balabaud C, eds Sinusoids in human liver: healt and disease. Rijswijk: Kupffer Cell Foundation. 39-62
- Biressi S, Molinaro M, Cossu G. (2007) Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. Dev Biol. 308:281-293
- Bohley P, Riemann S. (1977) Intracellular protein catabolism. IX. Hydrophobicity of substrate proteins is a molecular basis of selectivity. Acta Biol Med Ger. 36:1823-1827
- Bohr V, Anson RM, Mazur S, Dianov G. (1998) Oxidative DNA damage processing and changes with aging. Toxicol Lett. 102-103:47-52
- Boucher Y, Huber H, L'Haridon S, Stetter KO, Doolittle WF. (2001) Bacterial origin for the isoprenoid biosynthesis enzyme HMG-CoA reductase of the archaeal orders Thermoplasmatales and Archaeoglobales. Mol Biol Evol. 18:1378-1388
- Box HC, Freund HG, Budzinski EE, Wallace JC, Maccubbin AE. (1995) Free radical-induced double base lesions. Radiat Res. 141:91-94
- Breese CR, Ingram RL, Sonntag WE. (1991) Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins. J Gerontol. 46:B180-187
- Brody H. (1980) In: Biological mechanism of aging. (Scimke RT ed.). Wasington Press: 563
- Bronson RT, Lipman RD. (1991) Reduction in rate of occurrence of age related lesions in dietary restricted laboratory mice. Growth Dev Aging. 55:169-184
- Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. (1975) Receptor-dependent hydrolysis of cholesteryl esters contained in plasma low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA. 72:2925-2929
- Brown MS, Goldstein JL. (1985) The LDL receptor and HMG-CoA reductase two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. Curr Top Cell Regul. 26:3-15
- Brown MS, Goldstein JL. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell. 89:331-340
- Brown MS, Goldstein JL. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membrane, cells, and blood. Proc Natl Acad Sci USA. 96:11041-11048
- Bruick RK, McKnight SL. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxilase that modify HIF. Science. 294:1337-1340
- Bruick RK. (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA. 97:9082-9087
- Bruscalupi G, Leoni S, Mangiantini MT, Minieri M, Spagnuolo S, Trentalance A. (1985) True uncoupling between cholesterol synthesis and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzime A reductase in an early stage of liver regeneration. Cell Mol Biol. 31:365-368
- Cappel RE, Gilbert HF. (1993) Oxidative inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and subunit cross-linking involve different dithiol/disulfide centers. J Biol Chem 268:342-348

- Carlson SE, Mitchell AD, Carter ML, Goldfarb S. (1980) Evidence that physiologic levels of circulating estrogens and neonatal sex-imprinting modify postpubertal hepatic microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity. Biochim Biophys Acta 633:154-161
- Carr BR, Simpson ER. (1981) Lipoprotein utilization and cholesterol synthesis by the human fetal adrenal gland. Endoer Rev. 2: 306-326.
- Carr BR, Simpson ER. (1982) Cholesterol synthesis in human fetal tissues.J Clin Endocrinol Metab. 55:447-452
- Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L (2000) Redox-regulated recruitment of transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 alpha. Mol Cell Biol. 20:402-415
- Castellano F, Bruscalupi G, Columba S, Di Croce L, Trentalance A, Augusti-Tocco G. (1994) Characterization of the response of growth and differentiation to lipoproteins and agents affecting cholesterol metabolism in murine neuroblastoma cells. Int J Dev Neurosci. 12:77-84
- Cerutti PA (1985) Prooxidant states and tumor promotion. Science. 227:375-381
- Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. J Biol Chem. 276:9519-9525
- Chen HJ, Shapiro DJ. (1990) Nucleotide sequence and estrogen induction of Xenopus laevis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. J Biol Chem. 265:4622-4629
- Chen JH, Ozanne SE, Hales CN. (2007) Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. Methods Mol Biol. 371:179-189
- Chen TS, Richie JP, Nagasawa HT, Lang CA. (2000) Glutathione monoethyl ester protects against glutathione deficiencies due to aging and acetaminophen in mice. Mech Ageing Dev. 120:127-139
- Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. (2000) Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. Biochem J. 346:659-669
- Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger R H. (1999) Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1α. J Cell Sci. 112:1203–1212
- Ching YP, Davies SP, Hardie DG. (1996) Analysis of the specificity of the AMP-activated protein kinase by site-directed mutagenesis of bacterially expressed 3-hydroxy 3-methylglutaryl-CoA reductase,using a single primer variant of the unique-site-elimination method Eur J Biochem. 237:800-808
- Ching YP, Kobayashi T, Tamura S, Hardie DG. (1997) Specifity of different isoforms of protein phosphatase-2A and protein phosphatase-2C studied using site-direct mutagenesis of HMG-CoA reductase. FEBS Lett. 411:265-268
- Chun YS, Yeo EJ, Choi E, Teng CT, Bae JM, Kim MS, Park JW. (2001) Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells. Biochem Pharmacol. 61:947-954
- Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. (2002) Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of caloric restriction. Microsc Res Tech. 59:264-272
- Cicchillitti L, Fasanaro P, Biglioli P, Capogrossi MC, Martelli F. (2003) Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130. J Biol Chem. 278:19509-19517

- Clarke PR, Hardie DG. (1990) Identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vivo and in intact rat liver. EMBO J. 9:2439-2446
- Clerk A, Michael A, Sugden PH. (1998) Stimulation of multiple mitogen activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. Biochem J. 333:581–589
- Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. (2000) Hypoxia-inducible factor-α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppression protein. J Biol Chem. 275:25733-25741
- Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. Trends Biochem Sci. 15:98-102
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc. Res. 49:507-521
- Cook Z. (2005) Diet will help reduce cholesterol levels. Prof Nurse. 20:44
- Coschigano KT, Clemmons D, Bellush LL, Kopchick JJ. (2000) Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. Endocrinology. 141:2608-2613
- cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/hypoxia/structure.htm
- Dang CV, Semenza GL. (1999) Oncogenic alterations of metabolism. Trends Biochem Sci. 24:68-72
- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry. 27:1-20
- De La Cruz CP, Revilla E, Venero JL, Ayala A, Cano J, Machado A. (1996) Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. Free Radic Biol Med. 20:53-61
- de la Serna IL, Ohkawa Y, Berkes CA, Bergstrom DA, Dacwag CS, Tapscott SJ, Imbalzano AN. (2005) MyoD targets chromatin remodeling complexes to the myogenin locus prior to forming a stable DNA-bound complex. Mol Cell Biol. 25:3997-4009
- de la Serna IL, Roy K, Carlson KA, Imbalzano AN. (2001) MyoD can induce cell cycle arrest but not muscle differentiation in the presence of dominant negative SWI/SNF chromatin remodeling enzymes. J Biol Chem. 276:41486-4191.
- Desmet VJ, Van Eyken P, Sciot R. (1990) Cytokeratins for probing cell lineage relationships in developing liver. Hepatology. 12:1249-1251
- Di Croce L, Vicent GP, Pecci A, Bruscalupi G, Trentalance A, Beato M. (1999) The promoter of the rat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene contains a tissue-specific estrogen-responsive region. Mol Endocrinol. 13:1225-1236
- Dice JF. (1989) Altered intracellular protein degradation in aging: a possible cause of proliferative arrest. Biochem Soc Symp. 55:45-55
- Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. (1993) Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animals, including humans. J Lipid Res. 34:1637-1659
- Dubois AM. (1963) The embryonic liver. In: Rouiller Ch, ed. The liver. New York: Academic Press. 1-39
- Dunglison GF, Scotting PJ, Wigmore PM. (1999) Rat embryonic myoblasts are restricted to forming primary fibres while latermyogenic populations are pluripotent. Mech Dev. 87:11-19
- Durr IF, Rudney H. (1960) The reduction of beta-hydroxy-beta-methyl-glutaryl coenzyme A to mevalonic acid. J Biol Chem. 235:2572-2578

- Dyck JR, Gao G, Widmer J, Stapleton D, Fernandez CS, Kemp BE, Witters LA. (1996) Regulation of 5'-AMP activated protein kinase activity by the non catalytic beta and gamma subunits. J Biol Chem. 271:17798-17803
- Eberlè D, Hegarty B, Bossard P, Ferrè P, Foufelle F. (2004) SREBP transcription factor: master regulator of lipid homeostasis. Biochimie. 86:839-848
- Edwards PA, Ericsson J. (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. Annu Rev Biochem.68:157-185
- Edwards PA, Lemongello D, Fogelman AM. (1979) Improved methods for the solubilization and assay of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. J Lipid Res. 20:40-46
- Elias H., Sherrick JC. (1969) Morphology of the liver. New York:Academic Press.
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. Proc Natl Acad Sci USA. 94:4273-4278
- Engelking LJ, Kuriyama H, Hammer RE, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL, Liang G. (2004) Overexpression of Insig-1 in the liver of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. J Clin Invest. 113:1168-1175
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell. 107:43-54
- Erickson SK, Cooper AD, Matsui SM, Gould RG. (1977) 7-Ketocholesterol. Its effects on hepatic cholesterogenesis and its hepatic metabolism in vivo and in vitro. J Biol Chem. 252:5186-5193
- Ericsson J, Dallner G. (1993) Distribution, biosynthesis, and function of mevalonate pathway lipids. Subcell Biochem. 21:229-272.
- Espenshade PJ, Li WP, Yabe D. (2002) Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. Proc Natl Acad Sci USA. 99:11694-11699
- Failla G. (1958) The aging process and cancerogenesis. Ann NY Acad Sci. 71:1124-1140
- Farnsworth CC, Wolda SL, Gelb MH, Glomset JA. (1989) Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue. J Biol Chem. 264:20422-20429
- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 and insulin-like growth factor 2. Cancer Res. 59:3915-3918
- Ferrara N, Corbi G, Scarpa D, Rengo G, Longobardi G, Mazzella F, Cacciatore F, Rengo F. (2005) The aging theories. Gior Gerontol. 53:57-74
- Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. (1997) HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. Mech Dev. 63:51-60
- Frankel EN. (1984) Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids". Prog Lipid Res. 23:197-221
- Friedberg EC, Bardwell AJ, Bardwell L, Feaver WJ, Kornberg RD, Svejstrup JQ, Tomkinson AE, Wang Z. (1995) Nucleotide excision repair in the yeast Saccharomyces cerevisiae: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription. Philos Trans R Soc Lond B Biol. Sci. 347:63-68
- Friedrickson DS. (1974) Plasma lipoproteins and apolipoproteins. Harvey Lect. 68:185-237
- Fulop T, Larbi A, Douziech N. (2003) Insulin receptor and ageing. Pathol Biol (Paris). 51:574–580

- Gafni A. (1981) Purification and comparative study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the muscles of young and old rats. Biochemistry. 20:6035-6040
- Garland D, Russell P, Zigler JS Jr. (1988) The oxidative modification of lens proteins. Basic Life Sci. 49:347-352
- Garrow JS. (1978) Infant feeding and obesity of adults. Bibl Nutr Dieta.29-35.
- Gaussin V, Skarlas P, Ching YP, Hardie DG, Hue L. (1997) Distinct type-2A protein phosphatase activate HMGCoA reductase and acetyl-CoA carboxylase in liver. FEBS Lett. 413:115-118
- Gil G, Faust JR, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS. (1985) Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol enhanced degradation of the enzyme. Cell. 41:249-258
- Gilbert SF. (1996) Biologia dello Sviluppo. Zanichelli
- Glomset JA, Gelb MH, Farnsworth CC. (1990) Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. Trends Biochem Sci. 15:139-142
- Goda N, Dozier SJ, Johnson RS. (2003) HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression. Antioxid Redox Signal. 5:467-473
- Gofman JW, Delalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nichols AV, Strisower B, Tamplin AR. (1954) The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. Plasma. 2:413-484
- Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. (1988) Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science. 242:1412-1415
- Goldstein JL, Brown MS. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. Nature. 343:425-430
- Goldstein JL, Dana SE, Brown MS. (1974) Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. Proc Natl. Acad Sci USA. 71:4288-4292
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. (2006) Protein sensors for membrane sterols. Cell. 124:35-46
- Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. (2001) Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells. Role of the $p22^{phox}$-containing NADPH oxidase. Circ Res. 89:47-54
- Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Giacca AJ. (1994) Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. Mol Cell Biol. 14:6264-6277
- Grosfeld A, Andrè J, Hauguel-de Mouzon S, Berra E, Pouysségur J, Guerre-Millo M (2002) Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. J Biol Chem 227:42953-42957
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. Gene Expr. 7:205-213
- Guttridge DC. (2004) Signaling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 7:443-450
- Gwak GY, Yoon JH, Kim KM, Lee HS, Chung JW, Gores GJ (2005) Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. J Hepatol. 42:358-364
- Haave NC, Innis SM. (1991) Hepatic cholesterol and fatty acid synthesis in pregnant and fetal rats: effect of maternal dietary fat and cholestyramine. J Nutr. 121:1529-1535

- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free Radicals in Biology and Medecine. Oxford University Press, Oxford
- Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. Nature. 386:296-299
- Hansson LO, Friedler A, Freund S, Rudiger S, Fersht AR. (2002) Two sequence motifs from HIF-1 alpha bind to the DNA-binding site of p53. Proc Natl Acad. Sci. USA. 99:10305-10309
- Hardie DG, Corton J, Ching YP, Davies SP, Hawley S. (1997) Regulation of lipid metabolism by the AMP-activated protein kinase. Biochem Soc Trans. 25:1229-1231
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. (2006) AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. J Physiol. 574:7-15
- Hardie DG. (1992) Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase. Biochim Biophys Acta. 1123:231-238
- Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 11:298-300
- Harman D. (1994) Free-radical theory of aging. Increasing the functional life span. Ann NY Acad Sci. 717:1-15
- Harper CR, Jacobson TA. (2003) Beyond the Mediterranean diet: the role of omega-3 Fatty acids in the prevention of coronary heart disease. Prev Cardiol (Summer). 6:136-146
- Hartwig M. (2002) Immune control of mammalian aging: a T-cell model. Mech Ageing Dev. 63:207-213
- Hatahet Z, Purmal AA, Wallace SS. (1994) Oxidative DNA lesions as blocks to in vitro transcription by phage T7 RNA polymerase. Ann NY Acad Sci. 726:346-348
- Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W (1999) Interleukin-1β and tumor necrosis factor-α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. Blood. 94:1561–1567
- Henneberg R, Rodwell VW. (1985) Altered modulation state of rat hepatocyte HMG-CoA reductase in response to insulin, glucagons, cAMP, cGMP, and epinephrine. Fed Proc. 40:1604
- Hensley K, Floyd RA. (2002) Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. Arch Biochem Biophys. 397:377-383
- Herrera E, Amusquivar E, López-Soldado I, Ortega H. (2006) Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. Horm Res. 65:59-64
- Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ. (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. J Biol Chem 277:26351-26355
- Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA. (1997) Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix- PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signalling pathway. J Biol Chem. 272:8581-8593
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. 109:1125-1131
- Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. (1998) Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. Biochem Biophys Res. Commun. 245:894-899
- Hua X, Sakai J, Ho YK, Goldstein JL, Brown MS. (1995) Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by proetease protection. J Biol Chem. 270:29422-29427

- Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X. (1993) nSREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element.Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 15;90(24):11603-7.
- Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS. (2002) Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. J Biol Chem. 277:39792-39800
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 95:7987-7992
- Hughes AL, Todd BL, Espenshade PJ. (2005) SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. Cell. 120:831-842
- Ide H, Kow YW, Wallace SS. (1985) Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks in vitro. Nucleic Acids Res. 13:8035-8052
- Ingebritsen TS, Geelen MJ, Parker RA, Evenson KJ, Gibson DM. (1979) Modulation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase activity, reductase kinase activity, and cholesterol synthesis in rat hepatocytes in response to insulin and glucagons. J Biol Chem. 254:9986-9989
- Ingebritsen TS. (1983) Molecular control of HMG-CoA reductase: regulation by phosphorylation/dephosphorylation. In: Sabine JR, Ed. 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase. Boca Raton, FL:CRC Press. 129-152
- Innis SM. (2007) Human milk: maternal dietary lipids and infant development. Proc Nutr Soc. 66:397-404
- Inoue N, Shimano H, Nakakuki M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yamamoto T, Sato R, Takahashi A, Sone H, Yahagi N, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N. (2005). Lipid Synthetic Transcription Factor SREBP-1a Activates $p21^{WAF1/CIP1}$, a Universal Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Mol Cell Biol. 25: 8938–8947
- Istvan ES, Deisenhofer J. (2000) The structure of catalytic portion of human HMG-CoA reductase. Biochim Biophys Acta. 1529:9-18
- Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. (2000) Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. EMBO J. 19:819-830
- Istvan ES. (2002) Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Am Heart J. 144:S27-32
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. Cell. 111:709-720
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of HIF-1α. J Biol Chem. 271:17771-17778
- Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension J Biol Chem. 272:19253-19260
- Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. Med Sci Monit. 6:1047-1052
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1α. EMBO J. 17:6573–6586

- Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor". Proc Natl Acad Sci USA. 94:5667-5672
- Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. (2000) Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. Proc Natl Acad Sci USA. 97:10430-10435.
- Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomas D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S. (2004) Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5: Myod double-mutant mice. Nature. 431:466-471
- Kast-Woelbern HR, Dana SL, Cesario RM, Sun L, de Grandpre LY, Brooks ME, Osburn DL, Reifel-Miller A, Klausing K, Leibowitz MD. (2004) Rosiglitazone induction of Insig-1 in white adipose tissue reveals a novel interplay of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and sterol regulatory element-binding protein in the regulation of adipogenesis.J Biol Chem. 279:23908-23915
- Ke Q, Costa M. (2006) Hypoxia-inducible Factor–1 (HIF-1). Mol Pharmacol. 70:1469-1480
- Keren A, Tamir Y, Bengal E. (2006) The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. Mol Cell Endocrinol. 252:224-230
- Kikugawa K, Yasuhara Y, Ando K, Koyama K, Hiramoto K, Suzuki M. (2003) Protective effect of supplementation of fish oil with high n-3 polyunsaturated fatty acids against oxidative stress-induced DNA damage of rat liver in vivo. J Agric Food Chem. 51:6073-6079.
- Kita T, Goldstein JL, Brown MS, Wantabe Y, Hornick CA, Havel RJ. (1982) Hepatic uptake of chilomicron remnants in WHHL rabbits: A mechanism genetically distinct from the low-density lipoprtotein receptor. Prot Natl Acad Sci USA. 79:3623-3627
- Klemm DJ, Leitner JW, Watson P, Nesterova A, Reusch JE, Goalstone ML, Draznin B. (2001) Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. J Biol Chem. 276:28430-28435
- Knapp JR, Davie JK, Myer A, Meadows E, Olson EN, Klein WH. (2006) Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. Development. 133:601-6
- Kohn RR. (1971) Principles of mammalian aging. Foundation of Developmental Biology Series. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall
- Kosmidou I, Vassilakopoulos T, Xagorari A, Zakynthinos S, Papapetropoulos A, Roussos C. (2002) Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive oxygen species. Am J Respir Cell Mol Biol. 26:587–593.
- Kowald A, Kirkwood TB. (1996) A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. Mutat Res. 316:209-236
- Kristal BS, Yu BP. (1992) An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. J Gerontol. 47:B107-B114
- Lackner MR, Kindt RM, Carroll PM, Brown K, Cancilla MR, Chen C, de Silva H, Franke Y, Guan B, Heuer T, Hung T, Keegan K, Lee JM, Manne V, O'Brien C, Parry D,Perez-Villar JJ, Reddy RK, Xiao H, Zhan H, Cockett M, Plowman G, Fitzgerald K, Costa M, Ross-Macdonald P. (2005) Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors. Cancer Cell. 7:325-336
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685

- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. (2002) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. Genes Dev. 16:1466-1471
- Lechward K, Awotunde OS, Swiatek W, Muszynska G. (2001) Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. Acta Biochim Pol. 48:921-933
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. (2004) Hypoxia-inducile factor 1 (HIF-1)α: its protein stability and biological functions. Exp Mol Med. 36:1-12
- Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL., Choi AM. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. J Biol Chem. 272:5375-5381
- Leoni S, Mangiantini MT, Spagnuolo S, Trentalance A, Valbonesi M. (1985a) Short term regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase during pregnancy and perinatal development in the rat. Cell Mol Biol. 31:149-152
- Leoni S, Spagnuolo S, Conti Devirgiliis L, Dini L, Mangiantini MT, Trentalance A. (1985b) Hormonal control of cholesterogenesis and related enzymes in isolated rat hepatocytes during pre- and postnatal development. J Cell Physiol. 125:507-511.
- Leoni S, Spagnuolo S, Conti-Devirgiliis L, Dini L, Mangiantini MT, Trentalance A. (1984) Cholesterogenesis and related enzymes in isolated rat hepatocytes during pre- and postnatal life. J Cell Physiol. 118:62-66
- Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 93:15036-15040
- Li H, Ko HP, Whitlock JP. (1996) Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hyoxia. Roles of ARNT and HIF1 alpha. J Biol Chem. 271:21262-21267
- Li J, Bosch-Marce M, Nanayakkara A, Savransky V, Fried SK, Semenza GL, Polotsky VY. (2006) Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor 1-α. Physiol Genomics. 25:450-457
- Li J, Davidson G, Huang Y, Jiang BH, Shi X, Costa M, Huang C. (2004) Nickel compounds act through phosphatidylinositol-3-kinase/Akt-dependent, p70(S6k)-independent pathway to induce hypoxia inducible factor transactivation and Cap43 expression in mouse epidermal Cl41 cells. Cancer Res. 64:94-101
- Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, Polotsky VY. (2005) Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. Circ Res. 97:698-706
- Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L. (2004) Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. Genes Dev. 18:12-16
- Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362:709-715
- Liscum L, Cummings RD, Anderson RG, DeMartino GN, Goldstein JL, Brown MS. (1983) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase: a transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked "high-mannose" oligosaccharides. Proc Natl Acad Sci U S A. 80:7165-7169
- Liu Q, Hofmann PA. (2004) Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 286:H2204-2212
- Lluis F, Ballestar E, Suelves M, Esteller M, Munoz-Canoves P. (2005) E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. EMBO J. 24:974-984

- Lok CN, Ponka P. (1999) Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. J Biol Chem. 274:24147-24152
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193: 265-275
- Lu H, Forbes RA, Verma A. (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. J Biol Chem. 277:23111-23115
- Maeda H, Gleiser CA, Masoro EJ, Murata I, McMahan CA, Yu BP. (1985) Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: II. Pathology. J Gerontol. 40:671-688
- Makino Y, Cao R, Svensseon K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia inducible gene expression. Nature. 414:550-554
- Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. (2002) Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxiainducible factor-3alpha locus. J Biol Chem. 277:32405-32408
- Marceau N, Blouin MJ, Noel M, Torok N, Loranger A. (1992) The role of bipotential progenitor cells in liver ontogenesis and neoplasia. In:Sirica AE., ed. The role of cell types in hepatocarcinogenesis. Boca Raton:CRC Press. 121-149.
- Marino M, Pallottini V, D'Eramo C, Cavallini G, Bergamini E, Trentalance A. (2002) Age-related changes of cholesterol and dolichol biosynthesis in rat liver. Mech Ageing Develop. 123:1183-1189
- Markesbery WR. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. Free Radic Biol Med. 23:134-147
- Martin GM, Hoehn H, Bryant EM. (1980) Evidence against somatic mutation as a mechanism of clonal senescence. Adv Exp Med Biol. 129:139-145
- Martin I, Grotewiel MS. (2006) Oxidative damage and age-related functional declines. Mech Ageing Dev. 127:411-223
- Masoro EJ, Yu BP, Bertrand HA. (1982) Action of food restriction in delaying the aging process. Proc Natl Acad Sci USA. 79:4239-4241
- Masoro EJ. (1998) Caloric restriction. Aging (Milano). 10:173-174
- Masoro EJ. (2005) Overview of caloric restriction and ageing. Mech Ageing Dev. 126:913–922
- Masson N, Ratcliffe PJ. (2003) HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. J Cell Sci. 116:3041-3049
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. EMBO J. 20:5197-5206
- Maxwell PH, Wiesner MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. (1999) The tumor suppression protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature. 399:271-275
- McCarter RJ, Palmer J. (1992) Energy metabolism and aging: a lifelong study of Fischer 344 rats. Am J Physiol. 263:E448-452
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. In: Nutrition. 1989 5:155-171; discussion 172
- Mcnamara DJ, Quackenbush FW, Rodwell VW. (1972) Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: developmental pattern. J Biol Chem. 247:5805-5810

- McPherson R, Gauthier A. (2004) Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. Biochem Cell Biol. 82:201-211
- Mehmetçik G, Ozdemirler G, Koçak-Toker N, Cevikbaş U, Uysal M. (2007) Role of carnosine in preventing thioacetamide-induced liver injury in the rat. Peptides., *in press*
- Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L (1995) A hypoxia responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. J Exp Med. 182:1683-1693
- Meusser B, Hirsch C, Jarosh E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. Nat Cell Biol. 7:766-772
- Mijimolle N, Velasco J, Dubus P, Guerra C, Weinbaum CA, Casey PJ, Campuzano V, Barbacid M. (2005) Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis, and tumor development. Cancer Cell. 7:313-324
- Miller RA, Harper JM, Galecki A, Burke DT. (2002) Big mice die young: early life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice. Aging Cell. 1:22-29
- Mitchelhill KI, Stapleton D, Gao G, House C, Michell B, Katsis F, Witters LA, Kemp BE. (1994) Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. J Biol Chem. 269:2361-2364
- Moller N, Gormsen L, Fuglsang J, Gjedsted J. (2003) Effects of ageing on insulin secretion and action. Horm Res. 60:102–104
- Moran LA, Scrimgeour KG, Horton HR, Ochs RS, Rawn JD. (1996) Biochimica. McGraw-Hill, seconda edizione
- Moskovitz J, Yim MB, Chock PB. (2002) Free radicals and disease. Arch Biochem Biophys. 397:354-359
- Ness GC, Chambers CM (2000) Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the concept of cholesterol buffering capacity. Proc Soc Exp Biol Med. 224:8-19
- Ness GC, Dugan RE, Lakshmanan MR, Nepokroeff CM, Porter JW. (1973) Stimulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in hypophysectomized rats by l-triiodothyronine. Proc Natl Acad Sci USA. 70:3839-3842
- Ness GC, Kohlruss N, Gertz KR. (2003) Association of the low-density lipoprotein receptor with caveolae in hamster and rat liver Biochem Biophys Res Commun. 303:177-181
- Ness GC, Lopez D, Chambers CM, Newsome WP, Cornelius P, Long CA, Harwood HJ Jr. (1998) Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression. Biochem Pharmacol. 56:121-129
- Ness GC, Wiggins L, Zhao Z. (1994a) Insulin increases hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA and immunoreactive protein levels in diabetic rats. Arch Biochem Biophys 309:193-194
- Ness GC, Zhao Z, Wiggins L (1994b) Insulin and glucagons modulate hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity by affecting immunoreactive protein levels. J Biol Chem. 269:29168-29172
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J. 13:9-22
- Nguyen AD, McDonald JG, Bruick RK, DeBose-Boyd RA. (2007) Hypoxia stimulates degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase through accumulation of lanosterol and hypoxia-inducible factor-mediated induction of Insigs. J Biol Chem. 282:27436-27446

- Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL. (1998) Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol sensing domain. J Biol Chem. 273:17243-17250
- Nohturfft A, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, Espenshade PJ. (2000) Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. Cell. 102:315-323
- O'Neill P, Fielden EM. (1993) Primary free radical processes in DNA. Adv Radiat Biol. 95:12759-12765
- Ogura T, Tanaka Y, Nakata T, Namikawa T, Kataoka H, Ohtsubo Y. (2007) Simvastatin reduces insulin-like growth factor-1 signaling in differentiating C2C12 mouse myoblast cells in an HMG-CoA reductase inhibition-independent manner. J Toxicol Sci. 32:57-67
- Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. (1987) Age-related changes in oxidized proteins. J Biol Chem. 262:5488-5491
- Omkumar RV, Darnay BG, Rodwell VW. (1994) Modulation of Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity by phosphorylation: Role of serine 871. J Biol Chem. 269:6810-6814
- Oncley JL. (1956) Lipoproteins in human plasma. Harvey Lect. 50:71-91
- Onorato JM., Thorpe SR, Baynes JW. (1998) Immunohistochemical and ELISA assays for biomarkers of oxidative stress in aging and disease. Ann NY Acad Sci. 854:277-290
- Orgel LE. (1995) The manteinance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. Proc Natl Acad Sci USA. 49:517-521
- Osborne AR, Pollock VV, Lagor WR, Ness GC. (2004) Identification of insulin-responsive regions in the HMG-CoA reductase promoter. Biochem Biophys Res Commun. 318:814-818
- Osborne TB, Mendel LB, Ferry EL. (1917) The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life in rats. Science. 45:294-295
- Pallottini V, Marino M, Cavallini G, Bergamini E, Trentalance A. (2003) Age-related changes of isoprenoid biosynthesis in rat liver and brain. Biogerontology. 4:371-378
- Pallottini V, Martini C, Pascolini A, Cavallini G, Gori Z, Bergamini E, Incerpi S, Trentalance A. (2005) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase deregulation and age-related hypercholesterolemia: a new role for ROS. Mech Ageing Dev. 126:845-851
- Pallottini V, Montanari L, Cavallini G, Bergamini E, Gori Z, Trentalance A. (2004) Mechanisms underliyng the impaired regulation of 3-methylglutaril-coenzyme-A reductase in aged rat liver. Mech Ageing Dev. 125:633-639
- Parker CR Jr, Carr BR, Simpson ER, Macdonald PC. (1983) Decline in the concentration of low-density lipoproiein-cholesterol in human fetal plasma near term. Metabolism. 32: 919-923
- Parker RA, Miller SJ, Gibson DM. (1989) Phosphorylation of native 97 KDa 3-hydroxy-3-methykglutaryl coenzyme A reductase from rat liver: impact on activity and degradation of the enzyme. J Biol Chem 264:4877-4887
- Philipp BW, Shapiro DJ. (1981) Estrogen regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acetyl-CoA carboxylase in xenopus laevis. J Biol Chem 256:2922-2927
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. Nature. 429:771-776
- Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C (2002b) Is HIF-1α a pro- or an anti-apoptotic protein?. Biochem. Pharmacol 64:889-892

- Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. (2002a) $CoCl_2$, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor 1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. Ann NY Acad Sci. 973:443-447
- Pontecorvi A, Tata JR, Phyillaier M, Robbins J. (1988). Selective degradation of mRNA: the role of short-lived proteins in differential destabilization of insulin-induced creatine phosphokinase and myosin heavy chain mRNAs during rat skeletal muscle L6 cell differentiation. EMBO J. 7:1489-1495
- Pontieri GM, Bernelli-Zazzera A, Bianchi-Santamaria A, Faggioni A, Frati L, Gazzaniga A, Ippoliti F, Ragona G, Russo MA, Salerno A, Santamaria L, Tolone G. (1996) Patologia generale. Piccin, seconda edizione
- Pouget JP, Douki T, Richard MJ, Cadet J. (2000) DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. Chem Res Toxicol. 13:541-549
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1 alpha; definition of regulatory domains within the alpha subunit. J. Biol. Chem. 272:11205- 11214
- Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:6511-6518
- Ramaprasad TR, Baskaran V, Krishnakantha TP, Lokesh BR. (2005) Modulation of antioxidant enzyme activities, platelet aggregation and serum prostaglandins in rats fed spray-dried milk containing n-3 fatty acid. Mol Cell Biochem. 277:19-26
- Rattan SIS. (1995) Gerontogenes: real or virtual? FASEB J. 9:284-286
- Reif S, Terranova VP, el-Bendary M, Lebenthal E, Petell JK. (1990) Modulation of extracellular matrix proteins in rat liver during development. Hepatology. 12:519-525.
- Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouysségur, J. (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem. 274:32631–32637
- Rietveld A, Simons K. (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. Biochim Biophys Acta. 1376:467-479.
- Robichon C, Dugail I. (2007) *De novo* cholesterol synthesis at the crossroads of adaptive response to extracellular stress through SREBP. Biochimie. 89:260-264
- Roe FJ, Lee PN, Conybeare G, Kelly D, Matter B, Prentice D, Tobin G. (1995) The Biosure Study: influence of composition of diet and food consumption on longevity, degenerative diseases and neoplasia in Wistar rats studied for up to 30 months post weaning. Food Chem Toxicol. 33:1S-100S
- Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL. (2000) Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in Drosophila. Science. 290:2137-2140
- Roitelman J, Olender EH, Bar-Nun S, Dunn WA, Simoni RD. (1992) Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implication for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. J Cell Biol. 117:959-973
- Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. (1997) Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. J Biol Chem. 272:20055-20062
- Rothstein M. (1977) Recent developments in the age-related alteration of enzymes: a review. Mech Ageing Dev. 6:241-257

- Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. (2002) Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. J Biol Chem. 277:38723-38730
- Russell DW, Yamamoto T, Schneider WJ, Slaughter CJ, Brown MS, Goldstein JL. (1983) cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: feedback regulation of a receptor mRNA. Proc Natl Acad Sci USA. 80:7501-7505
- Sabatino F, Masoro EJ, McMahan CA, Kuhn RW. (1991) Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. J Gerontol. 46:B171-179
- Sacher, GA. (1977) Life table modifications and life prolongation. In Finch, C.E., Hayflick, L., (Eds.) Handbook of the Biology of Aging. Van Nonstrand Reinhold, New York, pp 582-638
- Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL. (1998) Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animals cells. Mol Cell. 2:505-514
- Samali A, Nordgren H, Zhivotovsky B, Peterson E, Orrenius S. (1999) A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. Biochem Biophys Res Commun. 255:6-11
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. All Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sample CE, Pendleton LC, Ness GC. (1987) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA levels by l-triiodothyronine. Biochemistry. 26:727-731
- Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J. (2002) Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. Mol Cell Biol. 22:2984-2992
- Sarasin A. (1999) The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. Mutat Res. 428:5-10
- Sarvazyan N. (2002) Pathophysiology of reactive oxygen species (ROS). www.ttuhsc.edu/SOM/physiology/courses/6311Cellular/PathophysiologyofROS2002.pdf
- Sato R, Goldstein JL, Brown MS. (1993) Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. Proc Natl Acad Sci USA. 90:9261-9265
- Schmid KE, Woollett LA. (2003) Differential effects of polyunsaturated fatty acids on sterol synthesis rates in adult and fetal tissues of the hamster: consequence of altered sterol balance.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 285:G796-803
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylase. Biochem Biophys Res Commun. 338:617-626
- Schofield CJ, Zhang Z. (1999) Structural and mechanistic studies on 2 oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. Curr Opin Struct Biol. 9:722-731
- Schropfer GJ Jr. (2000) Oxysterols:modulators of cholesterol metabolism and other processes. Physiol Rev. 80:361-554
- Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS. (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. Mol Cell Biol. 21:3436-3444

- Sebti SM, Der CJ. (2003) Opinion: Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors. Nat Rev Cancer. 3:945-951
- Sebti SM. (2005) Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy. Cancer Cell. 7:297-300.
- Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA. 88:5680-5684
- Semenza GL. (1999) Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Annu Rev Cell Dev Biol. 15:551-578
- Semenza GL. (2001) HIF-1 and mechanism of hypoxia sensing. Curr Opin Cell Biol. 13:167-171
- Semenza GL. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 3: 721-732
- Semenza GL. (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. Physiology (Bethesda). 19:176-182
- Sen CK, Packer L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J. 10:709-720
- Serra D, Asins G, Hegardt FG. (1990) Purification and characterization of a protein inhibitor from rat liver that inhibits type 1 protein phosphatase when 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase is the substrate. J. Lipid Res. 31:919-26
- Sevanian A, Berliner J, Peterson H. (1991) Uptake, metabolism, and cytotoxicity of isomeric cholesterol-5,6-epoxides in rabbit aortic endothelial cells. J Lipid Res. 32:147-155
- Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA. (2003a) Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase stimulated by sterol and geranylgeraniol. J Biol Chem. 278:52479-52490
- Sever N, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA. (2003b) Accelerated degradation of HMG-CoA reductase mediated by binding of Insig-1 to its sterol-sensing domain. Mol Cell. 11:25-33
- Shapiro DJ, Rodwell VW. (1971) Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-metylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis. J Biol Chem. 246:3210-3216
- Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. (1999) Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. Proc Natl Acad Sci USA. 96:13656-13661
- Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. (1991) Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. Cancer Res. 51:2611-2620.
- Simone C, Forcales SV, Hill DA, Imbalzano AN, Latella L, Puri PL. (2004) p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. Nat Genet. 36:738-43
- Simonet WS, Ness GC. (1988) Transcriptional and post-transcriptional regulation of rat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by thyroid hormones. J Biol Chem. 263:12448-12453
- Simonet WS, Ness GC. (1989) Post-transcription regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA in rat liver: glucocorticoids block the stabilization caused by thyroid hormones J Biol Chem. 264:569-573
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA. 88:10540-10543

- Smith LL, Sayre LM, Perry G. (1999) Primary involvement of oxidative damage and redox imbalance in Alzheimer and other neurodegenerative disease. Oxid Stress Dis. 3:115-126
- Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS. (2000) The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. Cancer Res. 60:4873-4880
- Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC. (1993) Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. Proc Natl Acad Sci USA. 90:7255-7259.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. (2002) Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radic Biol Med. 33:575-586
- Sohal RS, Sohal BH, Orr WC. (1995) Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. Free Radic Biol Med. 19:499-504
- Song BL, Javitt NB, DeBose-Boyd RA. (2005) Insig-mediated degradation of HMG-CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. Cell Metab. 1:179-189
- Sonntag WE, Lenham JE, Ingram RL. (1992) Effects of aging and dietary restriction on tissue protein synthesis: relationship to plasma insulin-like growth factor-1. J Gerontol. 47:B159-163
- Spiteller G. (1996) Enzymic lipid peroxidation-a consequence of cell injury? Free Radic Biol Med. 21:1003-1009
- Stadtman ER, Berlett BS. (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Chem Res Toxicol. 10:485-494
- Stadtman ER, Levine RL. (2000) Protein oxidation. Ann NY Acad Sci. 899:191-208
- Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, The T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE. (1996) Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. J Biol Chem. 271:611-614
- Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T. (2002) Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 alpha by insulin and interleukin 1beta involves phosphatidylinositol 3-kinase pathway. FEBS Lett. 512:157-162
- Suchy FJ, Bucuvalas JC, Novak DA. (1987) Determinants of bile formation during development: ontogeny of hepatic bile acid metabolism and transport. Semin Liver Dis. 7:77-84
- Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. (2005) Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. J Biol Chem. 280:26483-26490
- Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T. (2001) Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. Oncogene. 20:5779-5788
- Taborsky G. (1973) Oxidative modification of proteins in the presence of ferrous ion and air. Effect of ionic constituents of the reaction medium on the nature of the oxidation products. Biochemistry. 12:1341-1348
- Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. (1999) Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. J Biol Chem. 274:24142-24146
- Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. (2001) Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. Carcinogenesis. 22:1363–1371
- Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. (2000) Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. EMBO J. 19:4298-4309

- Tanne F, Gagnadoux F, Chazouilleres O, Fleury B, Wendum D, Lasnier E, Lebeau B, Poupon R, Serfaty L. (2005) Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. Hepatology. 41:1290-1296
- Tatsumi K, Saibara T. (2005) Effects of obstructive sleep apnea syndrome on hepatic steatosis and non-alcoholic steatohepatitis. Hepatol Res. 3:100-104
- Tedesco AC, Martinez L, Gonzalez S. (1997) Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. Braz J Med Biol Res. 30:561-575
- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL.(1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. Genes Dev. 12:3320-3324
- Tian H, Mcknight SL, Russel DW. (1997) Endothelial PAS domain protein 1, a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. Genes Dev. 11:72-82
- Turley SD, Spady DK, Dietschy JM. (1995) Role of liver in the synthesis of cholesterol and the clearance of low density lipoproteins in the cynomolgus monkey. J Lipid Res. 36:67-79
- Van Eyken P, Sciot R, Callea F, Van der Steen K, Moerman P, Desmet VJ. (1988) The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. Hepatology. 8:1586-1595
- Van Roon MA, Aten JA, van Oven CH, Charles R, Lamers WH. (1989) The initiation of hepatocyte-specific gene expression within embryonic hepatocytes is a stochastic event. Dev Biol. 136:508-516
- Viccica G, Vignali E, Marcocci C. (2007) Role of the cholesterol biosynthetic pathway in osteoblastic differentiation. J Endocrinol Invest. 30:8-12
- Volm M, Koomagi R (2000) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. Anticancer Res. 20:1527-1533
- von Dippe P, Levy D. (1990) Expression of the bile acid transport protein during liver development and in hepatoma cells. J Biol Chem. 265:5942-5945
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O_2 tension. Proc Natl Acad Sci USA. 92:5510-5514
- Wang GL, Semenza GL. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducile factor 1. J Biol Chem. 270:1230-1237
- Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. Cell. 77:53-62
- Weber LW, Boll M, Stampfl A. (2004) Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins.World J Gastroenterol. 10:3081-3087
- Weindruch R, Naylor PH, Goldstein AL, Walford RL. (1988) Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. J Gerontol. 43:B40-42
- Weindruch R, Walford RL. (1982) Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. Science. 215:1415-1418
- Weng NP. (2006) Ageing of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? Immunity. 24:495-499
- Wenger RH. (2002) Cellular adaptation to hypoxia. O_2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible factor transcription factors, and O_2-regulated gene expression. FASEB J. 16:1151-1162
- Wera S, Hemmings BA. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. Biochem J. 311:17-29

- Woollett LA. (2005) Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. Am J Clin Nutr. 82:1155-1161.
- Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, Wen F, Feramisco JR, Karin M, Wang JY, Puri PL. (2000) p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. Mol Cell Biol. 20:3951-3964.
- Yabe D, Komuro R, Liang G, Goldstein JL, Brown MS. (2003) Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. Proc Natl Acad Sci USA. 100: 3155-3160
- Yan LJ, Levine RL, Sohal RS. (1997) Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. Proc Natl Acad Sci USA. 94:11168-11172
- Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. Cell. 75:187-197
- Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q, Berk BC. (2000). Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. J Biol Chem 275:11706–11712
- Yu BP. (1996) Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. Free Radic Biol Med. 21:651-668
- Zager RA, Johnson AC, Naito M, Bomsztyk K. (2008) Maleate Nephrotoxicity: Mechanisms of Injury and Correlates with Ischemic /Hypoxic Tubular Cell Death. Am J Physiol Renal Physiol.294 :F187-197
- Zammit VA, Caldwell AM. (1990) Conditions that result in the mobilization and influx of Ca2+ into rat hepatocytes induce the rapid loss of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-C*oA* reductase activity that is not reversed by phosphatase treatment. Biochem J. 269:373-379
- Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. (1998) Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. EMBO J. 17:5085-5094
- Zetser A, Gredinger E, Bengal E. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. J Biol Chem. Feb 274:5193-5200
- Zhang FL, Casey PJ. (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. Annu Rev Biochem. 65:241-269
- Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ, Han J. (1999) Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. Mol Cell Biol. 19:21-30
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implication for tumor angiogenesis and therapeutics. Cancer Res. 60:1541-1545

Ringraziamenti

Con grande piacere, ora, devo ringraziare tutti coloro che in questi anni di ricerca e di laboratorio hanno prestato il loro insegnamento ed indispensabile consiglio rendendo possibile sia la realizzazione di questa tesi, ma soprattutto, hanno nel tempo suscitato e tenuto sempre vivo il mio personale interesse per questa disciplina e per la ricerca scientifica.
Con queste persone ho costruito giorno per giorno un patrimonio di esperienze, risultati, potenzialita'. Un patrimonio a cui hanno concorso tutti coloro che con me, con diverse responsabilità e gradi di conoscenza, hanno lavorato.
In questi anni di studio ho cercato di accogliere le sollecitazioni e le suggestioni delle persone che oggi ringrazio, avvicinandomi alle innovazioni scientifiche ed alle nuove strategie di ricerca.

Il primo ringraziamento va indubbiamente alla Prof.ssa Anna Trentalance e non solo per avermi permesso di lavorare con lei in questi anni ma soprattutto per l'esempio che ha per me rappresentato.

Un ringraziamento speciale va alla Dott.ssa Valentina Pallottini per il sostegno e la fiducia dimostratami, per il supporto costante che non mi ha mai negato e per il piacere di aver condiviso con lei questi anni di lavoro.

Un grazie particolare va inoltre, alla Prof.ssa Maria Marino perché mi ha sempre spronato a guardare "le cose" da prospettive differenti.

Ringrazio il Prof. Grahame Hardie dell'Università di Dundee che mi ha accolto nel suo laboratorio per imparare i primi segreti dell'AMPK.

Ringrazio il Prof. Ettore Bergamini dell'Università di Pisa per gli animali sottoposti a restrizione calorica e OMEGA-3.
Ringrazio il Prof. Giorgio Nanni dell'Università di Genova per gli animali trattati con TAA.
Ringrazio la Dott.ssa Giovannella Bruscalupi dell'Università La Sapienza per gli animali a differenti stadi di sviluppo.
Ringrazio la Dott.ssa Pierangela Totta per l'utilizzo delle camerette ipossiche presso laboratorio di Patologia Vascolare dell'IDI di Roma.
Un ringraziamento va inoltre alla Dott.ssa Maria Gabriella Caruso dell'IRCCS De Bellis di Castellana Grotte (BA) per le analisi di RT-PCR.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Paola Galluzzo con cui ho iniziato questo lungo percorso di ricerca e che mi è stata vicino tutti questi anni. Ringrazio la Dott.ssa Barbara Guantario per la sua amicizia ed il suo supporto dimostratomi durante tutto questo tempo. Un ringraziamento va a tutti i colleghi dottori del laboratorio, Elisabetta De Marinis, Pamela Bulzomi, Chiara Rastelli, Alessandro Bolli, Valentina Tritoni e le "new entry" Cristina Piloto ed in particolare, Laura Trapani, che hanno condiviso con me le gioie ed i dolori questi anni.

Infine, i miei ringraziamenti non possono non comprendere la mia famiglia ed in particolare, Dario che mi è stato sempre vicino durante questo lungo percorso.