

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

*Caratterizzazione di fibroblasti da paziente affetto da malattia da accumulo
di lipidi neutri (NLSDM)*

Relatore

Prof. Laura Moro

Candidato

Giada Sorintano

Anno Accademico 2023-24

Sessione autunnale

INDICE

1. INTRODUZIONE	6
1.1. METABOLISMO LIPIDICO.....	7
1.1.1. OSSIDAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI.....	8
1.2. <i>LIPID DROPLETS</i>	10
1.2.1. SINTESI DELLE <i>LIPID DROPLETS</i> CITOPLASMATICHE.....	11
1.2.2. SINTESI DELLE <i>LIPID DROPLETS</i> NUCLEARI.....	12
1.2.3. FUNZIONI DELLE <i>LIPID DROPLETS</i>	13
1.2.4. CATABOLISMO DELLE <i>LIPID DROPLETS</i>	16
1.3. <i>NEUTRAL LIPID STORAGE DISEASE</i>	18
1.3.1. NLSDM.....	19
1.3.2. NLSDI.....	20
1.4. ATGL (<i>adipose triglyceride lipase</i>).....	21
1.4.1. REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE.....	23
1.4.2. REGOLAZIONE POST TRADUZIONALE.....	23
1.4.3. REGOLAZIONE A LIVELLO DI PROTEINA.....	23
1.4.4. ALTRI TIPI DI REGOLAZIONE.....	26
1.4.5. MUTAZIONI DI ATGL.....	27
2. SCOPO DEL LAVORO	29
3. RISULTATI	31
3.1. IL TRATTAMENTO CON ACIDO OLEICO INDUCE NEI FIBROBLASTI UN ACCUMULO DI <i>LIPID DROPLETS</i> , MA NON LIPOTOSSICITÀ.....	32
3.2. HSC70 E PLIN2 SI ACCUMULANO NEI FIBROBLASTI NLSDM-025 TRATTATI CON ACIDO OLEICO IN ASSENZA DI SIERO.....	34
3.3. FIBROBLASTI NLSDM-025 TRATTATI CON ACIDO OLEICO IN ASSENZA DI SIERO MOSTRANO UN DIFETTO DI AUTOFAGIA.....	36

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	38
5. MATERIALI E METODI	42
5.1. ISOLAMENTO DEI FIBROBLASTI DA BIOPSIA CUTANEA.....	43
5.2. COLTURE CELLULARI.....	43
5.4. ESTRAZIONE DELLE PROTEINE	46
5.5. QUANTIFICA DELLE PROTEINE.....	46
5.6. WESTERN BLOT.....	47
5.6.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	47
5.6.2. PREPARAZIONE DEL GEL	47
5.6.3. ELETTROFORESI SU GEL DI ACRILAMMIDE.....	49
5.6.4. TRASFERIMENTO SU MEMBRANA DI NITROCELLULOSA	50
5.6.5. RILEVAMENTO DELLE PROTEINE	51
5.6.6. ANTICORPI UTILIZZATI.....	52
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	53

1. INTRODUZIONE

1.1. METABOLISMO LIPIDICO

I lipidi sono un gruppo di sostanze chimicamente diverse fondamentali per l'organismo umano, in quanto costituiscono sia una risorsa energetica che una componente essenziale di ormoni e membrane. I trigliceridi, una forma di lipidi, assunti con la dieta, vengono processati dalla lipasi intestinale, ovvero un enzima secreto dal pancreas che permette la loro trasformazione in glicerolo e acidi grassi (Principi-di-biochimica-Lehninger, s.d.). In base alla lunghezza della catena, gli acidi grassi possono essere assorbiti con due diverse modalità: quelli a media e corta catena attraversano la mucosa intestinale e vengono trasportati nel sangue, grazie al loro legame con l'albumina, per permetterne la distribuzione ai tessuti; gli acidi grassi a lunga catena entrano nelle cellule della mucosa intestinale dove vengono esterificati a trigliceridi (Busatto et al., 2020).

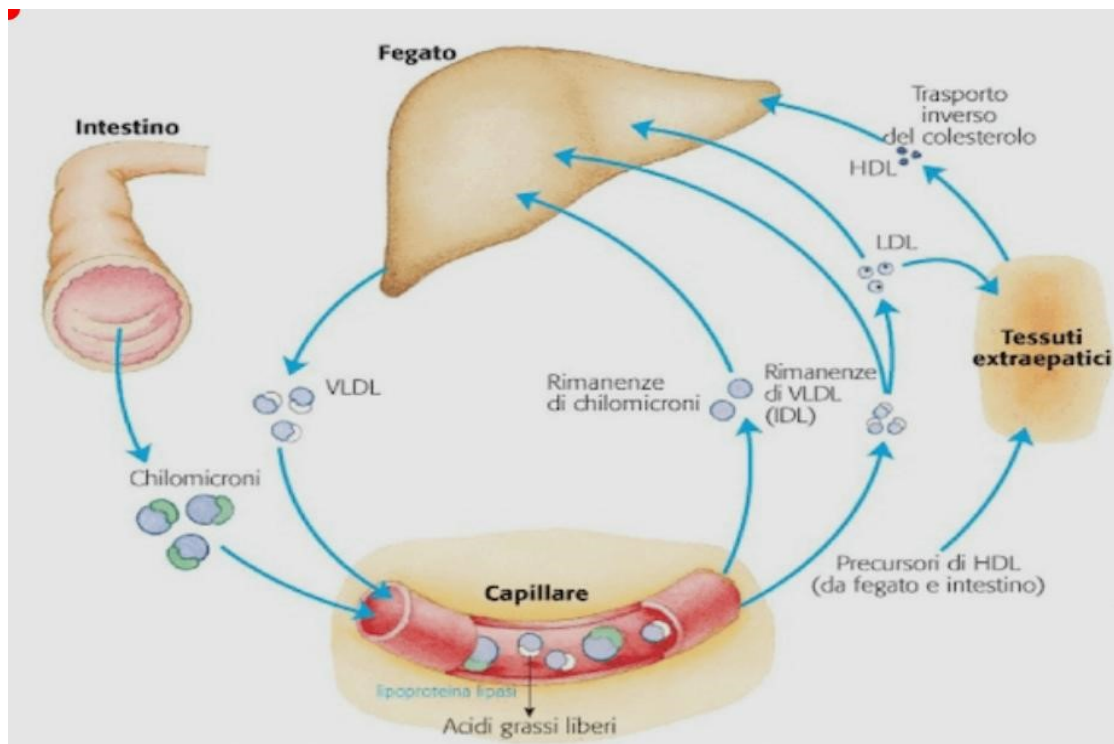


Figura 1: trasporto e distribuzione degli acidi grassi a lunga catena nell'organismo, (Lipoproteine, s.d.)

I trigliceridi formati vengono incorporati nei chilomicroni, ovvero aggregati sferici lipoproteici, composti internamente da colesterolo e trigliceridi e all'esterno da proteine (chiamate apoproteine) e fosfolipidi. I chilomicroni formati vengono rilasciati nel circolo

sanguigno per esocitosi (Figura 1) e successivamente, per contatto con le HDL (*High Density Lipoprotein*) ricevono le proteine apoCII (necessarie per l'attivazione della LPL, ovvero la lipoproteina lipasi) e apoE (necessarie per l'interazione con i recettori epatici). Grazie alla LPL i trigliceridi presenti nei chilomicroni vengono idrolizzati ad acidi grassi, i quali vengono assorbiti dai tessuti, come tessuto adiposo e muscoli; i chilomicroni rimanenti raggiungono il fegato, dove vengono internalizzati e degradati dal lisosoma per ottenere colesterolo e trigliceridi, mentre i componenti di membrana vengono utilizzati per la formazione di nuove HDL. Questa assunzione di trigliceridi permette di trasformare le VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) immature in VLDL mature, che sono aggregati lipoproteici sferici, che per esocitosi vengono rilasciati nel circolo sanguigno. Anche loro, prendono contatto con le HDL per ricevere apoproteine necessarie per l'attivazione della LPL e per la successiva interazione con recettori epatici. Successivamente le VLDL proseguono nel loro percorso per distribuire, grazie all'azione della LPL, acidi grassi alle cellule dei tessuti periferici. Nel fare ciò, la concentrazione di trigliceridi al loro interno diminuisce mentre aumenta quella del colesterolo, per cui man mano che le VLDL cedono acidi grassi, passano a IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*) e successivamente a LDL (*Low Density Lipoprotein*), le quali distribuiscono colesterolo a tessuti extraepatici che esprimono il recettore delle LDL. Esiste anche un trasporto inverso del colesterolo, operato dalle HDL, aggregati lipoproteici in grado di rimuovere i lipidi in eccesso dai tessuti (Busatto et al., 2020).

Una volta che si trovano all'interno delle cellule, gli acidi grassi possono andare incontro a due destini principali (Haemmerle et al., 2011) :

- Essere trasportati al mitocondrio dove vengono poi sottoposti alla β -ossidazione;
- Formare le *lipid droplets* (LD)

1.1.1. OSSIDAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI

Gli acidi grassi possono essere impiegati per la produzione di energia e per fare ciò è necessario che vengano sottoposti alla β -ossidazione, una serie di reazioni che avviene nel mitocondrio. Prima di tutto, quindi, gli acidi grassi vengono trasferiti nei mitocondri (Figura 2). Gli acidi grassi a lunga catena vengono trasferiti grazie all'aiuto di un sistema di trasporto denominato *shuttle* della carnitina (Longo et al., 2016). Il trasporto con la carnitina prevede

come primo passaggio l'attivazione degli acidi grassi, che consiste in una reazione catalizzata dall'Acil-CoA sintasi che ha come risultato finale la formazione di Acil-CoA. A questo punto interviene un altro enzima, ovvero la carnitina palmitoil transferasi 1 (CPT-1) che permette il legame dell'acido grasso alla carnitina (formazione di acil-carnitina) e la liberazione del coenzima A. Grazie al trasportatore, l'acil-carnitina viene trasportata nella matrice mitocondriale e qui viene processata dall'enzima carnitina palmitoil transferasi 2 (CPT-2) per formare Acil-CoA e carnitina che viene trasportata nel citoplasma per permettere l'inizio di un nuovo ciclo di trasporto (Longo et al., 2016).

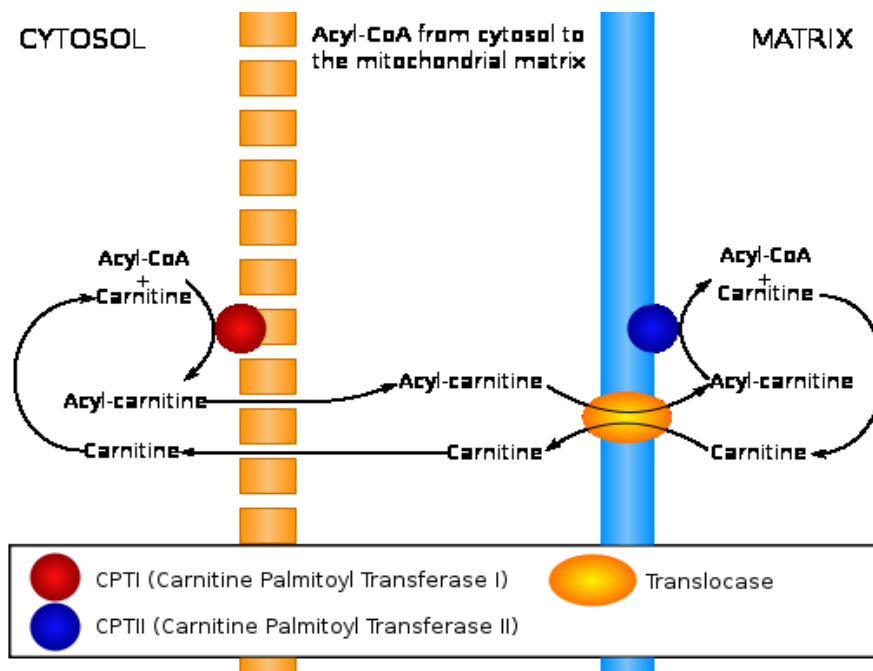


Figura 2: trasporto degli acidi grassi nei mitocondri, (Carnitine palmitoyltransferase II (CPT2) deficiency, s.d.)

A questo punto, ha inizio il processo di β -ossidazione, la quale consiste nella demolizione in più passaggi della catena di acido grasso in unità a due atomi di carbonio, sotto forma di Acetil-CoA. Da ogni passaggio si liberano anche una molecola di FADH_2 e una molecola di NADH , utilizzati poi nella catena respiratoria per la formazione di ATP. Le molecole di Acetil-CoA entrano poi a far parte del ciclo dell'acido citrico, dove si liberano altre molecole di FADH_2 e NADH , utilizzati in seguito per ulteriore produzione di ATP (Aloisi, 2017).

1.2. LIPID DROPLETS

Le *lipid droplets* sono organelli cellulari dinamici, composti da un nucleo di lipidi neutri circondato da un monostrato di fosfolipidi e sulla cui superficie si possono trovare diverse proteine essenziali per il loro utilizzo (F

igura 3). I lipidi neutri che compongono questi organelli sono triacilgliceroli (TAG) ed esteri degli steroli (Olzmann & Carvalho, 2019).

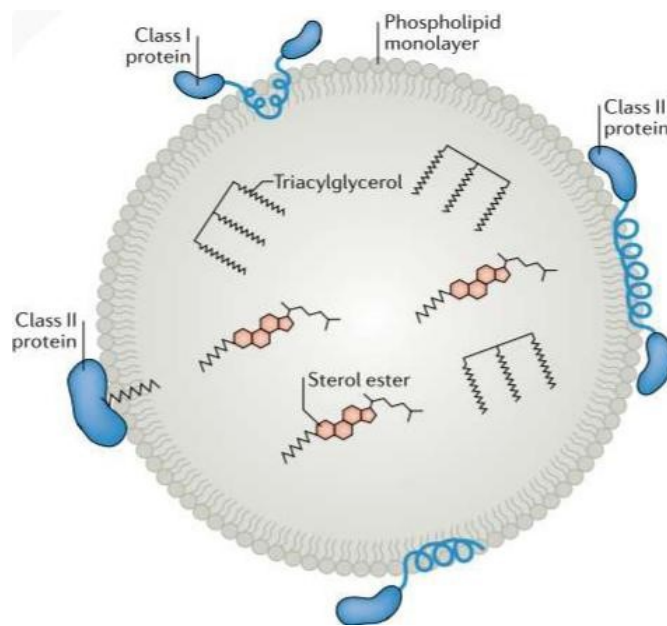


Figura 3: struttura dei lipid droplets, (Olzmann & Carvalho, 2019)

La sintesi di queste molecole, così come la sintesi delle *lipid droplets*, avviene nello spazio tra la membrana esterna e interna del reticolo endoplasmatico liscio (Zadoorian et al., 2023)

I triacilgliceroli, detti anche trigliceridi, si formano attraverso una serie di reazioni che permettono la condensazione di molecole di acidi grassi con il glicerolo-3-fosfato. La prima reazione consiste nella trasformazione del glicerolo-3-fosfato ad acido lisofosfatidico grazie all'enzima glicerolo-3-fosfato aciltransferasi (GPAT). L'acido lisofosfatidico subisce l'azione dell'enzima acilglicerolo-3-fosfato aciltransferasi (AGPAT) che catalizza la formazione di acido fosfatidico, il quale a sua volta viene processato dall'enzima acido fosfatidico fosfatasi (PAP, chiamato anche lipin) a formare diacilglicerolo; quest'ultimo viene trasformato in triacilglicerolo grazie all'azione di un enzima denominato

diacilglicerolo aciltransferasi (DGAT), un enzima integrale di membrana localizzato sul reticolo endoplasmatico (Olzmann & Carvalho, 2019).

Gli esteri del colesterolo sono invece sintetizzati a partire dagli steroli grazie ad una reazione di esterificazione ad opera dell'enzima acil-CoA acil-O-transferasi (ACAT) (Olzmann & Carvalho, 2019).

Sulla superficie delle lipid droplets si possono trovare proteine importanti per la regolazione della lipolisi; queste proteine possono essere divise in (Olzmann & Carvalho, 2019):

- Proteine di classe I: si tratta di proteine derivanti dal reticolo endoplasmatico;
- Proteine di classe II: si tratta di proteine reclutate direttamente dal citoplasma

In base alla loro localizzazione subcellulare possiamo avere sia *lipid droplets* citoplasmatiche che nucleari. Il meccanismo con cui vengono prodotte varia in relazione alla loro localizzazione subcellulare (Olzmann & Carvalho, 2019).

1.2.1. SINTESI DELLE *LIPID DROPLETS* CITOPLASMATICHE

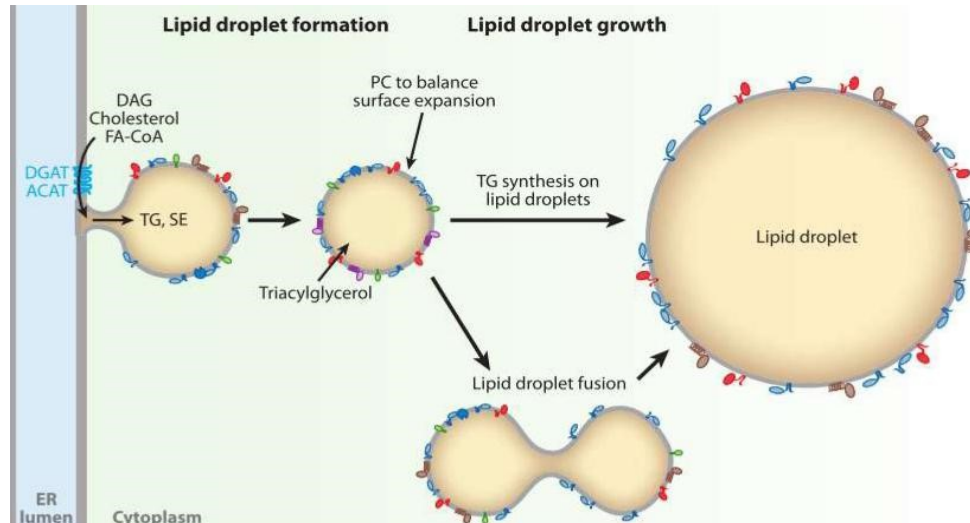


Figura 4: formazione e maturazione delle lipid droplets citoplasmatiche , (Walther & Farese, 2012)

La sintesi delle *lipid droplets* citoplasmatiche avviene nel reticolo endoplasmatico liscio (Figura 4). Quando la concentrazione di lipidi neutrali è bassa, essi si trovano dispersi tra la membrana esterna e interna; quando invece la concentrazione è sufficientemente elevata, i

lipidi neutri si avvicinano l'uno all'altro e formano una lente tra le due membrane. Successivamente, si ha la gemmazione della lente che viene rivestita dalla membrana del reticolo endoplasmatico, si formano quindi delle vescicole secretorie. Questo passaggio avviene grazie all'aiuto di un complesso proteico denominato COPII (*Coat Protein Complex II*), che permette una giusta curvatura della membrana per facilitare la gemmazione stessa, e dalle proteine FIT (*fat storage-inducing transmembrane proteins*), che sono proteine di membrana del reticolo endoplasmatico. Un'altra proteina importante per la genesi delle *lipid droplets* è Serpina, una proteina integrale di membrana del reticolo endoplasmatico che serve per una corretta incorporazione sia di proteine che di lipidi e per ottenere una corretta morfologia (Olzmann & Carvalho, 2019). Le *lipid droplets* che si generano inizialmente hanno una dimensione ridotta per cui è necessario che vadano incontro a maturazione, ovvero a crescita, per generare *lipid droplets* che hanno una dimensione maggiore e sono quindi più stabili (Zadoorian et al., 2023). Questo può avvenire attraverso due meccanismi:

- Fusione di più *lipid droplets*; questo passaggio è facilitato da proteine della famiglia CIDE (*cell death inducing DFFA-like effector*) (Zadoorian et al., 2023)
- Sintesi di triacilgliceroli direttamente sulle *lipid droplets*; questo avviene attraverso la localizzazione sulla loro superficie di enzimi derivanti dal reticolo endoplasmatico (Zadoorian et al., 2023)

1.2.2. SINTESI DELLE *LIPID DROPLETS* NUCLEARI

Le *lipid droplets* nucleari possono essere sintetizzate attraverso due diversi meccanismi in base al tipo di cellule in cui risiedono:

- Sintesi de novo (Figura 5): si ha una gemmazione a partire dalla membrana nucleare interna, seguendo un meccanismo simile a quello che si ha per la generazione delle *lipid droplets* citoplasmatiche; questo meccanismo può essere indotto da un elevato livello di acido fosfatidico (Zadoorian et al., 2023)

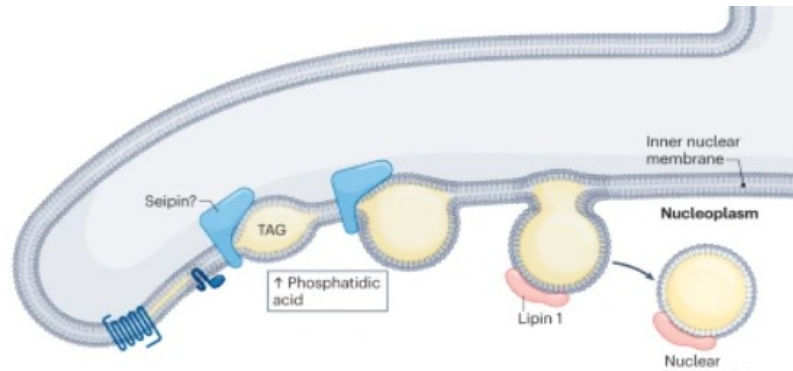


Figura 5: formazione di lipid droplets nucleari dalla membrana nucleare interna (Zadoorian et al., 2023)

- Trasporto dei precursori delle VLDL (particelle lipidiche che non esprimono le proteine ApoB) dal lume del reticolo endoplasmatico al nucleo (Figura 6); questo meccanismo è utilizzato dagli epatociti in condizione di stress del reticolo endoplasmatico e può avere un ruolo anche MTP (proteina microsomiale di trasporto dei trigliceridi), ovvero un trasportatore di trigliceridi importante per la sintesi delle VLDL (Zadoorian et al., 2023).

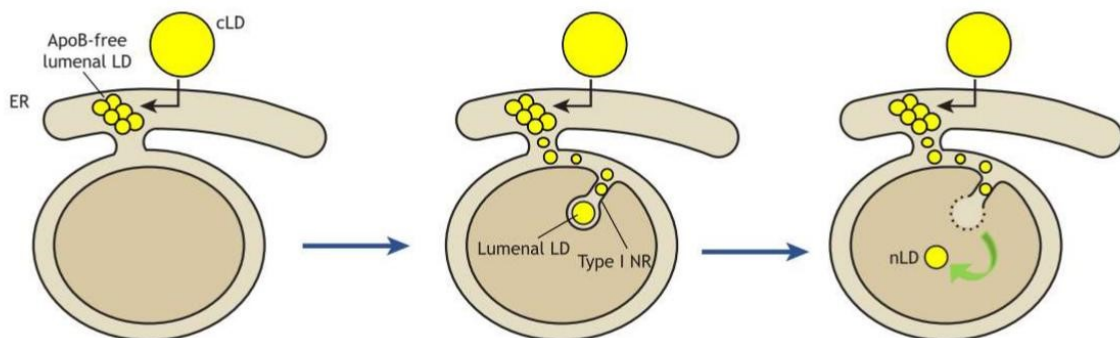


Figura 6: formazione di lipid droplets nucleari in epatociti, (T, 2022)

1.2.3. FUNZIONI DELLE LIPID DROPLETS

Le *lipid droplets* sono organelli cellulari essenziali per la corretta crescita cellulare e svolgono diverse funzioni (Figura 7), che comprendono:

- Funzione di riserva di lipidi (Olzmann & Carvalho, 2019): i lipidi neutri contenuti all'interno delle *lipid droplets*, possono essere utilizzati dalle cellule quando queste ne hanno più bisogno, ovvero:
 - Durante la crescita cellulare quando è necessaria l'espansione della membrana citoplasmatica e quindi un'alta produzione di fosfolipidi

- Durante i periodi di digiuno, quando è necessario usare i lipidi come fonte energetica per ricavare ATP attraverso la fosforilazione ossidativa
- Protezione dalla lipotossicità: quando la concentrazione citoplasmatica di lipidi è elevata, queste molecole possono impattare sulle funzionalità vitali delle cellule; il sequestro delle molecole lipidiche all'interno delle *lipid droplets* permette di ridurre le concentrazioni (Jarc & Petan, 2019). In questo modo si evita la lipotossicità, che può essere raggiunta attraverso diversi meccanismi:
 - Gli acidi grassi liberi, non esterificati possono agire da detergenti e quindi intaccare l'integrità della membrana citoplasmatica (Olzmann & Carvalho, 2019)
 - Gli acidi grassi liberi possono anche essere impiegati per la formazione di altre specie molecolari che ad elevate concentrazioni sono tossiche per la cellula, come ad esempio la ceramide, l'acilcarnitina e il diacilglicerolo (Olzmann & Carvalho, 2019)
- Protezione della membrana cellulare dalle reazioni di perossidazione lipidica (Olzmann & Carvalho, 2019)
- Protezione contro lo stress del reticolo endoplasmatico: alcuni eventi possono portare all'interruzione del processo di ripiegamento delle proteine da parte del reticolo endoplasmatico, causando accumulo di proteine non correttamente ripiegate nel citoplasma. Questo porta all'attivazione di un sistema chiamato UPR (*unfolded protein response*) che avviene attraverso l'attivazione di alcune proteine integrali di membrana del reticolo endoplasmatico, ovvero IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*) e ATF6 (*activating transcription factor 6*) (Zadoorian et al., 2023). La conseguenza dell'attivazione della risposta UPR è una cascata di segnalazione che porta alla diminuzione della trascrizione e traduzione di proteine, all'aumento di espressione di geni coinvolti nel ripiegamento delle proteine, ma anche all'aumento di sintesi di *lipid droplets*. Secondo alcuni studi, questi organelli cellulari sarebbero in grado di alleviare lo stress del reticolo endoplasmatico sequestrando le proteine non correttamente ripiegate (Jarc & Petan, 2019)
- Protezione del mitocondrio durante l'autofagia: le cellule, in condizioni di deprivazione prolungata di nutrienti attivano l'autofagia, un meccanismo attraverso il quale le cellule utilizzano i propri componenti cellulari come fonte di energia. Durante questo processo, si ha il rilascio di lipidi dalle *lipid droplets* per sfruttarli al fine di ottenere energia. Una

parte dei lipidi rilasciati viene però riesterificata a trigliceridi e inserita di nuovo all'interno delle *lipid droplets*. Questo avviene per evitare che la concentrazione citoplasmatica di queste molecole aumenti troppo, poiché un elevato livello di acidi grassi comporta un alto flusso di queste molecole al mitocondrio, che richiede la formazione di acil-carnitina, una specie lipidica che è tossica ad elevate concentrazioni perché può modificare il potenziale di membrana mitocondriale; la formazione delle *lipid droplets* permette quindi di tenere sotto controllo la concentrazione di acil-carnitina (Zadoorian et al., 2023)

- Produzione di mediatori cellulari: dalla liberazione dei lipidi contenuti in questi organelli cellulari si generano mediatori cellulari importanti per la funzione cellulare (Jarc & Petan, 2019). Un esempio è la produzione di acidi grassi necessari per l'attivazione dei recettori della famiglia PPAR (*peroxisome proliferator- activated receptor*) (Haemmerle et al., 2011).

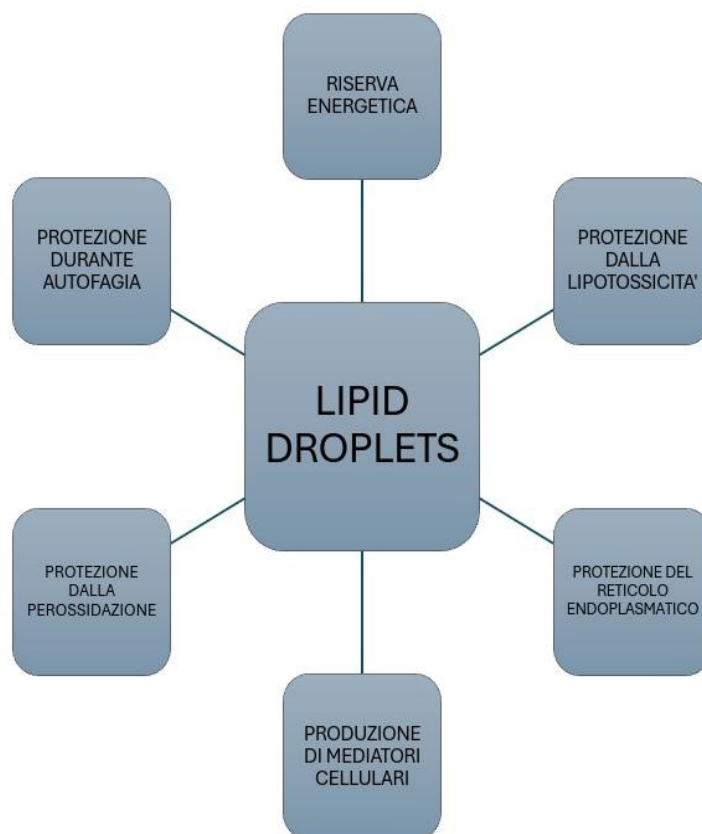


Figura 7: le diverse funzioni delle *lipid droplets*

1.2.4. CATABOLISMO DELLE *LIPID DROPLETS*

Le cellule possono utilizzare i lipidi immagazzinati all'interno delle *lipid droplets* per la produzione di energia o per la sintesi di fosfolipidi di membrana o per la sintesi di ormoni steroidei, molecole segnale (Sztalryd & Brasaemle, 2017). Questo può avvenire attraverso due meccanismi principali (Figura 8): la lipolisi e l'autofagia (Walther & Farese, 2012).

La lipolisi è un processo che prevede la liberazione progressiva degli acidi grassi contenuti nei trigliceridi; si tratta di una serie di reazioni catalizzate da enzimi diversi. Il primo che interviene è l'ATGL (*adipose triglyceride lipase*), codificata dal gene PNPLA2 (*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2*), una proteina che si trova sulla superficie delle *lipid droplets* e che catalizza l'idrolisi dei trigliceridi a formare una molecola di acido grasso libero e una molecola di diacilglicerolo (DAG). Quest'ultimo, in base al tipo cellulare, può essere processato da diversi enzimi. Studi effettuati sul tessuto adiposo rivelano che negli adipociti la lipasi HSL (*hormone-sensitive lipase*) catalizza la trasformazione del diacilglicerolo in monoacilglicerolo (MAG), con la liberazione di un'altra molecola di acido grasso. La reazione successiva di idrolisi del MAG prevede l'intervento dell'enzima MAGL (monoacilglicerolo lipasi) che permette la formazione di una molecola di acido grasso e una molecola di glicerolo. Gli acidi grassi prodotti dalle diverse reazioni possono poi essere utilizzati dalle cellule (Sztalryd & Brasaemle, 2017). Mutazioni a carico della proteina ATGL o del suo attivatore CGI-58 (*Comparative Gene Identification – 58*) possono portare a una patologia chiamata *Neutral lipid storage disease* (Missaglia et al., 2019).

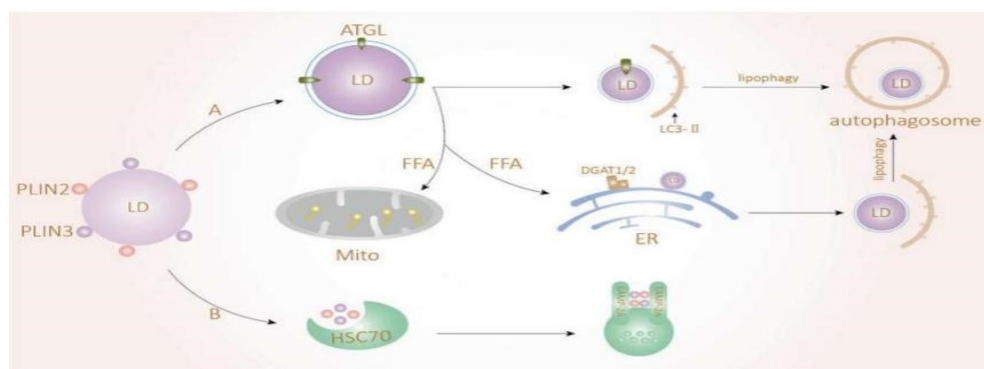


Figura 8: tipi di metabolismo delle *lipid droplets* (Zhang et al., 2022)

Il secondo meccanismo utilizzato dalle cellule per l'utilizzo dei lipidi contenuti nelle *lipid droplets* è l'autofagia (Walther & Farese, 2012), un meccanismo che consente alle cellule di

utilizzare i loro stessi organelli per ottenere energia in caso di deprivazione prolungata di nutrienti. Ci sono tre diversi meccanismi di autofagia (Zhang et al., 2022):

- Macroautofagia: parti o interi organelli vengono inglobati all'interno di una struttura detta autofagosoma e poi inviati al lisosoma, dove una serie di enzimi permettono l'idrolisi dei componenti degli organelli (Xu & Fan, 2022)
- Microautofagia: si ha un'espansione della membrana lisosomiale che ingloba parti o interi organelli cellulari, quindi si ha l'idrolisi dei loro componenti grazie agli enzimi lisosomiali (Xu & Fan, 2022)
- Autofagia chaperone-mediata (CMA): a differenza dei precedenti meccanismi descritti, la CMA permette l'idrolisi lisosomiale di singole proteine, che nella loro struttura hanno una determinata sequenza aminoacidica, ovvero un motivo KFERQ; quest'ultimo viene riconosciuta da una chaperonina, ovvero la proteina denominata HSC70 (*heat shock cognate 70 kDa protein*), che permette poi la connessione con il lisosoma grazie al legame con LAMP2A (*Lysosome-associated membrane glycoprotein 2*), una proteina di membrana lisosomiale (Zhang et al., 2022).

A livello delle *lipid droplets*, i meccanismi più utilizzati sono la macroautofagia (che viene chiamata in questo caso lipofagia) e l'autofagia chaperone-mediata (Sztalryd & Brasaemle, 2017). In tutte le cellule le *lipid droplets* espongono sulla loro superficie PLIN2 e PLIN3, che sono proteine appartenenti alla famiglia delle perilipine. Perché possa avvenire la macroautofagia è necessario che queste due proteine vengano rimosse e questo avviene tramite la CMA, quindi attraverso il loro trasporto al lisosoma e successiva degradazione; questo permette anche un maggiore accesso di ATGL alla superficie delle *lipid droplets*, facilitando la lipolisi (Sztalryd & Brasaemle, 2017). A questo punto, può iniziare la macroautofagia, per cui sono essenziali alcune proteine espresse sulle *lipid droplets*, quali Rab7 (*Ras-related protein Rab7*) e Rab10 (*Ras-related protein Rab-10*) (Zhang et al., 2022). La prima è necessaria per il reclutamento della struttura pre-autofagosomale, ovvero il fagoforo, che esprime la proteina LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), mentre Rab10 serve per facilitare la fusione successiva dell'autofagosoma con il lisosoma (Zhang et al., 2022). Si ha quindi l'invaginazione di intere *lipid droplets* o di parte di esse all'interno dell'autofagosoma, che poi si fonde con il lisosoma, riversando il contenuto al suo interno; quest'ultimo viene processato dagli enzimi lisosomiali, quindi si ha l'idrolisi dei triacilgliceroli a formare acidi grassi liberi, che possono essere utilizzati

successivamente come fonte energetica. Una parte degli acidi grassi liberi, viene però riesterificata in *lipid droplets* per evitare che la concentrazione di acil-carnitina, necessaria perché possa avvenire la β -ossidazione, raggiunga livelli troppo alti, in quanto si tratta di una molecola tossica a concentrazioni elevate (Olzmann & Carvalho, 2019). Un'altra proteina che svolge un ruolo importante nell'autofagia è p62, anche chiamata sequestosoma-1 (SQSTM1) una proteina è in grado di riconoscere le proteine ubiquitinate e indirizzarle all'autofagia; è utilizzata come *marker* dell'autofagia in quanto essa stessa viene inglobata nell'autofagosoma (Liu et al., 2016).

Secondo alcuni studi effettuati sugli adipociti, la lipolisi avviene per le *lipid droplets* di dimensione maggiore, mentre quelli con dimensione minore vengono sottoposte a lipofagia. Questo potrebbe implicare che i due meccanismi possano essere sequenziali, ovvero che la lipolisi permetta di ridurre le dimensioni delle *lipid droplets*, successivamente processate tramite lipofagia (Zhang et al., 2022).

1.3. NEUTRAL LIPID STORAGE DISEASE

Mutazioni a carico dei geni codificanti per l'ATGL o per CGI-58, una proteina attivatrice della ATGL, possono portare ad una serie di disordini metabolici racchiusi sotto il nome di *Neutral Lipid Storage Disease* (NLS). Si tratta di disordini genetici rari, che portano a una diminuita capacità delle cellule di idrolizzare i triacilgliceroli immagazzinati all'interno delle *lipid droplets*, per cui si ha un accumulo anomalo di questi organelli in leucociti, fibroblasti, cheratinociti, miociti del muscolo scheletrico, miociti del muscolo cardiaco, epatociti, alcune cellule facenti parte del sistema nervoso centrale e alcune cellule del sistema uditivo. L'accumulo delle *lipid droplets*, porta a disfunzioni importanti a livello di diversi organi (Missaglia et al., 2019).

In base al tipo di manifestazioni del disordine metabolico e di mutazione genetica, possiamo avere due tipologie di NLS (Figura 9):

- NLSM (*Neutral lipid storage disease with myopathy*): i pazienti affetti da questa patologia, hanno una mutazione sul gene PNPLA2, ovvero sul gene codificante per l'ATGL e sviluppano sempre miopatia (Reilich et al., 2011)

- NLSDI (*Neutral lipid storage disease with ichtiosis*): patologia che si ha in pazienti affetti da una mutazione a carico del gene ABHD5 codificante per la proteina CGI-58; questi pazienti sviluppano ittiosi (Durdu et al., 2018)

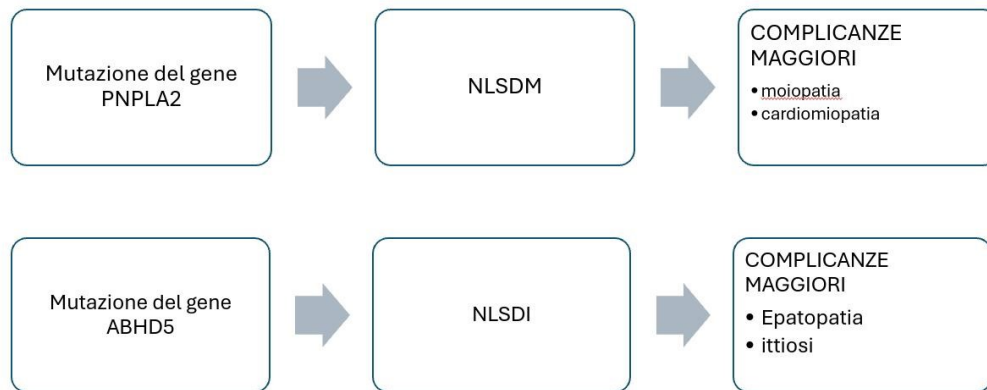


Figura 9: tipi di Neutral Lipid Storage Disease

1.3.1. NLSDM

Si tratta di una malattia rara a trasmissione autosomica recessiva con una prevalenza inferiore a 1/1.000.000. Al momento in letteratura sono stati descritti circa 100 casi nel mondo (*Orphanet: Neutral lipid storage disease with myopathy*, s.d.)

I pazienti con la proteina ATGL mutata, mostrano un difetto nella capacità di lipolisi delle *lipid droplet*, che si traduce in una minor capacità di produrre energia. Le mutazioni genetiche possono avere diversi effetti sulla proteina stessa, ovvero formazione di proteina tronca, nessuna produzione di proteina, formazione di una proteina con ridotta o assente attività lipolitica, oppure formazione di proteina con alterata capacità di legare le *lipid droplets* (Missaglia et al., 2019). Le persone affette da questa patologia possono sviluppare diverse complicanze, quali miopatie, cardiomiopatie, epatomegalia, diabete e statura bassa (J. Chen et al., 2010).

La miopatia del muscolo scheletrico si sviluppa in tutti i pazienti affetti da NLSDM, ma non tutti sviluppano miopatie cardiache, questo dipende dal tipo di mutazione genetica e dal suo effetto su ATGL. La debolezza muscolare è solitamente il primo sintomo diagnosticato della miopatia associata a NLSDM ed è dovuta al fatto che mutazioni della proteina ATGL portano ad una incorretta capacità di idrolisi dei trigliceridi, che quindi impattano sulla produzione di energia. L'aumento delle *lipid droplets* si osserva principalmente nei miociti delle fibre

muscolari di tipo I, nella zona subsarcolemmale. In queste cellule si osserva spesso una diminuzione di miofibrille. I meccanismi che portano al vero e proprio danno muscolare non sono ancora chiari e una diminuita capacità contrattile si osserva solo in una porzione di pazienti. Spesso si osserva atrofia dei muscoli cervicali, lombari e degli arti (Missaglia et al., 2019).

Nei casi più gravi, i pazienti possono sviluppare cardiomiopatia, con accumulo di *lipid droplets* sia nei cardiomiociti che nelle cellule endoteliali e del muscolo liscio delle arterie coronarie (Hirano et al., 2008). In particolar modo, si può avere steatosi dei cardiomiociti, insufficienza cardiaca, aterosclerosi coronarica o ipertrofia cardiaca (Missaglia et al., 2019).

Il fenotipo della patologia è variabile perché i pazienti possono sviluppare una patologia lieve o grave in relazione alla mutazione di ATGL. La diagnosi viene effettuata quando si rilevano elevati livelli di creatina chinasi nel sangue, una condizione chiamata ipercemia e debolezza degli arti. La diagnosi consiste nella rilevazione della cosiddetta anomalia di Jordan, ovvero la presenza di vacuoli ripieni di trigliceridi nei leucociti del sangue periferico, rafforzata successivamente da test genetici (*Orphanet: Neutral lipid storage disease with myopathy*, s.d.).

1.3.2. NLSDI

In pazienti in cui vi è una mutazione nel gene ABHD5, che codifica per la proteina CGI-58, si sviluppa una forma di *Neutral Lipid Storage Disease* che si manifesta con eritroderma ittiosiforme non bolloso (Schweiger et al., 2009); quest'ultimo consiste nella presenza di squame biancastre che si diffondono su tutta la superficie del corpo (Akiyama et al., 2003). Si tratta di una patologia rara a trasmissione autosomica recessiva, con una prevalenza inferiore a 1/1.000.000 e circa 150 casi riportati in letteratura (*Orphanet: Neutral lipid storage disease with ichthyosis*, s.d.).

La proteina CGI-58 è necessaria per l'attivazione della lipasi ATGL, ma in assenza di essa la lipasi è comunque in grado di idrolizzare i trigliceridi contenuti nelle *lipid droplets*, anche se con efficienza minore, per cui le manifestazioni cliniche sono diverse rispetto ai pazienti con NLSDM (Lass et al., 2006).

La miopatia non è presente in tutti pazienti e nei pazienti in cui è presente, è associata ad un minore danno muscolare. A differenza della NLSDM, la patologia NLSDI è raramente associata a cardiomiopatia (Schweiger et al., 2009).

L'organo più danneggiato in persone con NLSDI è il fegato: i pazienti possono sviluppare epatomegalia, steatosi epatica ed in alcuni casi cirrosi epatica (Missaglia et al., 2019). A livello epatico ATGL è meno espressa di ABHD5, motivo per cui si pensa che ABHD5 possa attivare anche altre lipasi e quindi la sua non funzionalità impatti molto sul fegato, che viene quindi danneggiato maggiormente in pazienti affetti da NLSDI rispetto a pazienti affetti da NLSDM (Schreiber et al., 2019).

Un altro organo che viene particolarmente danneggiato in questa patologia è la cute; nei pazienti si osserva accumulo di *lipid droplets* nei fibroblasti e nei cheratinociti. Si nota infatti una forma di eritroderma ittiosiforme non bolloso diffuso su tutto il corpo, ovvero la presenza di squame bianche e traslucide, che si accumulano soprattutto a livello del tronco, scalpo e viso; si può osservare anche cheratosi, soprattutto a livello di palmi delle mani e dei piedi (Missaglia et al., 2019).

Anche in questo caso, la diagnosi avviene facendo prima un'analisi per la rilevazione dell'anomalia di Jordan nei leucociti del sangue periferico e successivamente test genetici per verificare la presenza della mutazione genetica di ABHD5 (*Orphanet: Neutral lipid storage disease with ichthyosis*, s.d.).

1.4. ATGL (*adipose triglyceride lipase*)

La proteina ATGL è responsabile del primo passaggio della lipolisi, ovvero dell'idrolisi dei trigliceridi, contenuti all'interno delle *lipid droplets*, a formare diacilgliceroli e molecole di acido grasso (Sztalryd & Brasaemle, 2017). ATGL è codificata dal gene *PNPLA2* che, situato sul cromosoma 11p15.5, contiene 10 esoni codificanti per 504 aminoacidi. La struttura della proteina (Figura 10) non è ancora stata determinata sperimentalmente, ma solo su predizioni basate sulla struttura primaria, ovvero sulla sequenza amminoacidica, e sulla sua omologia con le strutture degli altri membri della famiglia PNPLA, ovvero una famiglia di lipasi che condividono la presenza di uno stesso dominio denominato dominio della fosfolipasi *patatin-like* (Cerk et al., 2018). In ATGL, questo dominio si trova nella porzione N-terminale

della proteina, in particolar modo comprende gli aminoacidi dalla posizione I10 a L178 (Missaglia et al., 2019). In questa porzione di proteina, troviamo anche:

- Sito catalitico, di cui fanno parte gli aminoacidi S47 e D166, essenziali per l'attività catalitica della proteina; la serina in posizione 47 è inserita all'interno di un motivo GX SXG, tipico delle lipasi (Cerk et al., 2018)
- Motivi LIR, una regione necessaria per l'interazione con la proteina LC3, un noto marcatore di autofagia (Missaglia et al., 2019); il legame con LC3 è necessario anche per la corretta localizzazione di ATGL sulle *lipid droplets* (Vegliante et al., 2018). Lungo la struttura di ATGL, ci sono tre motivi LIR, ovvero C15-V20, P86-V91 e S145-V150 (Martinez-Lopez et al., 2016).

Nella porzione N-terminale troviamo una regione responsabile dell'interazione con alcune proteine regolatrici, che sono CGI-58 e GOS2 (Cornaciu et al., 2011).

Nella porzione C-terminale della proteina, troviamo invece una regione idrofobica che è fondamentale in quanto permette il legame con le *lipid droplets* (Kobayashi et al., 2008).

Ci sono anche siti di fosforilazione, quali la serina S404; l'aggiunta di un fosfato su questo aminoacido provoca l'aumento di attività idrolitica di ATGL (Pagnon et al., 2012).

Vista l'importanza che ricopre questa proteina, essa viene regolata a diversi livelli.

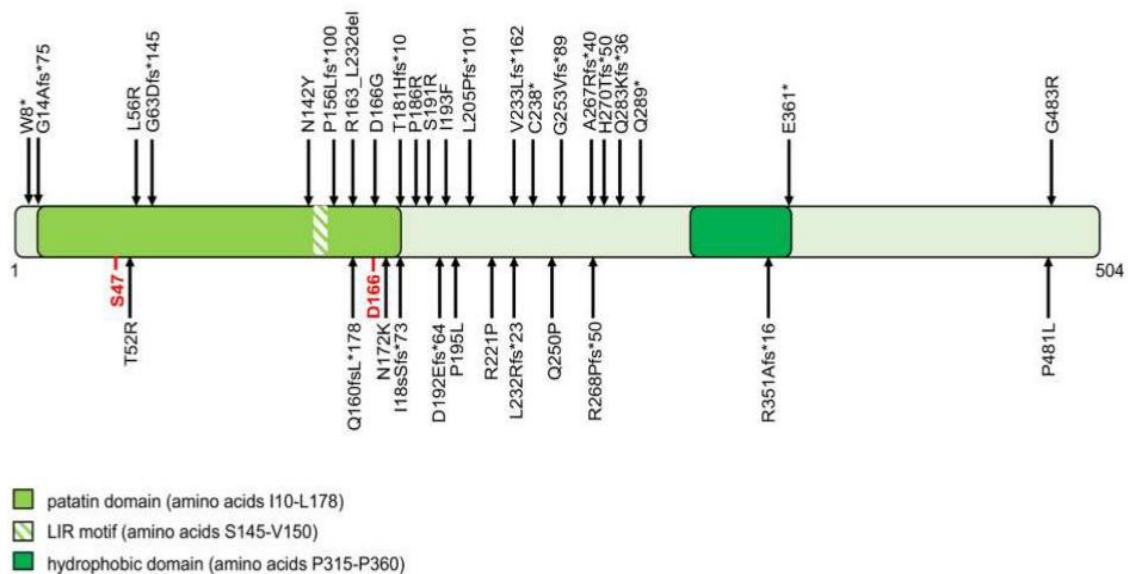


Figura 10: struttura della proteina ATGL in cui sono indicate mutazioni riscontrate in alcuni pazienti (Missaglia et al., 2019)

1.4.1. REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE

Il gene *PNPLA2* è bersaglio del fattore di trascrizione PPAR- α (*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), una proteina che viene attivata dagli acidi grassi e successivamente trasloca nel nucleo dove può agire come regolatore della trascrizione di diversi geni, tra cui quello responsabile della sintesi di ATGL. Agonisti del recettore PPAR- α sono quindi in grado di indurre la trascrizione del gene *PNPLA2*. Questo effetto lo si ha anche dopo stimolo con i glucocorticoidi, quali il dexametasone, o durante il digiuno. Al contrario, insulina, TNF α (*tumor necrosis factor α*), mTOR (*mechanistic target of rapamycin kinase*) e l'ingestione di alimenti reprimono la trascrizione di *PNPLA2* (Lass et al., 2011).

1.4.2. REGOLAZIONE POST TRADUZIONALE

Perché ATGL possa svolgere la sua azione di lipolisi, deve essere localizzata sulla superficie delle *lipid droplets*. Una volta prodotta, viene trasportata dal reticolo endoplasmatico alle *lipid droplets* grazie all'aiuto delle proteine GBF1 (*golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1*) e ARF1 (*ADP ribosylation factor 1*) e del complesso proteico COPI (*coat protein complex I*), essenziali anche per il trasporto di proteine dal reticolo endoplasmatico al Golgi. Il funzionamento di questo sistema proteico è fondamentale affinché ATGL possa localizzarsi sulle *lipid droplets*, prendere contatto con i triacilgliceroli e poter svolgere la sua azione di lipolisi (Cerk et al., 2018). La localizzazione sulle *lipid droplets* è controllata anche dall'interazione di ATGL con LC3, attraverso il motivo LIR (Vegliante et al., 2018).

1.4.3. REGOLAZIONE A LIVELLO DI PROTEINA

Sulla superficie delle *lipid droplets*, si possono trovare proteine regolatrici dell'attività idrolitica di ATGL; tra queste, la famiglia delle perilipine (PLIN), svolge un ruolo predominante (Sztalryd & Brasaemle, 2017). Si tratta di un gruppo composto da cinque proteine (PLIN1-PLIN5), che hanno in comune un dominio PAT localizzato all'N-terminale necessario per la localizzazione sulle *lipid droplets* (Hickenbottom et al., 2004).

Un'altra proteina essenziale per la regolazione di ATGL, è CGI-58, costituita da 33 aminoacidi. Questa proteina funge da attivatore di ATGL, in quanto è in grado di aumentarne l'attività lipolitica. È localizzata sulla superficie delle *lipid droplets* grazie alla presenza di una regione idrofobica all'N-terminale (Cerk et al., 2018).

In base al tessuto, diverse perilipine possono intervenire per la regolazione di ATGL. Nel tessuto adiposo, a questo scopo svolge un ruolo fondamentale PLIN1 (Figura 11). Si tratta di una proteina composta da 522 amminoacidi che, in condizioni basali, sequestra CGI-58 sulla superficie delle *lipid droplets*, impedendo il legame con ATGL; quest'ultima quindi mantiene un'attività idrolitica a bassa efficienza (Cerk et al., 2018).

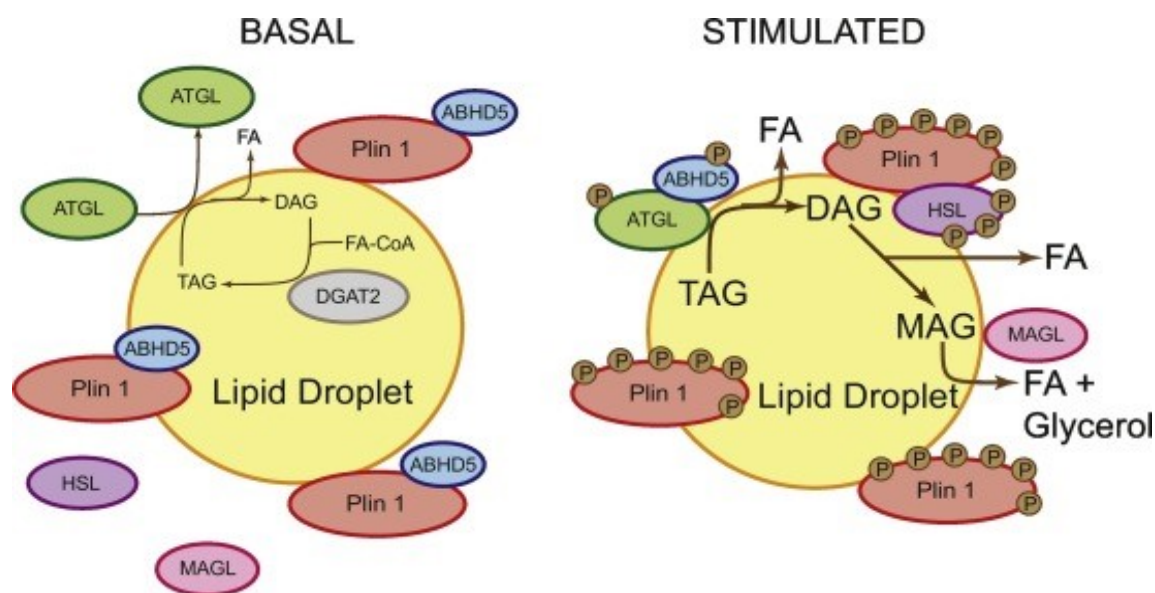


Figura 11: regolazione dell'attività idrolitica di ATGL da Plin1 (Sztalryd & Brasaemle, 2017)

In condizioni di stimolazione dell'attività β -adrenergica, si ha l'attivazione della proteinkinasi A (PKA) che è in grado di fosforilare sia PLIN1 che CGI-58, causando il rilascio di CGI-58, che a questo punto può legare l'ATGL, aumentandone l'attività idrolitica (Walther & Farese, 2012). Negli adipociti, si ha anche la fosforilazione di HSL (*hormone-sensitive lipase*), che viene reclutata sulla superficie delle *lipid droplets*, dove può catalizzare l'idrolisi dei diacilgliceroli formati grazie alla reazione di idrolisi dei triacilgliceroli mediata da ATGL (Missaglia et al., 2019).

Nei tessuti ossidativi, quali cuore e muscolo scheletrico, in condizioni basali CGI-58 è sequestrato da un'altra perilipina, ovvero da PLIN5, che è localizzata sulle *lipid droplets* (Walther & Farese, 2012). Il rilascio di CGI-58 avviene con lo stesso meccanismo descritto negli adipociti: in seguito all'attivazione dei recettori β -adrenergici, si ha l'attivazione della protein chinasi A, che fosforila sia PLIN5 che CGI-58, causando il rilascio di quest'ultima che può legare e attivare l'ATGL (Cerk et al., 2018).

Le perilipine PLIN2 e PLIN3 sono invece espresse ubiquitariamente sulla superficie delle *lipid droplets* (Sztalryd & Brasaemle, 2017) e, a differenza di PLIN1 e PLIN5, non contengono nella loro struttura la porzione al C-terminale necessaria per l'interazione con CGI-58 (Patel et al., 2014). Queste proteine, quindi, non agiscono impedendo l'attivazione di ATGL, ma in condizione di stimolazione dell'attività lipolitica vengono degradate attraverso un processo di autofagia mediato da chaperonine (CMA), per facilitare l'interazione di ATGL con CGI-58 e il suo accesso ai triacilgliceroli (Schweiger & Zechner, 2015).

La perilipina 4 viene espressa sulle *lipid droplets* in muscolo scheletrico, cuore e tessuto adiposo, ma il suo ruolo non è ancora stato chiarito (W. Chen et al., 2013).

Un'altra proteina che ricopre un ruolo importante nella regolazione della lipolisi è G0S2 (*G0/G1 switch gene protein*), una proteina di 103 aminoacidi espressa ubiquitariamente con maggiore espressione nel tessuto adiposo, cuore, muscolo scheletrico e fegato. Si tratta di un inibitore non competitivo e dose dipendente di ATGL; l'inibizione avviene anche in presenza di CGI-58 (Cerk et al., 2018) (Cerk et al., 2014).

La proteina PEDF (*pigment epithelium derived factor*), anche chiamata SERPINF1, è in grado di legare direttamente l'ATGL attivandola, aumentando così la lipolisi basale in adipociti, epatociti e retina (Borg et al., 2011);

La lipolisi dei triacilgliceroli contenuti nelle *lipid droplets* può essere controllata negativamente dalla proteina CIDEA (anche nota come CIDE-3) (Missaglia et al., 2019). Quest'ultima, svolge un ruolo importante anche nella maturazione delle *lipid droplets* (Zadoorian et al., 2023), attraverso la sua porzione C-terminale ed è in grado di interagire con l'ATGL e diminuirne, così, l'accesso ai triacilgliceroli. CIDEA è anche in grado di legare la proteina Egr1 (*Early growth response 1*), facilitando il suo legame con la regione

promotrice del gene *PNPLA2*, regolandone negativamente la trascrizione (Singh et al., 2014).

Secondo alcuni studi, un'altra proteina capace di regolare la lipolisi, è HILPDA (*Hypoxia-inducibile lipid droplet-associated protein*) la cui espressione è indotta da condizioni di ipossia. Essa si co-localizza con PLIN2 e PLIN3 sulla superficie delle *lipid droplets* e siccome mostra similitudini con la porzione idrofobica della proteina G0S2 necessaria per l'interazione con l'ATGL, si suppone che sia in grado di inibire l'ATGL (Cerk et al., 2018).

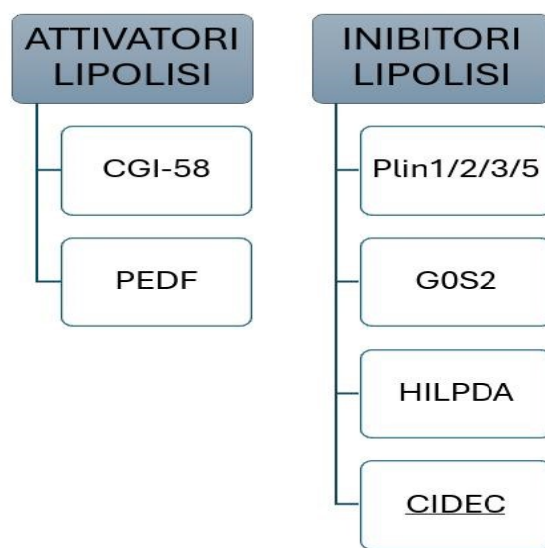


Figura 12: proteine attivatrici ed inibitrici della lipolisi mediata da ATGL

1.4.4. ALTRI TIPI DI REGOLAZIONE

Anche molecole non proteiche possono interferire con la lipolisi, quali l'Acyl-CoA a lunga catena, che servono per la β -ossidazione, ma anche come precursori di membrane lipidiche. Queste molecole in condizioni normali sono per la maggior parte legate a proteine ACBP (*acyl-CoA binding proteins*), ma quando aumenta la loro concentrazione citoplasmatica in forma libera, sono in grado di effettuare un meccanismo di *feedback* negativo sulla lipolisi, inibendo l'ATGL e anche HSL (Cerk et al., 2018).

1.4.5. MUTAZIONI DI ATGL

Sono stati isolati fibroblasti da pazienti con diverse mutazioni sul gene che codifica l'ATGL (Figura 13), con diverso impatto sulla proteina e sulla sua funzionalità. Si possono avere mutazioni a singolo nucleotide, ovvero scambio di un singolo nucleotide con un altro (sostituzione di basi) oppure mutazioni *frameshift*, che consistono nell'inserzione o delezione di uno o più nucleotidi (Barcaccia & Falcinelli, 2008). A seconda della natura e della regione in cui avvengono queste mutazioni, la conseguenza può essere diversa. La sostituzione di basi varia la sequenza del codone in cui è inserita e questo può portare a due conseguenze diverse (Barcaccia & Falcinelli, 2008):

- il codone codifica per lo stesso aminoacido della sequenza *wild type*
- Il codone codifica per un aminoacido diverso rispetto alla sequenza *wild-type*

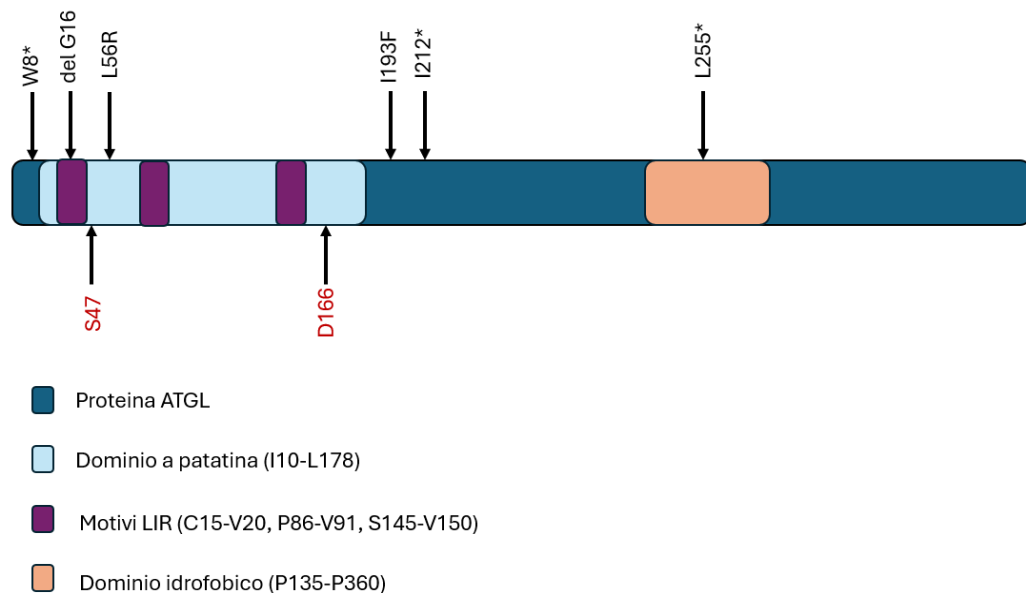


Figura 13: struttura di ATGL con indicate le mutazioni dei fibroblasti usati durante gli esperimenti; in rosso sono indicati gli aminoacidi della diade catalitica

Le mutazioni *frameshift* causano invece lo spostamento della cornice di lettura dei codoni, per cui viene cambiata tutta la sequenza amminoacidica derivante dalla sequenza genetica a valle della mutazione (Barcaccia & Falcinelli, 2008).

La regione N-terminale (fino al residuo amminoacidico 254) è essenziale per l'interazione con la proteina attivatrice CGI-58 (Cerk et al., 2018), quindi mutazioni che riguardano questa

porzione di ATGL possono impedire o limitarne l'attività idrolitica, portando ad una funzionalità ridotta o assente. Mutazioni che riguardano invece il dominio idrofobico possono portare ad una mancata capacità di legame con la superficie delle *lipid droplets*, essenziale affinché l'ATGL possa svolgere la sua azione di idrolisi dei trigliceridi. In un paziente è stata identificata una mutazione a singolo nucleotide in una delle regioni LIR, necessarie per l'interazione con LC3. Alcuni pazienti hanno una delezione di un tratto del gene così importante da portare all'assenza di produzione della proteina; quindi, questi pazienti non sono in grado di fare lipolisi delle *lipid droplets*. In particolare è stato descritto un paziente che ha ereditato mutazioni da entrambe i genitori: dal padre ha ereditato una sostituzione di basi che porta al rimozione dell'esone 5 dal trascritto e causa la perdita dell'attività catalitica della proteina; dalla madre ha invece ereditato una mutazione che porta alla mancata trascrizione del mRNA e conseguentemente alla mancata traduzione della proteina (Missaglia et al., 2017).

Ci sono anche delezioni che permettono la produzione di ATGL, ma quest'ultima vede la sua struttura profondamente alterata in quanto cambia la sequenza di lettura durante la traduzione.

Pazienti in cui la proteina ATGL non viene prodotta sviluppano più facilmente cardiomiopatia, che è presente all'incirca nel 36% dei pazienti (Pasanisi et al., 2016). In ogni caso la patologia NLSDM comporta difficoltà motorie in tutti i pazienti.

2. SCOPO DEL LAVORO

La malattia da accumulo di lipidi neutri (*Neutral Lipid Storage Disease with Miopathy - NLSDM*) è una patologia genetica scoperta solo di recente che comporta nei pazienti debolezza muscolare, mialgia e cardiomiopatia. La patologia, causata da mutazioni nel gene *PNPLA2* che codifica per la proteina ATGL, si manifesta in modo recessivo, ovvero i genitori dei pazienti sono portatori di una copia alterata del gene, ma non manifestano la patologia. Studi recenti hanno attribuito la causa di questa miopatia a un difetto che altera i meccanismi attraverso i quali le cellule si difendono da un eccessivo accumulo di lipidi nei tessuti, tuttavia, i meccanismi che causano i danni muscolari sono ad oggi sconosciuti.

Al momento non esiste un trattamento in grado di correggere il deficit metabolico, ma sono solamente raccomandate variazioni del regime alimentare (*Vasiljevski et al., 2018*).

Il mio lavoro di tesi si inserisce in un progetto di ricerca volto a studiare, in fibroblasti isolati da pazienti affetti da NLSDM, le alterazioni dei meccanismi biologici causati dalle diverse mutazioni nel gene *PNPLA2*.

Poiché è più semplice ottenere biopsie cutanee piuttosto che muscolari, studi iniziali vengono svolti su questo tipo cellulare, con l'intento di verificare in seguito le conoscenze acquisite analizzando colture di mioblasti.

In particolare, mi sono focalizzata su fibroblasti ottenuti da un paziente che porta la mutazione c. 45-47delCGG (p.delG16) che situata nel dominio LIR della proteina ATGL potrebbe comprometterne il legame con la proteina LC3 e quindi interferire con il processo di lipofagia.

Lo scopo ultimo di questi studi è di determinare i meccanismi coinvolti nella patologia per poter suggerire trattamenti terapeutici che possano migliorare la qualità della vita dei pazienti.

3. RISULTATI

3.1. IL TRATTAMENTO CON ACIDO OLEICO INDUCE NEI FIBROBLASTI UN ACCUMULO DI *LIPID DROPLETS*, MA NON LIPOTOSSICITÀ

Al fine di indagare i meccanismi molecolari alla base della patologia NLSDM, il lavoro è stato incentrato sui fibroblasti primari ottenuti mediante biopsia cutanea da paziente classificato come NLSDM-025; come controllo, sono stati utilizzati fibroblasti da donatore sano di età/sexo equivalente classificato come C9.

È noto che il trattamento con acido oleico induce nelle cellule un aumento di numero e grandezza delle *lipid droplets*. Abbiamo voluto verificare se l'acido oleico inducesse lipotossicità nei fibroblasti NLSDM che già presentano un numero maggiore di *lipid droplets*.

In primo luogo, è stata effettuata una curva dose risposta, trattando le cellule con acido oleico a concentrazione di 50, 100, 200 e 400 μM per 48 ore.

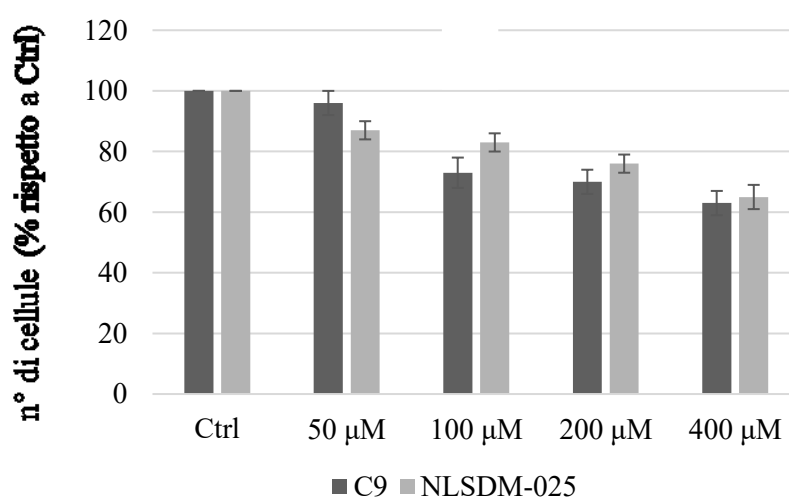


Figura 1: conta cellulare dopo trattamento con acido oleico

Come riportato nel grafico (Figura 1) e nelle immagini a microscopia a contrasto di fase (Figura 2-5), nelle cellule sottoposte a trattamento con acido oleico si è riscontrata una piccola riduzione nel numero di cellule simile tra paziente e controllo. Non si è osservata una significativa citotossicità anche alle dosi maggiori di 400 μM , ma un accumulo di *lipid droplets*, osservabile sia nei fibroblasti di controllo che di paziente. Questo lo si può notare sia nelle cellule coltivate in presenza di siero e ancora di più nelle cellule coltivate in assenza di siero.

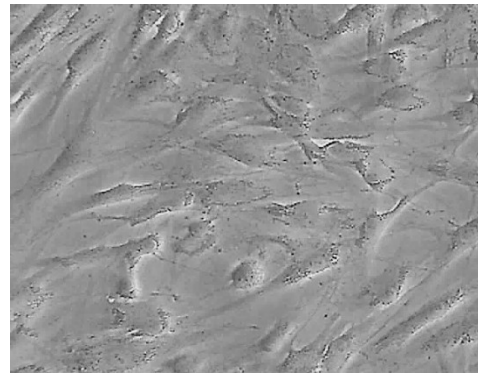
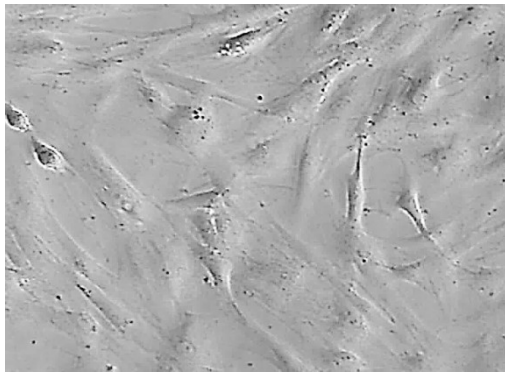


Figura 2: fibroblasti C9 prima e dopo trattamento con acido oleico

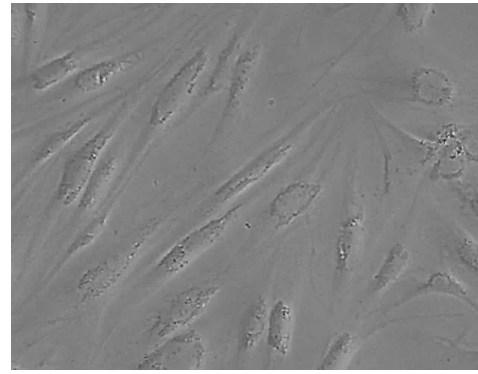
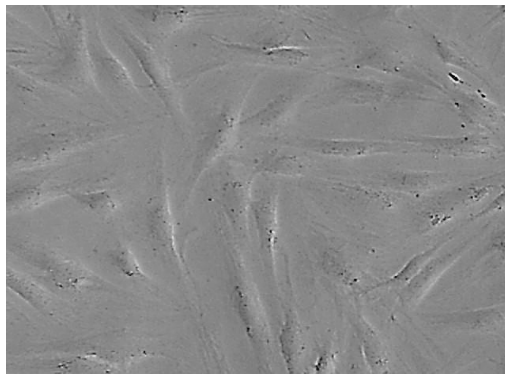


Figura 3: fibroblasti 025 prima e dopo trattamento con acido oleico

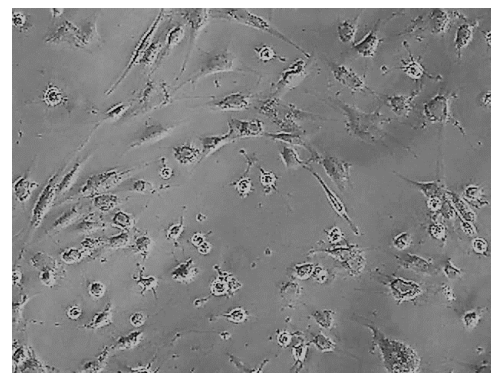
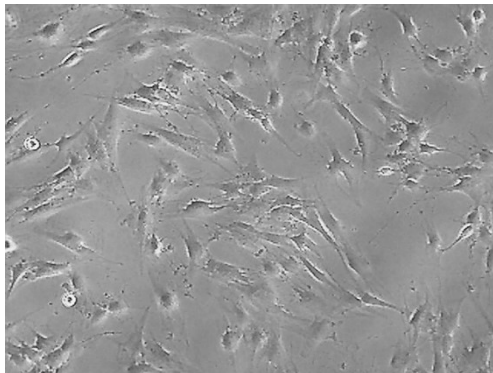


Figura 4: fibroblasti C9 coltivati in assenza di siero, prima e dopo trattamento con acido oleico

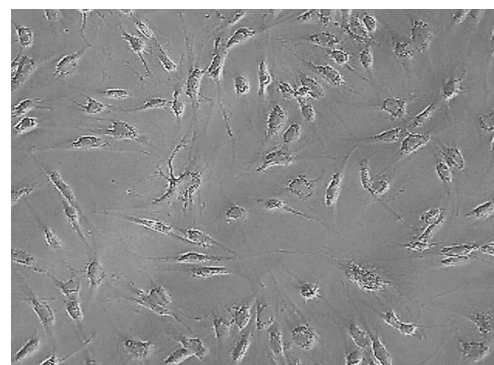
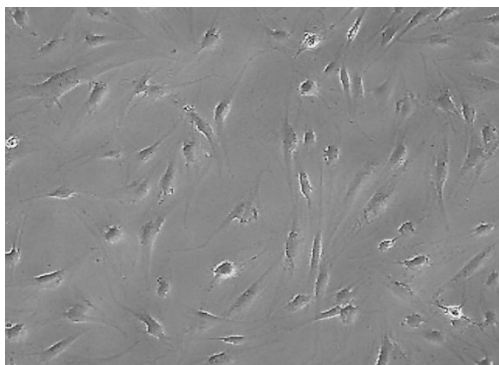


Figura 5: fibroblasti 025 coltivati in assenza di siero, prima e dopo trattamento con acido oleico

3.2. HSC70 E PLIN2 SI ACCUMULANO NEI FIBROBLASTI NLSDM-025 TRATTATI CON ACIDO OLEICO IN ASSENZA DI SIERO

L'autofagia mediata da *chaperone* (CMA) degrada selettivamente un sottoinsieme di proteine citosoliche nei lisosomi. Un potente attivatore fisiologico della CMA è la deprivazione di nutrienti, una condizione in cui anche le riserve di trigliceridi intracellulari o le *lipid droplets* subiscono idrolisi (lipolisi) per generare acidi grassi liberi a fini energetici. La proteina perilipina 2 (PLIN2) associata alle *lipids droplets* è stata descritta essere substrato della CMA e la sua degradazione tramite CMA promuove la lipolisi. Studi *in vivo* hanno rivelato che la degradazione di PLIN2 da parte della CMA aumenta durante la deprivazione di siero, contemporaneamente a un aumento di ATGL e proteine della macroautofagia sulle *lipids droplets*. Il blocco di CMA in cellule coltivate porta a una ridotta associazione di ATGL e proteine correlate alla macrolipofagia alle *lipids droplets* e alla successiva diminuzione dell'ossidazione lipidica. Il primo passaggio nella CMA è l'interazione del substrato con HSC70 per il successivo indirizzo al lisosoma.

Abbiamo valutato mediante Western blot l'espressione di HSC70 e PLIN2 in fibroblasti NLSDM-025 e C9 trattati con acido oleico 400 microM per 48 ore in presenza o in assenza di siero.

Dall'immagine riportata in Figura 6, si nota che i livelli della proteina HSC70 nei fibroblasti C9 diminuiscono in seguito al trattamento con acido oleico in assenza di siero, mentre si accumulano in presenza di siero. Al contrario, non si osserva alcuna diminuzione dei livelli di HSC70 nei fibroblasti NLSDM-025 in entrambe le condizioni.

Coerentemente, nei fibroblasti NLSDM-025 coltivati in presenza di siero si osserva un accumulo della proteina PLIN2 a seguito di trattamento con acido oleico che è ancora maggiore in assenza di siero. Anche nei fibroblasti C9 il trattamento con acido oleico induce un aumento della proteina PLIN2, ma questo è significativamente ridotto quando le cellule sono coltivate in assenza di siero.

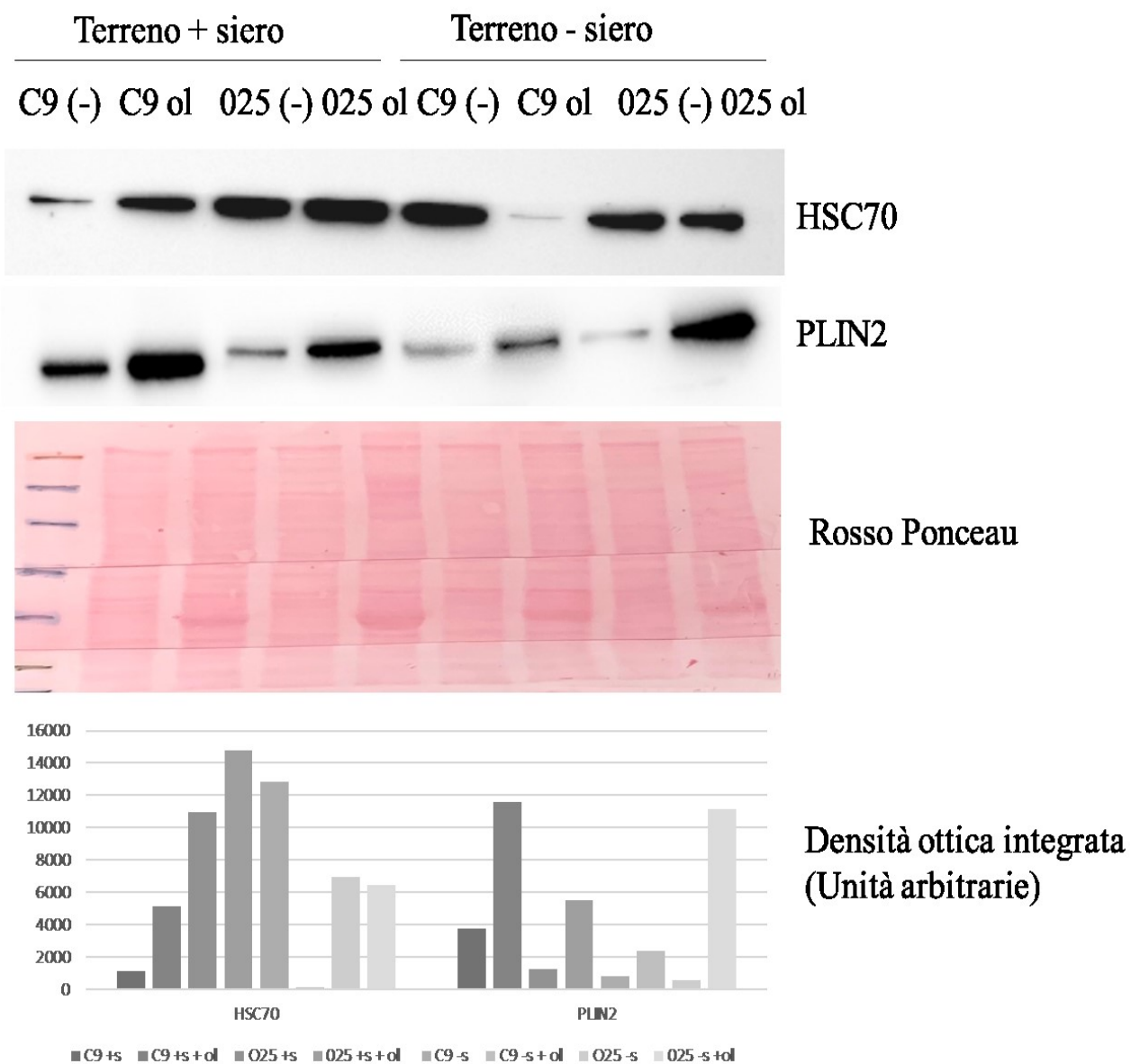


Figura 14: Analisi Western blot rappresentativa dei livelli delle proteine HSC70 e PLIN2 in cellule C9 e NLSDM-025 prima e dopo trattamento con acido oleico 400 microM per 48 ore, sia in presenza che in assenza di siero. La carica uguale dei campioni è stata confermata dalla colorazione della membrana con rosso Panceau. Il grafico sottostante riporta le letture di densità ottica integrata effettuata mediante software Image Lab delle bande riportate in Figura, espressa come unità arbitrarie.

3.3. FIBROBLASTI NLSDM-025 TRATTATI CON ACIDO OLEICO IN ASSENZA DI SIERO MOSTRANO UN DIFETTO DI AUTOFAGIA

L'autofagia è un percorso catabolico deputato alla degradazione delle proteine e degli organelli citosolici attraverso il lisosoma. Il meccanismo autofagico ha un ruolo indispensabile nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e nel turnover del materiale citoplasmatico, ma è anche implicato in diverse patologie umane.

Nel processo autofagico la proteina LC3 viene tagliata dalla cisteina proteasi ATG4 per formare il frammento LC3-I; questo si coniuga con la fosfatidiletanolamina per generare LC3-II. La fosfatidiletanolamina funge da ancora lipidica per consentire l'inserzione di LC3-II a livello della membrana dell'autofagosoma (Zhou et al., 2022). La proteina LC3 viene tipicamente utilizzata come marker autofagico, in quanto la sua presenza correla col numero di autofagosomi. Un secondo marker utilizzato nel monitoraggio dell'autofagia è la proteina p62. La proteina p62 viene infatti degradata dall'autofagosoma grazie all'interazione con LC3, e la sua quantità è dunque inversamente proporzionale al livello di autofagia cellulare.

Abbiamo valutato mediante Western blot l'espressione di LC3I e II e di p62 in fibroblasti C9 e NLSDM-025 trattati o meno con acido oleico 400 microM per 48 ore in assenza di siero.

Dall'immagine riportata in Figura 7, si nota che i livelli della proteina p62 nei fibroblasti C9 diminuiscono in seguito al trattamento con acido oleico in assenza di siero, mentre si accumulano nei fibroblasti NLSDM-025.

Coerentemente, come si evince dal grafico relativo all'analisi Western blot, nei fibroblasti NLSDM-025 coltivati in assenza di siero si osserva un rapporto LC3II/I costante in risposta al trattamento con acido oleico, mentre il rapporto LC3II/I aumenta nei fibroblasti di controllo C9 dopo trattamento.

Terreno - siero

C9 (-) C9 ol 025 (-) 025 ol

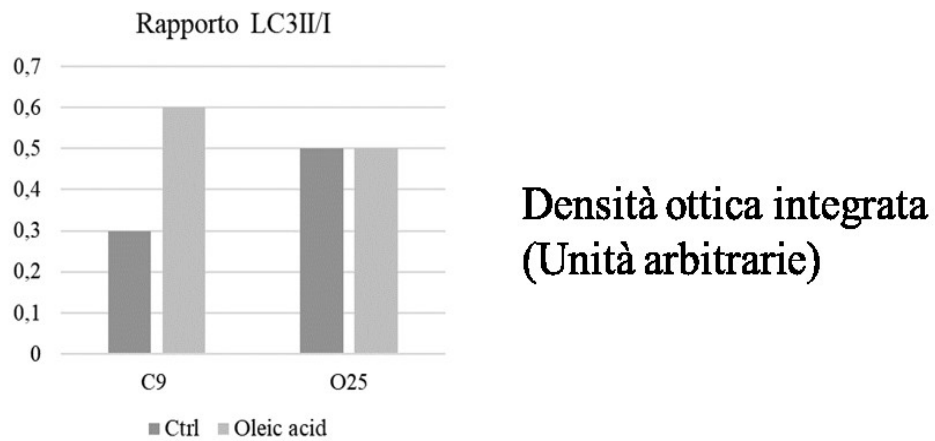
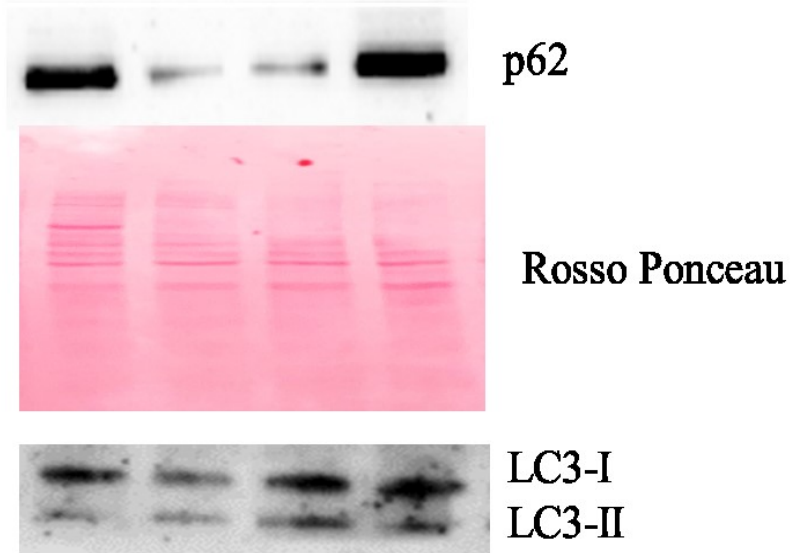


Figura 7: Analisi Western blot rappresentativa dei livelli delle proteine p62 e LC3-II/I in cellule C9 e NLSDM-025 prima e dopo trattamento con acido oleico 400 microM per 48 ore, in assenza di siero. La carica uguale dei campioni è stata confermata dalla colorazione della membrana con rosso Ponceau. Il grafico sottostante riporta le il rapporto LCII/I calcolato sulle letture di densità ottica integrata effettuata mediante software Image Lab delle bande riportate in Figura.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La malattia da accumulo di lipidi neutri (NLSN) rappresenta un insieme di patologie caratterizzate da un difetto nella degradazione dei trigliceridi citoplasmatici, con conseguente accumulo di *lipid droplets* nel citoplasma delle cellule di vari tessuti. Questa condizione si distingue per la sua eterogeneità: attualmente sono stati identificati casi di NLSN associata a ittiosi (NLSNI, nota anche come malattia di Chanarin-Dorfman) e di NLSN con miopatia (NLSMI, o miopatia da accumulo di lipidi neutri). Queste malattie sono estremamente rare e vengono trasmesse con modalità autosomica recessiva. Nella NLSNI/malattia di Chanarin-Dorfman, la causa è attribuita a mutazioni del gene ABHD5 (localizzato su 3p21). Al contrario, la NLSMI è connessa a mutazioni del gene PNPLA2/ATGL, situato nella regione 11p15.5.

La prima diagnosi della patologia si fonda sull'osservazione di leucociti contenenti vacuoli lipidici e sul riscontro di un difetto nella degradazione dei trigliceridi in colture cellulari (linfoblasti o fibroblasti), in particolare in presenza di una funzione mitocondriale normale. A questo segue l'analisi genetica per identificare il tipo di mutazione coinvolta.

L'evoluzione della malattia è generalmente lenta e variabile, e alcuni pazienti possono raggiungere l'età adulta. Purtroppo, non esiste ad oggi un trattamento in grado di correggere il deficit metabolico associato a queste patologie.

La lipasi degli acidi grassi ATGL è l'enzima limitante della velocità per l'idrolisi dei trigliceridi (TAG) immagazzinati nelle *lipid droplets*. ATGL è una proteina di 504 aminoacidi caratterizzata da due principali regioni funzionali: un dominio *patatin-like* (residui I10-L178) e un dominio idrofobo (residui P315-P360). Il dominio *patatin-like* contiene la diade catalitica S47 e D166, essenziale per l'attività della lipasi, e tre motivi di interazione con LC3 (LIR) coinvolti nell'interazione ATGL-LC3. Il dominio idrofobo consente il legame tra ATGL e le *lipid droplets*.

Le mutazioni di ATGL causano l'insorgenza di NLSMI. Fino ad ora, sono stati descritti al mondo 107 pazienti affetti. Tutti i soggetti sviluppano una miopatia muscolare scheletrica progressiva, con coinvolgimento sia prossimale che distale. Un coinvolgimento muscolare asimmetrico è stato osservato in quasi il 50% dei pazienti. La biopsia muscolare mostra un massiccio accumulo di lipidi e atrofia. Le altre principali caratteristiche cliniche sono la cardiomiopatia (40% dei pazienti), e l'epatomegalia con alterazione degli enzimi epatici (20% dei pazienti). Alcuni pazienti presentano anche diabete, pancreatite cronica e perdita dell'udito. In generale, c'è grande variabilità nel fenotipo NLSMI, e una correlazione tra il

grado di gravità dei sintomi clinici e le mutazioni identificate nel gene codificante per ATGL, PNPLA2, è difficile da stabilire.

Ad oggi, sono state identificate 60 diverse mutazioni di PNPLA2 e la maggior parte di esse porta a una perdita totale o a una grave compromissione dell'attività di ATGL. Tuttavia, alcuni pazienti portatori di mutazioni severe presentano una miopatia progressiva tardiva e/o lieve, senza coinvolgimento cardiaco. Per questo motivo, la patofisiologia della NLSDM è ancora ampiamente sconosciuta e, al momento, non esiste un trattamento specifico.

Nel mio lavoro di tesi mi sono occupata della messa in coltura di fibroblasti di controllo e di un paziente affetto da NLSDM nel quale è stata identificata la mutazione c.45-47delCGG (p.delG16).

Poiché la mutazione cade all'interno di un dominio LIR noto per interagire con LC3, ho voluto verificare se ci fosse un difetto nel processo di autofagia.

Inizialmente abbiamo verificato se in risposta a un carico con acido oleico i fibroblasti del paziente presentassero una maggiore lipotossicità. Trattando i fibroblasti con acido oleico sia in presenza che in assenza di siero non è stato osservato un aumento di lipotossicità. Sia nei fibroblasti di controllo che del paziente si è osservata solo una lieve riduzione nel numero di cellule, mentre in entrambe è stato osservato un aumento nel numero e dimensioni delle *lipid droplets*. Successive analisi con marcatura specifica e analisi di immagine permetteranno di quantificarle con precisione.

È noto che la deprivazione di nutrienti, una condizione in cui anche le riserve di trigliceridi intracellulari o le *lipid droplets* subiscono idrolisi per generare acidi grassi liberi a fini energetici, attiva l'autofagia mediata da *chaperone* (CMA) per degradare selettivamente un sottoinsieme di proteine nei lisosomi. Un substrato della CMA è la proteina perilipina 2 (PLIN2) associata alle *lipids droplets*, la cui degradazione precede la lipolisi. Studi *in vivo* hanno rivelato che la degradazione di PLIN2 da parte della CMA aumenta durante la deprivazione di siero. Il blocco di CMA porta in cellule coltivate a una ridotta associazione di ATGL alle *lipids droplets* e alla successiva diminuzione dell'ossidazione lipidica. Il primo passaggio nella CMA è la sua interazione con HSC70 per il successivo indirizzo al lisosoma.

L'analisi Western blot dell'espressione di HSC70 e PLIN2 in fibroblasti C9 e NLSDM-025 trattati con acido oleico in presenza o in assenza di siero ha evidenziato che i livelli della proteina HSC70 e PLIN2 diminuiscono nei fibroblasti C9 in seguito al trattamento con acido oleico in assenza di siero. Al contrario, non si osserva alcuna diminuzione dei livelli di HSC70 e PLIN2 nei fibroblasti NLSDM-025 in entrambe le condizioni.

Inoltre abbiamo osservato che i livelli della proteina p62 nei fibroblasti C9 diminuiscono in seguito al trattamento con acido oleico in assenza di siero, mentre si accumulano nei fibroblasti NLSDM-025.

Coerentemente, nei fibroblasti di controllo C9 il rapporto LC3II/I aumenta dopo trattamento con acido oleico mentre nei fibroblasti NLSDM-025 coltivati si osserva un rapporto LC3II/I costante in risposta al trattamento.

Questi dati preliminari suggeriscono un deficit di CMA e un alterato flusso nel processo di autofagia nei fibroblasti NLSDM-025. Sicuramente i vari processi andranno maggiormente caratterizzati a livello molecolare, così come andrà verificata l'interazione tra ATGL e LC3 mediante co-immunoprecipitazione. Inoltre, è auspicabile che i dati acquisiti su fibroblasti cutanei, più facili da ottenere e coltivare *in vitro*, possano in futuro trovare riscontro nelle colture di mioblasti.

L'auspicio è che da una miglior caratterizzazione dei difetti molecolari associati alle diverse mutazioni del gene PNPLA2 nelle cellule NLSDM si possano suggerire trattamenti in grado di limitare i difetti metabolici e migliorare le condizioni di vita dei pazienti.

5. MATERIALI E METODI

5.1. ISOLAMENTO DEI FIBROBLASTI DA BIOPSIA CUTANEA

È stata isolata una biopsia cutanea, che successivamente è stata sezionata. I diversi frammenti sono stati messi in coltura in piastra Petri, ricoperta da un vetrino sterilizzato, fino a quando tutti i fibroblasti sono fuoriusciti dai frammenti di tessuto; a questo punto il vetrino è stato rimosso, il terreno di coltura cambiato e le cellule sono state lasciate in coltura al fine di aumentarne la confluenza.

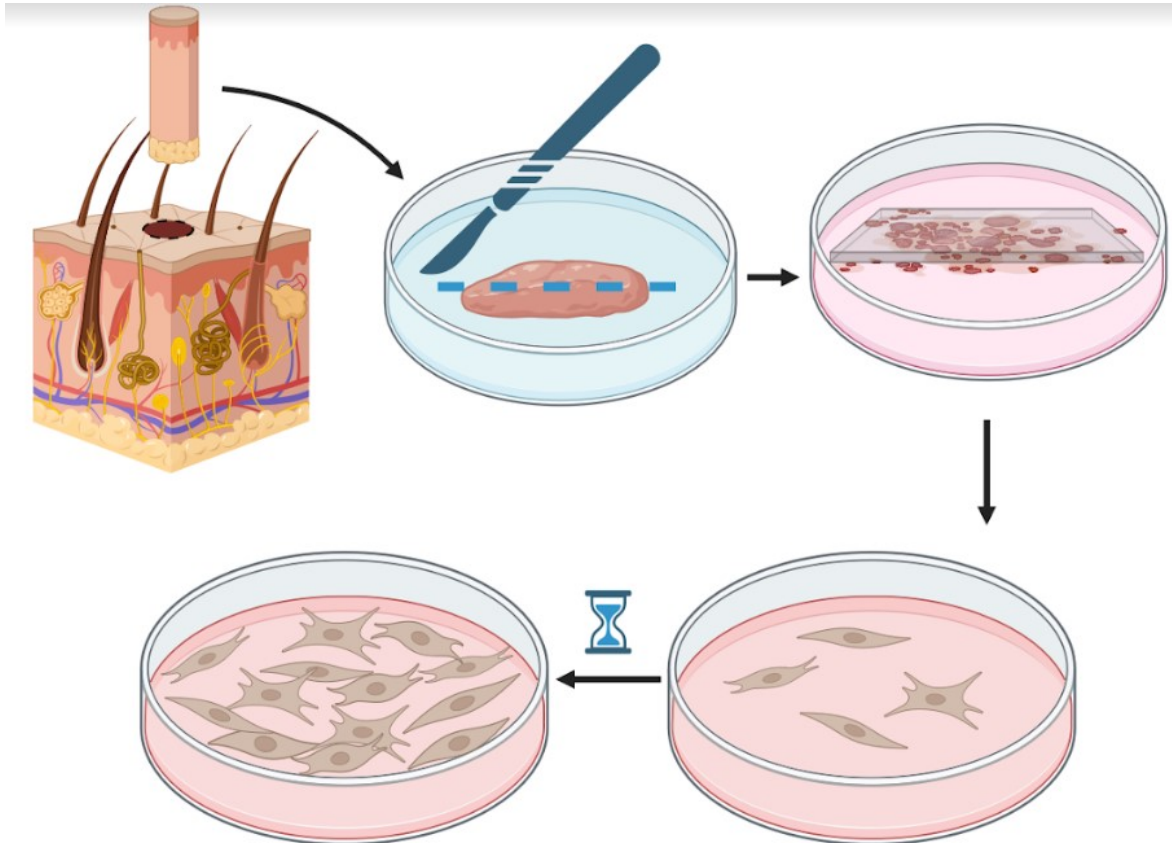


Figura 1: isolamento dei fibroblasti da biopsia cutanea

5.2. COLTURE CELLULARI

Nel corso degli esperimenti fatti sono stati utilizzati fibroblasti primari ricavati sia da un donatore sano, sia da un paziente affetto dalla patologia NLSDM; questi ultimi presentano la mutazione c. 45-47delCGG (p.delG16) nel gene *PNPLA2*.

Per la coltura delle cellule è stato utilizzato terreno RPMI 1640 (PAN BIOTECH) addizionato a siero FBS (Fetal Bovine Serum della ditta GIBCO B.R.L.) al 10%, glutammina e all'1% di una miscela di penicillina e streptomina. Le cellule sono state coltivate in piastre Petri e incubate ad una temperatura di 37 °C ed una percentuale di CO₂ del 5%. Il terreno di coltura contiene rosso fenolo, una sostanza che in base al pH dell'ambiente cambia colore: si presenta di colore rosso quando il pH è 7,3 mentre vira a giallo a pH più acido (6,7), indicando l'esaurimento dei nutrienti disponibili per le cellule.



Figura 2: piastre Petri, utilizzate per la coltura delle cellule

Quando le cellule hanno raggiunto un'elevata confluenza, si è eseguito il distacco e il passaggio delle cellule in un numero maggiore di piastre. Per farlo, i passaggi seguiti sono stati:

- Aspirazione del terreno di coltura
- Lavaggio delle piastre con una soluzione di PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 1%
- Aggiunta di una soluzione di tripsina ed EDTA (GIBCO B.R.L.) necessaria per il distacco delle cellule
- Incubazione delle cellule in incubatore a 37° C fino al distacco
- Neutralizzazione della soluzione di tripsina ed EDTA con l'aggiunta di nuovo terreno completo
- Trasferimento delle cellule in nuove piastre
- Aggiunta di nuovo terreno completo fino al raggiungimento del volume finale

Nel corso degli esperimenti, le cellule sono state trattate con acido oleico 400 mM per 24 o 48 ore, per vedere se questo fosse in grado di causare lipotossicità. In alcuni esperimenti, le

cellule sono state incubate in presenza di acido oleico in terreno senza siero, al fine di verificare come l'assenza del siero influisse sulla lipotossicità.

5.3. CONTA CELLULARE

La conta cellulare viene effettuata mediante l'utilizzo della camera di Burker. La camera di Burker è costituita da una griglia suddivisa in 9 quadrati a loro volta suddivisi in 16 quadrati di misure minori.

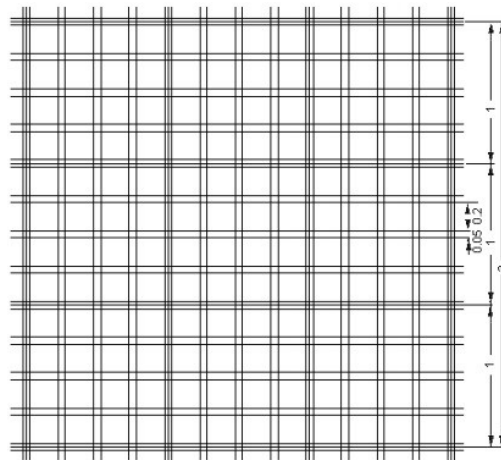


Figura 3: Camera di Burker («Camera di Burker», s.d.)

La conta cellulare viene effettuata attraverso i seguenti passaggi:

- preparazione di una sospensione cellulare staccando le cellule dalla piastra con tripsina/EDTA;
- centrifugazione a 900 rpm per 5 minuti;
- risospensione in un volume di terreno RPMI 1640 completo;
- prelievo di 15 μL di sospensione cellulare e inserimento nella camera di Burker;
- conta del numero di cellule totali all'interno di un minimo di 3 dei 9 quadrati e calcolo della media aritmetica, che successivamente viene moltiplicata per il fattore di diluizione 10^4 per ricavare il numero di cellule/mL.

5.4. ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Per estrarre le proteine dalle cellule al termine degli esperimenti, è stata utilizzata una soluzione di lisi contenente:

- NP40 1%
- NaCl 150 mM
- Tris-HCl pH 8.8, 50 mM
- EDTA 5 mM
- NaF 10 mM
- Na₄P₂O₇ 10 mM
- Na₃PO₄ 4 mM

A questa soluzione sono stati aggiunti degli inibitori delle proteasi, per evitare la degradazione delle proteine durante l'estrazione:

- Pepstatina 4 µg/mL
- Leupeptina 10 µg/mL
- Aprotinina 0,1 unità inibenti la tripsina/mL

Dopo aver rimosso il surnatante dalle cellule, la soluzione di lisi è stata aggiunta alle cellule e dopo un'incubazione di 20 minuti a 4°C, i campioni sono stati raccolti e centrifugati a 13.000 rpm per 10 minuti. Successivamente, si è proceduto con la raccolta del surnatante, in cui si trovano le proteine e la loro quantificazione.

5.5. QUANTIFICA DELLE PROTEINE

Per quantificare le proteine presenti nell'estratto proteico si è eseguita la lettura allo spettrofotometro secondo il metodo di Braedford, il quale prevede l'utilizzo di una soluzione di Blu di Comassie brillante G-250 (Dye-reagent) da aggiungere ad un campione del surnatante; la presenza delle proteine sposta il massimo di assorbimento del Dye-reagent da 465 nm a 595 nm, lunghezza d'onda alla quale viene effettuata la misura dell'assorbanza. In particolare, per la quantificazione di ciascun campione è stata preparata prima una soluzione di bianco, necessaria per impostare lo strumento, contenente:

- 1 mL di Dye-reagent

- 2,5 μ L di soluzione di lisi

Dopo aver impostato lo strumento correttamente grazie alla misurazione dell'assorbanza del bianco, si è proceduto con la quantificazione delle proteine presenti nell'estratto cellulare, creando una soluzione contenente:

- 1 mL di Dye-reagent
- 2,5 μ L di surnatante ottenuto dalla lisi cellulare

È possibile determinare la quantità di proteine presenti nel campione espresse in μ g/mL utilizzando una retta di taratura.

5.6. WESTERN BLOT

La tecnica del Western blot è una tecnica immuno-elettroforetica che permette di determinare la presenza di una specifica proteina in un campione tramite l'utilizzo di elettroforesi su gel di acrilammide e prevede diversi passaggi di seguito descritti.

5.6.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Grazie alla quantifica delle proteine, a partire dagli estratti proteici totali sono stati preparati campioni a determinata concentrazione di proteine, a cui è stata aggiunta una soluzione di Laemmly per permettere la denaturazione delle proteine. La composizione della soluzione denaturante è:

- Glicerolo 30%
- SDS 10%
- B-mercaptoetanolo 5%
- Tris-HCl pH 6,8 250 mM
- Blu di bromofenolo
- H₂O

I campioni vengono scaldati ad una temperatura di 100°C per tre minuti prima di poter essere utilizzati per la successiva elettroforesi su gel di acrilammide.

5.6.2. PREPARAZIONE DEL GEL

Il gel utilizzato per l'elettroforesi è composto da due parti: *running gel* e *stacking gel*.

Il *running gel* è quello in cui avviene la separazione delle proteine e viene preparato per primo, con una miscela di componenti riportati nella tabella sottostante; nel corso degli

esperimenti sono stati usati gel con percentuale di acrilamide di 8, 12 e 15%, la cui composizione è riportata nella tabella sottostante.

COMPONENTI	<i>RUNNING 8%</i>	<i>RUNNING 12%</i>	<i>RUNNING 15%</i>
H ₂ O	6,7 mL	4,8 mL	3,35 mL
TRIS-HCl 1,5M pH 8,8	3,4 mL	3,4 mL	3,4 mL
SDS 10%	150 µL	150 µL	150 µL
ACRILAMMIDE	3,7 mL	5,6 mL	7,05 mL
APS	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL

La miscela è stata inserita nello spazio (spessore 1,5 mm) tra due vetrini posti in un supporto di plastica e sopra di essa viene versato un sottile strato di acqua MilliQ necessario per assicurare la giusta compattazione del gel ed evitare che vada incontro a disidratazione. A polimerizzazione avvenuta, lo strato di acqua MilliQ viene rimosso e viene versato lo *stacking gel*, necessario per permettere l'impaccamento delle proteine al fronte di corsa. All'interno della soluzione di *stacking gel* viene inserito un pettine in plastica che permette, una volta avvenuta la polimerizzazione, la formazione di pozzetti in cui verranno caricati i campioni. La composizione di questo gel è riportata nella tabella sottostante

COMPONENTI	<i>STACKING</i>
H ₂ O	3mL
TRIS-HCl 1,5M pH 6,8	1,25mL
SDS 10%	50µL
ACRILAMMIDE	500µL
APS	50µL
TEMED	5µL

Tra gli elementi che compongono i due gel, troviamo di particolare importanza:

- SDS (sodio dodecil-solfato) al 10%, che, grazie alla sua natura di detergente anionico, permette la denaturazione delle proteine conferendo loro una carica negativa;
- APS (ammonio persolfato), un agente ossidante, utilizzato come catalizzatore della reazione di polimerizzazione dell'acrilammide; esso permette la formazione di radicali liberi, i quali vanno ad attaccare i doppi legami dell'acrilammide favorendone la polimerizzazione
- Temed (tetrametiletilendiammina), che permette la stabilizzazione dei radicali liberi generati dall'APS

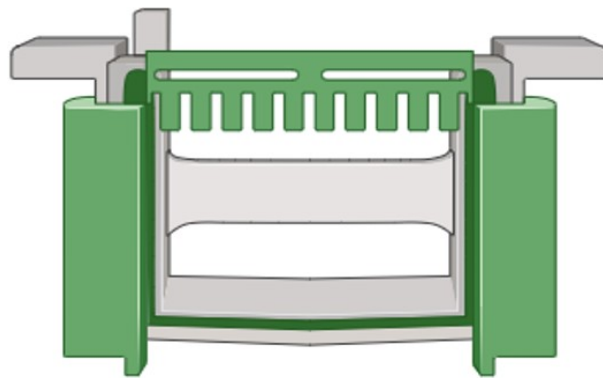


Figura 15: preparazione del gel di acrilammide, (NC DNA Day » Technique Tuesday, s.d.)

5.6.3. ELETTROFORESI SU GEL DI ACRILAMMIDE

Il gel viene inserito nella camera per elettroforesi, insieme al *running buffer*, una soluzione contenente glicina 2 M, Tris 250 mM, SDS 10% e H₂O. I campioni precedentemente preparati, vengono scaldati ad una temperatura di 100°C per tre minuti e successivamente caricati nei rispettivi pozzetti del gel grazie all'utilizzo della siringa Hamilton. In uno dei pozzetti del gel viene caricato un *marker*, una miscela di proteine a diverso peso molecolare, necessario per monitorare la corsa elettroforetica. Il gel viene sottoposto ad una differenza di potenziale di 150-200 Volt per un tempo di circa 40 minuti, in modo tale da permettere la migrazione delle proteine, cariche negativamente, dal polo negativo al polo positivo, lungo lo *stacking gel* e poi il *running gel* e quindi la separazione sulla base del loro peso molecolare. La corsa elettroforetica è stata effettuata con l'apparecchio PowerPac TM Basic Power Supply (Bio-Rad).

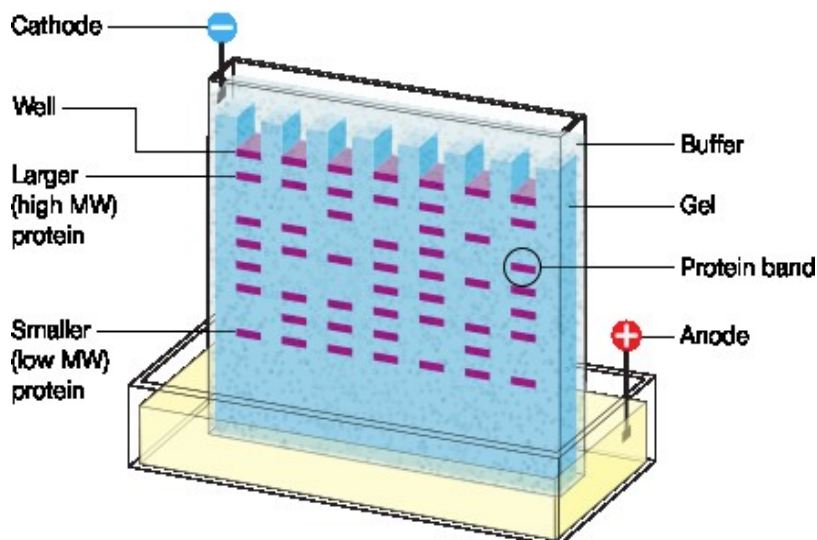


Figura 16: camera per elettroforesi; (Western Blot | Wiki FablabSU, s.d.)

5.6.4. TRASFERIMENTO SU MEMBRANA DI NITROCELLULOSA

Una volta terminata la corsa, le proteine distribuite sul gel, grazie all'azione di un campo elettrico, vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa, utilizzando la tecnica del transfer Semi-dry. Si effettua un assemblaggio di *blotting paper*, membrana di nitrocellulosa, gel di acrilammide e *blotting paper*, il tutto imbevuto di una soluzione di trasferimento composta da Tris, glicina, SDS, metanolo e H₂O. Il "sandwich" creato viene sottoposto ad una differenza di potenziale di 10 volt per 40 minuti. È stato utilizzato l'apparecchio Trans-Blot® SD/Semy Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Al termine dei 40 minuti, l'avvenuto trasferimento viene verificato colorando la membrana di nitrocellulosa con una soluzione di Rosso Ponceau (0,1% Rosso Ponceau, 5% acido tricloroacetico e H₂O).

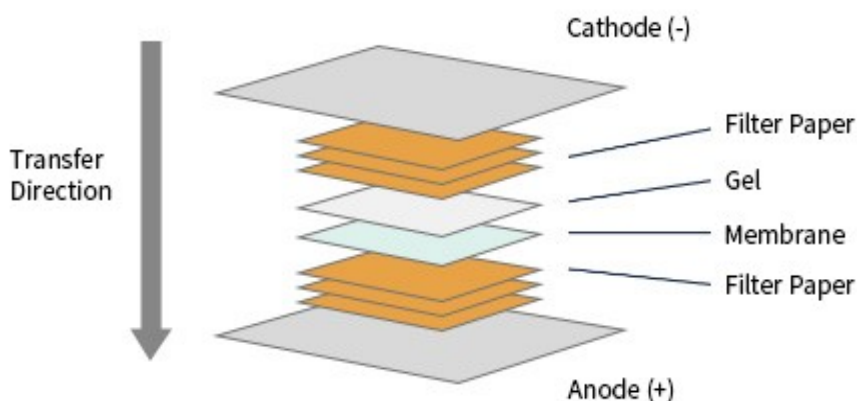


Figura 17: trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa; (Semi-dry Western Blot Transfer | Sino Biological, s.d.)

Successivamente la membrana viene lavata con PBS e incubata con una soluzione di BSA 5% in PBS per 60 minuti a 37°C, in modo tale da saturare la membrana ed evitare successivi legami aspecifici degli anticorpi. Trascorso il periodo di saturazione, la membrana di nitrocellulosa viene incubata con una soluzione di BSA 1% in PBS contenente l'anticorpo primario specifico, a 4°C *overnight*; questo permette la formazione del complesso proteina-anticorpo. Il giorno successivo la membrana viene sottoposta a lavaggi ripetuti con una soluzione di PBS e TWEEN 0,3% per 30 minuti totali, allo scopo di eliminare l'anticorpo primario in eccesso. A questo punto la membrana viene incubata a temperatura ambiente per due ore con una soluzione di BSA 1% in PBS contenente l'anticorpo secondario specie-specifico chemiluminescente, che è coniugato ad un enzima (una perossidasi) necessario per lo sviluppo della chemiluminescenza. L'anticorpo secondario riconoscerà l'anticorpo primario ove questo si è legato all'antigene presente sulla membrana. Successivamente la membrana viene nuovamente lavata con una soluzione di PBS e TWEEN allo 0,3% per 30 minuti, al fine di rimuovere l'anticorpo secondario in eccesso. Si procede poi con la rivelazione delle proteine tramite chemiluminescenza.

5.6.5. RILEVAMENTO DELLE PROTEINE

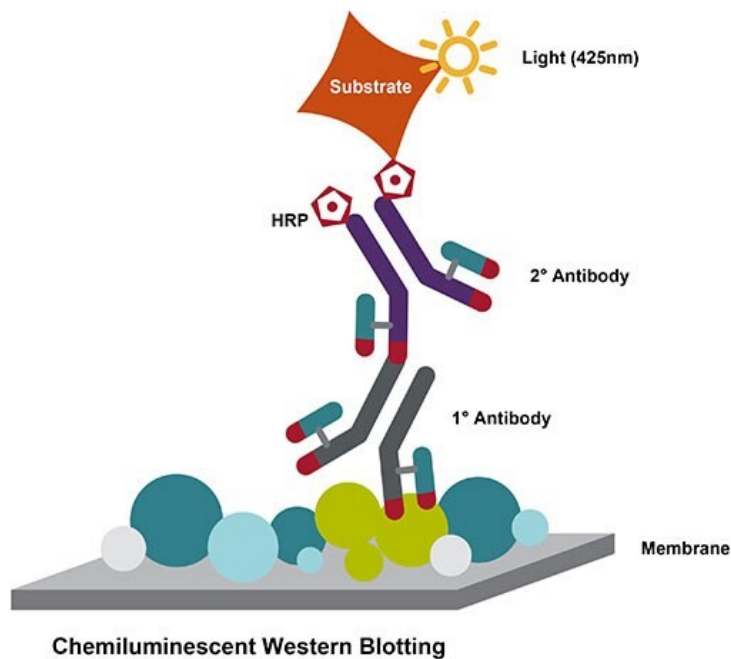


Figura 18: rilevamento della chemiluminescenza; (Chemiluminescent Western Blotting - IT, s.d.)

Per verificare la presenza della proteina d'interesse, è necessario vedere la chemiluminescenza dell'anticorpo secondario ove questo si è legato. A questo scopo è stato utilizzato il Kit ECL Western Blot Detection System: la membrana è stata ricoperta con la miscela di ECL e posizionata tra due lastre di plastica trasparenti. La rivelazione del segnale è stata effettuata tramite l'apparecchio Chemidoc Imagin System. La miscela ECL fornisce all'enzima, coniugato all'anticorpo secondario, un substrato per permettere la formazione di un prodotto la cui chemiluminescenza viene rilevata dall'apparecchio.

5.6.6. ANTICORPI UTILIZZATI

Per gli studi sperimentali sono stati utilizzati gli anticorpi primari:

- Anti-HSC70, acquistato dalla ditta Santa Cruz Biotechnology (catalogo sc-7298)
- Anti-PLIN2, acquistato dalla ditta Proteintech® (catalogo 15294-1-AP)
- Anti-LC3, acquistato dalla ditta Cell Signalling Technology (catalogo 4108S)
- Anti-P62, acquistato dalla ditta Novus Biologicals (catalogo H00008878-M01PE)

Sono stati utilizzati gli anticorpi secondari:

- anti-rabbit, acquistato dalla ditta Cell Signalling Technology (catalogo 7074S)
- anti-mouse, acquistato dalla ditta Sigma Aldrich (A4416-5ML)

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

9788808256515_Cox_Principi-di-biochimica-Lehninger-8e_UniPO | Web Viewer. (s.d.).

Recuperato 5 luglio 2024, da <https://prestitodigitale.zanichelli.it/web-viewer/webviewer.php?doc=315>

Akiyama, M., Sawamura, D., & Shimizu, H. (2003). The clinical spectrum of nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma and lamellar ichthyosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 28(3), 235–240. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2003.01295.x>

Aloisi, M. (2017, febbraio 16). Beta ossidazione degli acidi grassi. *BioPills*.

<https://www.biopills.net/beta-ossidazione-degli-acidi-grassi/>

Barcaccia, G., & Falcinelli, mario. (2008). *Genetica generale*. Linguori Editore.

Borg, M. L., Andrews, Z. B., Duh, E. J., Zechner, R., Meikle, P. J., & Watt, M. J. (2011).

Pigment Epithelium–Derived Factor Regulates Lipid Metabolism via Adipose Triglyceride Lipase. *Diabetes*, 60(5), 1458–1466. <https://doi.org/10.2337/db10-0845>

Busatto, S., Walker, S. A., Grayson, W., Pham, A., Tian, M., Nesto, N., Barklund, J., &

Wolfram, J. (2020). Lipoprotein-based drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 159, 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.08.003>

Camera di Burker. (s.d.). *B Life - Il Catalogo Medicale*. Recuperato 18 settembre 2024, da

<https://www.blife.it/catalogo/camera-di-burker-2/>

Cerk, I. K., Salzburger, B., Boeszoermyeni, A., Heier, C., Phillip, C., Romauch, M.,

Schweiger, M., Cornaciu, I., Lass, A., Zimmermann, R., Zechner, R., & Oberer, M.

(2014). A Peptide Derived from G0/G1 Switch Gene 2 Acts as Noncompetitive Inhibitor of Adipose Triglyceride Lipase. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32559–32570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602599>

- Cerk, I. K., Wechselberger, L., & Oberer, M. (2018). Adipose Triglyceride Lipase Regulation: An Overview. *Current protein & peptide science*, *19*(2), 221–233. <https://doi.org/10.2174/1389203718666170918160110>
- Chen, J., Hong, D., Wang, Z., & Yuan, Y. (2010). A novel PNPLA2 mutation causes neutral lipid storage disease with myopathy (NLSDM) presenting muscular dystrophic features with lipid storage and rimmed vacuoles. *Clinical Neuropathology*, *29*(6), 351–356. <https://doi.org/10.5414/npp29351>
- Chen, W., Chang, B., Wu, X., Li, L., Sleeman, M., & Chan, L. (2013). Inactivation of Plin4 downregulates Plin5 and reduces cardiac lipid accumulation in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *304*(7), E770–E779. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00523.2012>
- Cornaciu, I., Boeszoermyeni, A., Lindermuth, H., Nagy, H. M., Cerk, I. K., Ebner, C., Salzburger, B., Gruber, A., Schweiger, M., Zechner, R., Lass, A., Zimmermann, R., & Oberer, M. (2011). The Minimal Domain of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Ranges until Leucine 254 and Can Be Activated and Inhibited by CGI-58 and G0S2, Respectively. *PLoS ONE*, *6*(10), e26349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026349>
- Durdu, M., Missaglia, S., Moro, L., & Tavian, D. (2018). Clinical and genetic characterization of a Chanarin Dorfman Syndrome patient born to diseased parents. *BMC Medical Genetics*, *19*(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0610-0>
- Haemmerle, G., Moustafa, T., Woelkart, G., Büttner, S., Schmidt, A., van de Weijer, T., Hesselink, M., Jaeger, D., Kienesberger, P. C., Zierler, K., Schreiber, R., Eichmann, T., Kolb, D., Kotzbeck, P., Schweiger, M., Kumari, M., Eder, S., Schoiswohl, G., Wongsiriroj, N., ... Zechner, R. (2011). ATGL-mediated fat catabolism regulates

- cardiac mitochondrial function via PPAR- α and PGC-1. *Nature Medicine*, 17(9), 1076–1085. <https://doi.org/10.1038/nm.2439>
- Hickenbottom, S. J., Kimmel, A. R., Londos, C., & Hurley, J. H. (2004). Structure of a Lipid Droplet Protein: The PAT Family Member TIP47. *Structure*, 12(7), 1199–1207. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.04.021>
- Hirano, K., Ikeda, Y., Zaima, N., Sakata, Y., & Matsumiya, G. (2008). Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy. *New England Journal of Medicine*, 359(22), 2396–2398. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0805305>
- Jarc, E., & Petan, T. (2019). Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 92(3), 435–452.
- Kobayashi, K., Inoguchi, T., Maeda, Y., Nakashima, N., Kuwano, A., Eto, E., Ueno, N., Sasaki, S., Sawada, F., Fujii, M., Matoba, Y., Sumiyoshi, S., Kawate, H., & Takayanagi, R. (2008). The Lack of the C-Terminal Domain of Adipose Triglyceride Lipase Causes Neutral Lipid Storage Disease through Impaired Interactions with Lipid Droplets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(7), 2877–2884. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2247>
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J. G., Gorkiewicz, G., & Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism*, 3(5), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.005>
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., & Zechner, R. (2011). Lipolysis—A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.10.004>

- Liu, W. J., Ye, L., Huang, W. F., Guo, L. J., Xu, Z. G., Wu, H. L., Yang, C., & Liu, H. F. (2016). P62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0031-z>
- Longo, N., Frigeni, M., & Pasquali, M. (2016). CARNITINE TRANSPORT AND FATTY ACID OXIDATION. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(10), 2422–2435. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.023>
- Martinez-Lopez, N., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Athonvarangkul, D., Liebling, E., Merlo, P., Cecconi, F., Schwartz, G. J., & Singh, R. (2016). Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver. *Cell Metabolism*, 23(1), 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.008>
- Missaglia, S., Coleman, R. A., Mordente, A., & Tavian, D. (2019). Neutral Lipid Storage Diseases as Cellular Model to Study Lipid Droplet Function. *Cells*, 8(2), 187. <https://doi.org/10.3390/cells8020187>
- Missaglia, S., Maggi, L., Mora, M., Gibertini, S., Blasevich, F., Agostoni, P., Moro, L., Cassandrini, D., Santorelli, F. M., Gerevini, S., & Tavian, D. (2017). Late onset of neutral lipid storage disease due to novel *PNPLA2* mutations causing total loss of lipase activity in a patient with myopathy and slight cardiac involvement. *Neuromuscular Disorders*, 27(5), 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.01.011>
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(3), 137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
- Orphanet: Neutral lipid storage disease with ichthyosis*. (s.d.). Recuperato 9 luglio 2024, da <https://www.orpha.net/en/disease/detail/98907>

- Orphanet: Neutral lipid storage disease with myopathy.* (s.d.). Recuperato 21 agosto 2024, da <https://www.orpha.net/en/disease/detail/98908>
- Pagnon, J., Matzaris, M., Stark, R., Meex, R. C. R., Macaulay, S. L., Brown, W., O'Brien, P. E., Tiganis, T., & Watt, M. J. (2012). Identification and Functional Characterization of Protein Kinase A Phosphorylation Sites in the Major Lipolytic Protein, Adipose Triglyceride Lipase. *Endocrinology*, *153*(9), 4278–4289. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1127>
- Pasanisi, M. B., Missaglia, S., Cassandrini, D., Salerno, F., Farina, S., Andreini, D., Agostoni, P., Morandi, L., Mora, M., & Taviani, D. (2016). Severe cardiomyopathy in a young patient with complete deficiency of adipose triglyceride lipase due to a novel mutation in *PNPLA2* gene. *International Journal of Cardiology*, *207*, 165–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.01.137>
- Patel, S., Yang, W., Kozusko, K., Saudek, V., & Savage, D. B. (2014). Perilipins 2 and 3 lack a carboxy-terminal domain present in perilipin 1 involved in sequestering ABHD5 and suppressing basal lipolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(25), 9163–9168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318791111>
- Reilich, P., Horvath, R., Krause, S., Schramm, N., Turnbull, D. M., Trenell, M., Hollingsworth, K. G., Gorman, G. S., Hans, V. H., Reimann, J., MacMillan, A., Turner, L., Schollen, A., Witte, G., Czermin, B., Holinski-Feder, E., Walter, M. C., Schoser, B., & Lochmüller, H. (2011). The phenotypic spectrum of neutral lipid storage myopathy due to mutations in the *PNPLA2* gene. *Journal of Neurology*, *258*(11), 1987–1997. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6055-4>
- Schreiber, R., Xie, H., & Schweiger, M. (2019). Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular*

and Cell Biology of Lipids, 1864(6), 880–899.

<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.008>

Schweiger, M., Lass, A., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., & Zechner, R. (2009). Neutral lipid storage disease: Genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(2), E289–E296.

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00099.2009>

Schweiger, M., & Zechner, R. (2015). Breaking the Barrier—Chaperone-Mediated Autophagy of Perilipins Regulates the Lipolytic Degradation of Fat. *Cell Metabolism*, 22(1), 60–61. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.017>

Singh, M., Kaur, R., Lee, M.-J., Pickering, R. T., Sharma, V. M., Puri, V., & Kandror, K. V. (2014). Fat-specific Protein 27 Inhibits Lipolysis by Facilitating the Inhibitory Effect of Transcription Factor Egr1 on Transcription of Adipose Triglyceride Lipase *. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), 14481–14487.

<https://doi.org/10.1074/jbc.C114.563080>

Sztalryd, C., & Brasaemle, D. L. (2017). The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochimica et biophysica acta*, 1862(10 Pt B), 1221–1232. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.009>

Vasiljevski, E. R., Summers, M. A., Little, D. G., & Schindeler, A. (2018). Lipid storage myopathies: Current treatments and future directions. *Progress in Lipid Research*, 72, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.08.001>

Vegliante, R., Di Leo, L., Ciccarone, F., & Ciriolo, M. R. (2018). Hints on ATGL implications in cancer: Beyond bioenergetic clues. *Cell Death & Disease*, 9(3), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0345-z>

- Walther, T. C., & Farese, R. V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, *81*, 687–714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>
- Xu, C., & Fan, J. (2022). Links between autophagy and lipid droplet dynamics. *Journal of Experimental Botany*, *73*(9), 2848–2858. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac003>
- Zadoorian, A., Du, X., & Yang, H. (2023a). Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. *Nature Reviews. Endocrinology*, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00845-0>
- Zhang, S., Peng, X., Yang, S., Li, X., Huang, M., Wei, S., Liu, J., He, G., Zheng, H., Yang, L., Li, H., & Fan, Q. (2022b). The regulation, function, and role of lipophagy, a form of selective autophagy, in metabolic disorders. *Cell Death & Disease*, *13*(2), 132. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04593-3>
- Zhou, Y., Wang, Z., Huang, Y., Bai, C., Zhang, X., Fang, M., Ju, Z., & Liu, B. (2022). Membrane dynamics of ATG4B and LC3 in autophagosome formation. *Journal of Molecular Cell Biology*, *13*(12), 853–863. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjab059>