



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in:
Medicina Clinica e Scienze del Comportamento.

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (DIBIMIS).

Settore Scientifico Disciplinare:
med/09.

Fosfoproteomica: Nuova Metodica per lo Studio di Pathway Metabolici in Modelli Murini Obesi.

IL DOTTORE
Marcello Filogamo.

IL COORDINATORE
Prof. Antonio Pinto.

IL TUTOR
Prof. Rosario Scaglione.

CO-TUTOR
Prof.ssa Sonya Vasto.

CICLO XXIX.

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2017.

Ringraziamenti.

Ringrazio la Professoressa Sonya Vasto per l'insegnamento, per il sostegno, per i preziosi suggerimenti forniti durante la stesura della mia tesi di dottorato e per avermi dato la possibilità di conseguire parte del mio dottorato all'estero presso "Immunotechnology Department, Medicon Village, Lund, (Svezia)" sotto la guida del Professore Peter James.

Inoltre, ringrazio il Professore Peter James e la dottoranda Valentina Siino per gli insegnamenti da loro ricevuti, che mi hanno dato le basi scientifiche da cui sono partito per scrivere la mia tesi di dottorato.

INDICE	
Abbreviazioni.	4
CAPITOLO 1	6
1.1 – Obesità un’epidemia mondiale.	6
1.2 – Etiologia dell’obesità.	7
1.3 – Tessuto adiposo e metodi di valutazione.	10
1.4 – Obesità e infiammazione.	13
1.5 – Obesità e sistema nervoso centrale (SNC).	17
<i>1.5.1 – Obesità e sistema Endocannabinoide.</i>	19
<i>1.5.2 – Il sistema Endocannabinoide nella regolazione del metabolismo energetico.</i>	21
1.6 – Obesità e alterato trasporto vescicolare.	23
<i>1.6.1 – Trasporto anterogrado e retrogrado e struttura dei microtubuli.</i>	24
<i>1.6.2 – Selettività dei cargo e direzionalità del trasporto intraneuronale.</i>	25
<i>1.6.3 – Rilascio vescicolare.</i>	26
<i>1.6.4 – Difetti del trasporto assonale e malattie neurodegenerative.</i>	31
CAPITOLO 2	33
2.1 – Obesità e proteomica.	33
<i>2.1.1 – Dalla genomica alla proteomica.</i>	33
<i>2.1.2 – Proteomica.</i>	34
<i>2.1.3 – Fosforilazione delle proteine e fosfo-proteomica.</i>	36
CAPITOLO 3	40
3.1 – Scopo della tesi.	40
3.2 – Metodiche di analisi applicate allo scopo della tesi.	41
<i>3.2.1 – Metodologia di frazionamento.</i>	42
<i>3.2.2 – Metodologia di arricchimento.</i>	44
<i>3.2.3 – Cromatografia (RP-HPLC).</i>	45
<i>3.2.4 – Spettrometria di massa tandem (MS/MS).</i>	46
CAPITOLO 4	48
4.1 – Materiali e metodi.	48
<i>4.1.1 – Modello animale.</i>	48
<i>4.1.2 – Prelievo e trattamento del campione.</i>	49
<i>4.1.3 – Polverizzazione e omogenizzazione del tessuto cerebrale.</i>	49
<i>4.1.4 – Quantificazione delle proteine.</i>	50

<i>4.1.5 – SDS-PAGE e digestione triptica.</i>	52
<i>4.1.6 – Acquisizione ed arricchimento dei glico-peptidi.</i>	56
<i>4.1.7 – Acquisizione degli spettri.</i>	62
<i>4.1.8 – Analisi statistica.</i>	63
CAPITOLO 5	64
5.1 – Risultati e discussione.	64
<i>5.1.1 – Modello murino.</i>	64
<i>5.1.2 – Analisi dei fosfo- e glico-peptidi.</i>	65
<i>5.1.3 – GO Analysis.</i>	67
<i>5.1.4 – Obesità e alterazione del traffico vescicolare.</i>	71
<i>5.1.5 – Obesità e aumento della sindrome metabolica.</i>	73
<i>5.1.6 – Obesità e alterazione dell'omeostasi del calcio.</i>	79
<i>5.1.7 – Obesità ed espressione glico-proteica.</i>	79
CAPITOLO 6	81
6.1 – Conclusioni.	81
Bibliografia.	86

Abbreviazioni.

OMS: Organizzazione Mondiale della Sanità.

WAT: White Adipose Tissue.

BAT: Brown Adipose Tissue.

ATP: Adenosine Triphosphate.

BMI: Body Mass Index.

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α .

IL-6: Interleukin-6.

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1.

NF-KB: Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1.

SNC: Central Nervous System.

LHA: Lateral Hypothalamic Area.

VMN: Ventromedial Nucleus.

ECS: Endocannabinoid System.

CB-1R: Cannabinoid Receptor Type 1.

ECs: Endocannabinoids.

2-AG: 2-Arachidonoylglycerol.

GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β .

CDK-5: Cyclin-Dependent Kinase-5.

AZ: Active Zone.

CAZ: Cytoskeletal Matrix Assembled at the AZ.

RIM: Rab3-Interecting Molecules.

SNARE: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Activating Protein Receptor.

AD: Alzheimer's Disease.

PTM: Post-Translational Modification.

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate.

DTT: Dithiothreitol.

IAA: Iodoacetamide.

TiO₂: Titanium Dioxide.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

RP-HPLC: Reversed - Phase High Performance Liquid Chromatography.

ESI: Electrospray Ionization.
MS: Mass Spectrometry.
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid.
DOC: Sodium Deoxycholate.
TCA: Acid Trichloroacetic.
ACN: Acetonitrile.
AMBIC: Ammonium Bicarbonate.
FA: Formic Acid.
HFD: High Fat Diet.
HGD: High Glucidic Diet.
GO: Gene Ontology.
SM: Metabolic Syndrome.
APP: Amyloid Precursor Protein.
A β : Amyloid Beta-Peptide.
AP-3: Adaptor Protein 3.

CAPITOLO 1

1.1 Obesità un'epidemia mondiale.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito l'obesità come una “patologia cronica caratterizzata da un accumulo eccessivo o anomalo di tessuto adiposo che può influire negativamente sullo stato di salute”. Questo eccessivo accumulo di tessuto adiposo comporta un incremento della morbilità e della mortalità nei pazienti che ne sono affetti sia per le sue complicanze dirette sia per le patologie a esso frequentemente associate (1).

L'aumento esponenziale dell'obesità soprattutto negli ultimi 60 anni ha portato l'OMS a considerare la stessa come un'epidemia globale ed un problema di salute pubblica mondiale (2-4), coniando il termine “globesity”, che ben identifica e caratterizza la crescita epidemica di questa condizione patologica che coinvolge oggi parecchie aree del mondo.

L'incidenza dell'obesità tende ad aumentare con un ritmo vertiginoso, coinvolgendo non soltanto i paesi occidentali industrializzati ma anche paesi con medio e basso reddito in via di sviluppo, in particolare nelle aree urbane.

Fino a pochi secoli fa la coscienza sociale non riconosceva l'obesità come una patologia bensì come una variante morfologica. Solo nel XVIII secolo ci si allontana, per la prima volta, dall'idea di obesità come sinonimo di benessere, segno di potere, prosperità e ricchezza, cominciando a prendere reale coscienza dell'impatto che questa può avere sulla qualità della vita.

La reale preoccupazione dell'aumento ponderale, come elemento dannoso per la salute, viene poi apprezzata nella metà del XIX secolo riconoscendo l'obesità come condizione patologica.

È da questo momento che per la comunità scientifica, l'obesità diventa oggetto di studio, riconoscendone i rischi patologici per i soggetti che ne sono affetti.

L'obesità viene pertanto definita come l'epidemia del terzo millennio (5), tanto da sostituirsi ai problemi più tradizionali, come la malnutrizione e le malattie infettive, da sempre cause più significative di cattiva salute, diventando un fenomeno allarmante non solo per i soggetti adulti, ma anche per i soggetti in età adolescenziale e pediatrica.

Tale malattia è dovuta principalmente ai cambiamenti dello stile di vita che hanno avuto inizio con il progresso industriale e l'urbanizzazione, momenti storici questi, in cui la conduzione di una vita certamente più frenetica e movimentata ha notevolmente condizionato le abitudini alimentari, spingendo i consumatori a richiedere cibi pronti e a buon mercato, i cosiddetti "cibi spazzatura" ricchi di grassi, colesterolo, zuccheri raffinati e poveri di fibre, vitamine e minerali. L'assunzione di tali cibi associata ad una riduzione dell'attività fisica e quindi ad uno stile di vita sedentario, ha condotto ad un aumento esponenziale del numero di soggetti in sovrappeso e di soggetti obesi.

A sostegno delle argomentazioni esposte, recenti stime globali hanno evidenziato che nel 2014 più di 1,9 miliardi di soggetti adulti erano in sovrappeso, circa il 39% della popolazione mondiale. Di questi più di 600 milioni di soggetti sono obesi, circa il 13% della popolazione mondiale. Questi dati affermano che l'incidenza mondiale dell'obesità è più che raddoppiata tra il 1980 e il 2014 (6).

1.2 Eziologia dell'obesità.

L'obesità è una malattia ad eziologia multifattoriale difficile da determinare perché può derivare dall'interazione di numerosi fattori endocrini, psicologici, metabolici, nutrizionali, culturali e soprattutto da un ridotto dispendio energetico e/o da un aumento dell'introito calorico.

Il tessuto adiposo è formato da adipociti, il cui numero aumenta durante l'infanzia e l'adolescenza per poi stabilizzarsi nella pubertà e nell'età adulta.

Se nella prima fase della vita si segue una scorretta alimentazione, il numero degli adipociti aumenta in modo eccessivo portando a una predisposizione futura all'obesità e al sovrappeso, a prescindere dalla regolarità alimentare eventualmente ristabilita in seguito.

La composizione corporea, quindi, costituisce l'elemento essenziale per riconoscere lo stato di salute di un individuo ed è per questo che è possibile classificare questa patologia, distinguendola in obesità "essenziale" e obesità "secondaria".

L'obesità essenziale è la tipologia più diffusa nella popolazione ed è quella forma di obesità della quale ad oggi è ignota la patogenesi. Tra i vari fattori caratteristici dell'obesità essenziale emergono quelli genetici in cui genitori obesi trasmettano tale condizione patologica alla prole (7).

Alla stessa stregua, di primario rilievo sono i fattori nutrizionali. Si consideri che spesso l'obesità è dovuta all'ipernutrizione, ossia all'introduzione di calorie in quantità superiore alla spesa energetica. A questo proposito varie ricerche confermano che il tasso di obesità è notevolmente superiore nei paesi industrializzati rispetto ai paesi in via di sviluppo, a causa della maggiore disponibilità alimentare e della ridotta attività fisica.

Anche lo status socio-economico ed in particolare i livelli di istruzione sono fattori che possono condizionare lo stato di salute, soprattutto influenzare l'insorgenza dell'obesità nella fascia di età adolescenziale. Infatti, dai dati redatti dal Ministero della Salute, è emerso che il rischio di obesità infantile è superiore in soggetti con madri che hanno un livello basso di istruzione rispetto alle madri con un livello di istruzione medio/alto (8) e certamente non da meno sono i fattori psicologici che inducono a comportamenti

impulsivi e/o compulsivi spingendo il soggetto ad assumere un'eccessiva quantità di cibo. L'obesità essenziale sembrerebbe, inoltre, associata ad una alterazione del sistema di controllo noradrenergico, con la riduzione del rilascio di neurotrasmettitori quali la noradrenalina, la dopamina e la serotonina (9-11). Individui con tale alterazione, potrebbero sviluppare una forte componente depressiva seguita da uno stato di insoddisfazione, al quale si aggiunge un mancato senso di sazietà che induce tali individui ad ingerire un elevato quantitativo di cibo causando l'aumento ponderale e l'insorgenza dell'obesità.

Le obesità secondarie, di contro, derivano da alterazioni genetiche, endocrinopatie, malattie neurologiche e psichiatriche e dall'assunzione di determinati farmaci. Solo il 3-5% circa delle forme di obesità sono collegate alle obesità secondarie in cui il fattore patogenetico è noto, identificabile e a volte trattabile.

È sicuramente innegabile l'esistenza di una predisposizione genetica legata all'obesità, attraverso diversi studi di mappatura genica, infatti, sono stati identificati più di 50 regioni del genoma umano correlabili all'insorgenza dell'obesità e individuati più di 244 geni correlati ad alterazione del peso corporeo e ad obesità, alcuni dei quali coinvolti nella sintesi di peptidi che trasmettono segnali di fame e di sazietà (rispettivamente grelina e leptina), altri coinvolti nella crescita e nei processi di differenziazione degli adipociti, ed altri ancora coinvolti nella regolazione del dispendio energetico (12). Le mutazioni genetiche che riguardano l'obesità danno vita a due classificazioni:

- Obesità monogeniche ossia singole mutazioni che determinano l'insorgenza di forme rare di obesità molto severe nelle loro manifestazioni con esordio precoce già durante l'infanzia (13, 14).

- Obesità poligeniche che derivano dall'interazione di più varianti genetiche, il cui contributo di ogni singolo gene coinvolto sembra essere modesto ma in presenza di fattori ambientali predisponenti conducono a un fenotipo obeso.

Esistono inoltre più di 30 disordini di tipo Mendeliano che presentano l'obesità come caratteristica clinica, spesso associata ad altre complicanze quali ritardo mentale, dismorfismi e anomalie di sviluppo organo-specifiche (15, 16).

1.3 Tessuto adiposo e metodi di valutazione.

Il tessuto adiposo è la sorgente primaria di acidi grassi presente nel nostro organismo. Esso è costituito dal tessuto adiposo bianco (White Adipose Tissue, WAT) e dal tessuto adiposo bruno (Brown Adipose Tissue, BAT), con differenti funzioni, composizione cellulare e localizzazione anatomica. Le cellule che costituiscono il tessuto adiposo sono dette adipociti. Il WAT costituisce la maggior parte del tessuto adiposo e della massa grassa corporea e rappresenta la sorgente primaria degli acidi grassi, usati come substrato energetico per generare energia attraverso la fosforilazione ossidativa dell'ATP. Il BAT ha invece funzione termogenica. È molto abbondante nelle specie che vanno in letargo e scarsamente presente negli organismi adulti, uomo compreso. Il BAT è costituito da cellule adipose multiloculari ed è caratterizzato da un'elevata presenza di mitocondri e di vascolarizzazione (17). Il WAT immagazzina i trigliceridi in eccesso derivanti da lipidi, carboidrati e proteine. È presente in grande quantità nell'ipoderma e, in misura minore, nel mesentere e nel mediastino (17). Il WAT è localizzato in diversi siti anatomici, ma i depositi maggiori sono intraddominali e sottocutanei, con l'identificazione di diversi sottogruppi: viscerale, muscolare, epicardiale, perivascolare e renale. Tra le conseguenze dell'eccesso ponderale va annoverato senza dubbio il rischio di insorgenza di malattie croniche che costituiscono un'importante fattore di

rischio per la salute. Tra le malattie alle quali si fa riferimento riscontriamo il diabete mellito di tipo II (18, 19), malattie cardiovascolari (20, 21), ictus (22), malattie della cistifellea (23, 24), iperlipidemia (25), steatosi epatica (26), sindrome sonno-apnea (27), malattie tromboemboliche, neurodegenerazioni, malattie dell'apparato respiratorio (27) e alcune forme di tumori (28-30) che riducono di notevolmente l'aspettativa di vita (31-33). L'obesità, a differenza delle malattie croniche sopracitate, non è un killer silenzioso, le sue manifestazioni infatti sono ben evidenti. Negli individui che ne sono affetti si riscontra un incremento di peso, un aumento della circonferenza addominale ed una serie di condizioni che permettono facilmente di identificare la patologia. Tali fattori potrebbero essere di aiuto per interventi correttivi più o meno precoci (34).

La misurazione dei depositi grassi dell'organismo richiede metodiche sofisticate. Per ragioni pratiche, si ricorre al Body Mass Index (BMI), calcolato come il rapporto tra il peso espresso in chilogrammi e il quadrato dell'altezza espressa in metri (kg/m^2), considerando altezza e peso dei parametri utili per monitorare le condizioni di sovrappeso ed obesità. Il BMI correla strettamente la massa grassa totale ed è utilizzato dal punto di vista epidemiologico sicché valori di BMI compresi tra 18,5 e 24,9 kg/m^2 indicano soggetti normopeso, valori compresi tra 25 e 29,9 kg/m^2 indicano soggetti in sovrappeso, valori uguali o superiori a 30 sono diagnostici per obesità. Al di sopra di 30 BMI, l'obesità viene suddivisa in obesità di I, II o III livello (35) (Tabella 1).

GRADO DI SOVRAPPESO	BMI (kg/m^2)	LIVELLO DI RISCHIO
NORMOPESO	18,5 – 24,9	NON INCREMENTATO
SOVRAPPESO	25,0 – 29,9	INCREMENTATO
OBESITÀ I	30,0 – 34,9	ALTO
OBESITÀ II	35,0 – 39,9	MOLTO ALTO
OBESITÀ SEVERA III	> 40	ESTREMAMENTE ALTO

Tabella 1. Classificazione di normopeso, sovrappeso ed obesità basata sull'indice di massa corporea (BMI) e rischio relativo per malattie associate.

In base al BMI un soggetto viene definito rapidamente sottopeso, normopeso, sovrappeso oppure obeso. Si tratta però di parametri essenziali ma non sufficienti per diagnosticare l'obesità, poiché l'eccesso di peso definito tramite il BMI non viene effettivamente attribuito alla sola massa adiposa, quindi per una accurata misurazione risulta necessaria un'analisi più approfondita del grasso corporeo attraverso metodiche più precise in quanto il metodo di classificazione BMI presenta delle limitazioni.

Infatti l'utilizzo del BMI non tiene in considerazione se un determinato valore è frutto di una sviluppata massa muscolare o di un eccesso di grasso addominale e, non tiene soprattutto in considerazione un fattore molto importante, cioè l'eterogeneità dei depositi di grasso in determinate regioni dell'organismo (36) come se il tessuto adiposo fosse uniformemente distribuito (37) dando così erroneamente uno stesso valore di BMI a soggetti con gradi diversi di obesità. La distribuzione del grasso risulta essere quindi una fattore altrettanto importante, se non più importante, rispetto alla quantità totale dello stesso grasso corporeo, utile nel predire le complicanze delle malattie associate all'obesità. In base alla sede di localizzazione del tessuto obeso si distinguono due tipi di distribuzione, androide e ginoide (Figura 1).

La prima è prevalente nei soggetti di sesso maschile ed è caratterizzata da una distribuzione del grasso soprattutto in sede addominale e nella parte alta del corpo (base del collo, spalle, mento, capo) ed è associata all'insorgenza del diabete e malattie coronariche (38, 39).

L'obesità ginoide invece è associata ai soggetti di sesso femminile in cui il grasso si dispone principalmente nella parte bassa del tronco (glutei e fianchi), distribuzione questa non associata a complicazioni metaboliche particolari.

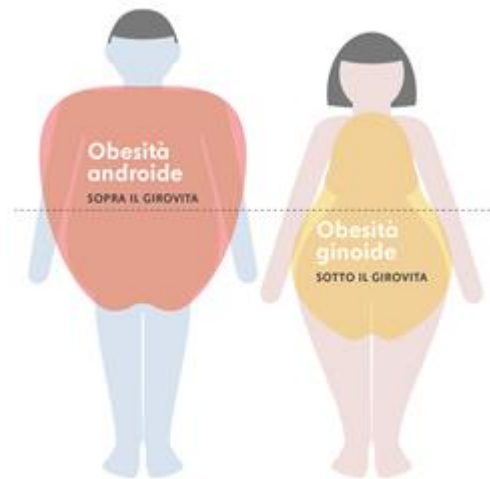


Figura 1. Obesità androide e obesità ginoide.

La misurazione della massa grassa, come accennato, può essere valutata con diversi metodi, più o meno efficaci e ripetibili, che si possono affiancare alla misura del BMI per diagnosticare gli stati di sovrappeso e/o di obesità. Tra le varie metodiche troviamo il “Rapporto Vita-Fianchi” o WHR (Waist Hip Ratio) ottimo premonitore di anomalie metaboliche. La circonferenza della vita può essere usata per valutare la quantità di grasso addominale, mentre la misurazione della circonferenza dei fianchi dà informazioni circa la massa muscolare gluteo-femorale e la struttura ossea. Un girovita >88 cm per le donne e >102 cm per gli uomini è da ritenersi fortemente suggestivo per un elevato rischio di diabete e malattie cardiovascolari.

1.4 Obesità e infiammazione.

L’associazione tra il WAT e le complicanze metaboliche e infiammatorie dell’obesità sembra essere dovuta all’eterogeneità cellulare e alla differente espressione genica che caratterizza le cellule di questo tessuto nei vari siti di deposito. Tra le cellule che lo costituiscono troviamo adipociti maturi e cellule descritte come “frazione vascolare stromatica” caratterizzata da preadipociti, fibroblasti, cellule endoteliali e macrofagi. Gli adipociti, i preadipociti e i macrofagi rilasciano mediatori con effetti biologici differenti,

ad azione autocrina, paracrina ed endocrina (40). I meccanismi dello stato infiammatorio cronico correlato all'obesità non sono del tutto noti. Le attuali evidenze suggeriscono, tuttavia, il ruolo chiave di adipociti e macrofagi. Da diversi studi è emerso che, in condizioni fisiologiche, gli adipociti accumulano acidi grassi e regolano l'omeostasi dei lipidi, i macrofagi rilasciano citochine antinfiammatorie (IL-10, IL-1Ra) e producono arginasi (enzima che inibisce l'ossido nitrico sintetasi; iNOS). In condizioni di obesità, invece, si ha un "cross talk" tra adipociti e macrofagi, il cui fenotipo M2 si differenzia in M1. Tale fenotipo è in grado di produrre le classiche citochine infiammatorie e di esprimere l'iNOS. Ciò determina l'induzione di uno stato infiammatorio e il rimodellamento della composizione cellulare e della struttura del WAT, con iperplasia e ipertrofia degli adipociti e aumento dell'infiltrato macrofagico (41, 42).

L'infiltrato macrofagico determina l'ulteriore incremento dello stato infiammatorio e la sua esacerbazione attraverso il rilascio di altri mediatori infiammatori (43-45), cui sembra anche contribuire la locale ipossia degli adipociti, indotta dal rapido aumento dell'espansione della massa di tessuto adiposo che, inoltre, potrebbe anche costituire l'innescò del processo infiammatorio. Inoltre, il WAT rilascia, agendo da organo endocrino, diverse molecole biologicamente attive, rappresentate da adipochine, citochine, chemochine, fattori ormonali e altri mediatori (46, 47); esse sono rilasciate anche da altri tessuti e organi. Le adipochine alterano il senso di sazietà e di appetito e hanno effetti sul metabolismo glucidico e lipidico, sulla pressione sanguigna, sulla risposta infiammatoria e sul sistema immunitario. La leptina e l'adiponectina mediano, ad esempio, effetti positivi, prevenendo l'insulino-resistenza e aumentando il consumo di energia e la sensibilità insulinica (48, 49). Altre, come le citochine infiammatorie, TNF- α e IL-6 (50), contribuiscono allo stato infiammatorio e all'insulino-resistenza;

l'angiotensinogeno può indurre ipertensione e l'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) può indurre eventi trombotici (51) (Tabella 2). Meccanismi differenti mediano la complessa produzione di adipochine attraverso l'attivazione di differenti vie di trasduzione del segnale, indotte da stressor sia extracellulari sia intracellulari. Tra gli stressor extracellulari si ritrovano: gli stessi acidi grassi liberi, le chaperonine e le molecole associate a danno cellulare (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP), liberate per effetto dei radicali liberi dell'ossigeno.

Gli stressor intracellulari, invece, si accumulano dentro le cellule del WAT, in particolare nei mitocondri e nel reticolo endoplasmatico degli adipociti, e sono frutto del sovraccarico metabolico.

Entrambi i tipi di stressor inducono preferenzialmente l'attivazione della via di segnalazione NF- κ B, responsabile della produzione dei mediatori infiammatori e dell'inibizione diretta del segnale insulinico locale.

Il tessuto adiposo dei soggetti obesi, quindi, risulta essere caratterizzato da un'infiltrazione macrofagica che diviene, gradualmente, una fonte importante di citochine proinfiammatorie. Il tessuto adiposo comincia a produrre TNF- α , che stimola i preadipociti a produrre la proteina che attrae i monociti (MCP-1); in maniera simile le cellule endoteliali secernono MCP-1 in risposta alle citochine: tutto ciò determina un flusso di macrofagi verso il tessuto adiposo. Il trasporto dei macrofagi verso il tessuto adiposo promuove l'adesione di questi al tessuto endoteliale, attivando un circolo vizioso di reclutamento e produzione di mediatori infiammatori.

Nome	Cellule che le esprimono	Effetti biologici
Leptina	Adipociti	Senso di sazietà con effetti diretti sull'ipotalamo; stimola la lipolisi; inibisce la lipogenesi; aumenta la sensibilità all'insulina; incrementa il metabolismo glucidico; stimola l'ossidazione degli acidi grassi.

Adiponectina	Adipociti	Incrementa l'ossidazione degli acidi grassi con la riduzione dei loro livelli nel plasma; diminuisce i livelli di glucosio plasmatici; incrementa la sensibilità insulinica; ha proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, antiaterogeniche e anticancro, attraverso l'inibizione del pathway NF- κ B, indotto dal TNF- α .
Visfatina	Adipociti	Ha effetti insulino-mimetici; induce effetti ipoglicemici, aumentando la captazione del glucosio; promuove la sensibilità insulinica; ha azione proadipogenica e lipogenica. Induce anche chemiotassi e produzione di IL-1 β , TNF- α , IL-6 e di molecole costimolatorie; incrementa la risposta proliferativa nei linfociti.
Interleuchine-6 (IL-6)	Frazione stromale vascolare	Diminuisce il segnale insulinico e della leptina. Induce anche l'ossidazione degli acidi grassi e la lipolisi.
Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)	Adipociti e macrofagi M1	Induce resistenza insulinica e incrementa la lipolisi negli adipociti; diminuisce l'adiponectina e incrementa l'espressione di IL-6.
IL-1Ra	Macrofagi M2	Prodotta in risposta a stress e dai macrofagi M2, in modo da creare un milieu antinfiammatorio nel WAT in condizioni fisiologiche. Alti livelli sierici di IL-1Ra sono correlati a insulino-resistenza.
IL-10	Adipociti e macrofagi M2	Prodotta da macrofagi M2 per creare un milieu antinfiammatorio nel WAT.
Proteina chemiotattica per i monociti-1 (MCP-1)	Adipociti e macrofagi M1	Incrementa la lipolisi e la secrezione di leptina; diminuisce l'assorbimento del glucosio indotto dall'insulina.
Plasminogen Activation Inhibitor-1 (PAI-1)	Cellule stromali vascolari	Inibisce l'attivazione del plasminogeno. Livelli elevati di PAI-1 causano una condizione patologica caratterizzata da ipofibrinolisi e stato protrombotico. In condizioni di obesità, PAI-1 sembra contribuire direttamente alle complicanze dell'obesità, come l'aterotrombosi, la resistenza insulinica e il diabete di tipo 2.

Angiotensinogeno	Cellule stromali vascolari e adipociti	Correlata all'infiammazione vascolare.
------------------	--	--

Tabella 2. Effetti biologici delle citochine e delle adipochine prodotte dal tessuto adiposo.

1.5 Obesità e sistema nervoso centrale (SNC).

Il SNC svolge un ruolo dominante sul controllo dello stato metabolico, riceve, infatti, segnali ormonali e neuronali dalla periferia che sono legati alla carenza o all'eccesso di cibo e al tasso di consumo delle riserve energetiche, così da poter rispondere agli stimoli attraverso la modulazione dei modelli comportamentali del sistema endocrino e del sistema nervoso autonomo, garantendo l'omeostasi energetica.

L'ipotalamo è un'area specializzata del cervello che controlla l'omeostasi energetica attraverso due centri distinti che regolano la fame e la sazietà quali: il nucleo dell'ipotalamo Laterale (LHA) che rappresenta il "Feeding Center" ed il nucleo Ventromediale (VMN) che rappresenta il "Sazietà Center". Questi nuclei ipotalamici formano una rete di circuiti neuronali che, in funzione ai cambiamenti delle condizioni energetiche, regolano l'assunzione di cibo o la spesa energetica in modo da mantenere l'omeostasi del peso corporeo (52-55). Tra i nuclei ipotalamici, il nucleo arcuato è considerato per eccellenza il centro per il controllo dell'assunzione di cibo e funge da guardiano nel regolare il controllo omeostatico dell'alimentazione (56-58). Quest'ultimo, oltre a ricevere segnali sia di tipo oressigeni che anoressigeni dalla periferia, presenta due popolazioni di neuroni denominati nuclei di 1° ordine, che a loro volta producono peptidi in grado di modulare sia il comportamento alimentare che la spesa energetica degli organi periferici. La prima popolazione è costituita dai neuroni AGRP/NPY che producono neuropeptidi oressigeni, la seconda popolazione è costituita dai neuroni POMC/CART che producono neuropeptidi anoressigeni (59).

Dal nucleo arcuato gli stimoli vengono poi trasmessi ad un altro gruppo di neuroni, detti nuclei di 2° ordine contenuti in diversi nuclei ipotalamici, da cui dipartono vie efferenti che, attraverso il sistema nervoso autonomo e gli ormoni, trasmettono le risposte alla periferia (60).

Nel controllo della funzione ipotalamica, un contributo notevole è fornito dalla leptina ovvero un ormone prodotto dal tessuto adiposo la cui concentrazione ematica è direttamente proporzionale alla massa grassa (61). In sinergia con la leptina agisce anche l'insulina, rilasciata dalle cellule β -pancreatiche, trattasi del primo ormone storicamente coinvolto nella regolazione dell'appetito. Entrambi gli ormoni hanno un'azione anoressigena determinando una risposta catabolica dell'organismo, ovvero una riduzione dell'introito calorico e un aumento del dispendio energetico modulando il metabolismo del grasso e del glucosio. Questi ormoni superano la barriera emato-encefalica, giungono al terzo ventricolo e agiscono sui recettori tirosin-chinasici per l'insulina (62) e januskinasi per la leptina (63) presenti sul nucleo arcuato dell'ipotalamo, svolgendo una funzione di controllo del sistema con un meccanismo a lungo termine.

Altri ormoni derivanti dal tratto gastro-enterico, invece, regolano l'apporto energetico attraverso un meccanismo a breve termine, interagendo sul nucleo arcuato dell'ipotalamo e su altri centri cerebrali. La grelina, ad esempio, viene prodotta dalle cellule oxintiche dello stomaco in condizioni di digiuno, determinando a livello ipotalamico un'azione opposta a quella della leptina, ovvero un'azione oressigena aumentando l'introito calorico e diminuendo il dispendio energetico; per di più è anche un potente stimolante dell'ormone della crescita (64).

Altri ormoni di derivazione intestinale che agiscono sul SNC sono: il peptide YY, prodotto dalle cellule L dell'intestino tenue, la colecistochinina, prodotta principalmente

nel duodeno e nel digiuno, nonché altri due importanti peptidi rilasciati dalle cellule L dell'intestino tenue. Si tratta del glucagone like peptide-1 e dell'oxintomodulina che derivano dal proglucagone a seguito dell'azione enzimatica del proormone convertasi 1-2, e che, insieme agli ormoni sopra citati, mostrano un'azione anoressigena (65-67).

L'omeostasi energetica è anche regolata dalla produzione di amine-cerebrali che agiscono sia a livello centrale, per regolare la fame e la sazietà, sia a livello periferico, per regolare il dispendio energetico.

Tra queste molecole, si trova la noradrenalina sintetizzata nel tronco encefalico, nel complesso del vago dorsale e nel *locus ceruleus* che proiettano neuroni adrenergici sia posteriormente alla corda spinale sia rostralmente all'ipotalamo; qui la noradrenalina è colocalizzata con NPY potenziandone l'effetto oressigeno, mediato da recettori α_2 , mentre i recettori α_1 mediano un'azione di tipo anoressigena (9).

Un altro peptide è la dopamina che ha effetti diversi in base alle varie aree cerebrali, in particolare il sistema dopaminergico mesolimbico che si proietta nel nucleo *acumbens*, nello striato e nella corteccia cerebrale, determina gratificazione dell'assunzione di cibo, al contrario, neuroni dopaminergici situati nel nucleo dorsomediale e nel nucleo arcuato dell'ipotalamo, hanno un effetto inibitorio (10).

Anche la serotonina, secreta principalmente dai neuroni del tronco caudale, determina un'azione inibitoria sull'introito del cibo attraverso la stimolazione dei recettori 5HT_{2c} (11).

Altri neurotrasmettitori sono implicati nel controllo del bilancio energetico ma il loro ruolo risulta essere minore rispetto alle molecole citate.

1.5.1 Obesità e sistema Encocannabinoide.

Il sistema endocannabinoide (ECS) comprende i recettori dei cannabinoidi (CB-1R, CB-2R), recettori accoppiati alle proteine G (GPCR) e un complesso apparato costituito da

enzimi che producono e degradano i ligandi endogeni dei cannabinoidi (endocannabinoidi, ECs), ovvero l'anandamide (N-arachidonoiletanolamina, AEA) e il 2-arachidonoil glicerolo (2-AG), i quali derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico (68). CB-1R è uno dei GPCR più abbondanti nel sistema nervoso centrale accoppiato principalmente alla $G_{i/o}$, subunità della proteina G, che inibisce l'adenilato ciclasi, attiva le MAP chinasi e regola i canali del calcio e degli ioni potassio.

Molte delle funzioni biologiche effettuate dagli ECs si esplicano principalmente a livello cerebrale grazie alla loro capacità di agire da neurotrasmettitori. Diversamente dai normali neurotrasmettitori, i quali una volta formati sono stoccati in vescicole secretorie fino al momento del rilascio, gli ECs sono sintetizzati *on demand* ed *in situ* (69) a partire dai lipidi della membrana post-sinaptica in seguito a stimoli quali la depolarizzazione della membrana oppure all'aumento di calcio intracellulare. Una volta prodotti, gli ECs, tramite un percorso retrogrado, attraversano la fessura sinaptica per andare a legare i recettori posti a livello pre-sinaptico, venendo immediatamente degradati al termine della loro azione modulatoria. Inoltre, gli ECs essendo lipofile sono in grado di attraversare le membrane plasmatica e legarsi e attivare i CB-1Rs intracellulari. A livello cerebrale gli ECs sono in grado di inibire l'attività sinaptica. Normalmente, ricevuto un impulso il neurone pre-sinaptico è attivato, ed induce un incremento di calcio intracellulare, il quale a sua volta determina un rilascio di neurotrasmettitori contenuti nelle vescicole secretorie, i quali interagendo con la membrana post-sinaptica determinano una serie di eventi che possono portare ad un'eccitazione o un'inibizione della cellula post-sinaptica. Come detto precedentemente gli ECs prodotti a livello post-sinaptico vanno ad agire per via retrograda sul neurone pre-sinaptico, riducendo l'aumento di calcio intracellulare e in tal modo inibendo il rilascio di neurotrasmettitori generalmente di tipo inibitori. Attraverso questi

meccanismi, l'ECS è coinvolto in svariate funzioni fisiologiche, principalmente quelle correlate alla risposta allo stress e al mantenimento dell'omeostasi cellulare. Gli ECs presentano proprietà neuro-protettrici e nocicettive, sono in grado di regolare l'attività motoria e di controllare alcune fasi del processo della memoria. Inoltre, l'ECS è coinvolto nella modulazione delle risposte immunitarie, infiammatorie ed endocrine, esercitando anche un'azione di tipo anti-proliferativa. Questi inoltre influenzano i sistemi cardiovascolare e respiratorio, controllando il ritmo cardiaco, riducendo la pressione arteriosa e avendo capacità bronco dilatatorie (70).

1.5.2 Il sistema Endocannabinoide nella regolazione del metabolismo energetico.

L'ECS, tramite il CB-1R, svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo energetico, influenzando il comportamento alimentare, nonché, il metabolismo del glucosio e dei lipidi e la spesa energetica dell'organismo (71, 72).

Questo meccanismo è attuato attraverso gli ECs che agiscono sui CB-1R nei distretti coinvolti nel controllo del *food intake* principalmente a livello del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVN) e nell'area laterale dell'ipotalamo (LH) (73). Si attiva, in questo modo, un'azione di tipo oressigena che si traduce in un aumento dell'introito calorico ed una riduzione della spesa energetica, stimolando, quando il segnale è in eccesso, l'accumulo di grasso; tali molecole possono anche agire indirettamente andando ad influenzare l'attività della grelina, ormone intestinale anch'esso ad azione oressigena (74). Inoltre, l'ECS partecipa alla modulazione dei cosiddetti circuiti del piacere e la manipolazione di questo sistema è in grado di influenzare i comportamenti legati alla gratificazione. La più importante via del piacere è rappresentata dal sistema mesolimbico dopaminergico e vari studi indicano una forte correlazione tra i livelli limbici di ECs e di dopamina con un aumento del desiderio legato all'assunzione di cibi appetitosi (75).

I CB-1R oltre ad essere espressi in varie aree cerebrali (76), sono anche presenti in diversi tessuti periferici come il fegato, il tessuto adiposo, il muscolo scheletrico, la milza, il pancreas e l'apparato gastrointestinale indicando che gli effetti del CB-1R sull'apporto calorico e sul peso corporeo non avvengono esclusivamente nel cervello ma anche in tessuti periferici. In questi tessuti, l'attivazione dei CB-1R da parte degli ECs, è fortemente dipendente dallo stato nutrizionale (77) ed è regolato da ormoni e peptidi, tra cui la leptina, la grelina e i glucocorticoidi, coinvolti nell'omeostasi energetica (78-80). La leptina, infatti, è in grado di ridurre i livelli di ECs a livello ipotalamico, mentre l'interazione tra grelina ed ECs sembra potenziare in modo reciproco in segnale oressigeno. Molto importante è l'azione dei glucocorticoidi a livello ipotalamico, con un'azione stimolatoria sul sistema endocannabinoide. Infatti i glucocorticoidi attraverso un'azione a livello dei neuroni per l'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) stimolano il rilascio di ECs. Quest'ultimi a loro volta, agendo per via pre-sinaptica, riducono il messaggio eccitatorio glutaminergico con una conseguente riduzione della secrezione del CRH, ormone anoressizzante, attivando così un'azione finale di stimolo dell'appetito.

Evidenze sperimentali, hanno mostrato che l'attività fisiologica del ECS è alterata durante l'obesità, circostanza che contribuisce al peggioramento di quest'ultima (81). Durante l'obesità, infatti, si assiste ad una patologica iper-attivazione del ECS con un aumento dei livelli di ECs ed un aumento dell'espressione del CB-1R, in tessuti quali ipotalamo, fegato e tessuto adiposo, causando un eccessivo accumulo della massa grassa e determinando un'inibizione della secrezione di adiponectina ed una stimolazione di visfatina che potrebbero condurre ad un peggioramento delle alterazioni metaboliche riscontrate negli individui obesi.

È stato dimostrato che il tessuto adiposo viscerale di soggetti obesi costituisce una riserva patologica di 2-AG rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo, con un' aumentata attivazione degli enzimi deputati alla produzione di ECs. Queste variazioni si riflettono anche a livello del torrente ematico, infatti, i livelli plasmatici di ECs in pazienti obesi con obesità viscerale sono più elevati rispetto ai livelli riscontrati in soggetti con obesità sottocutanea e/o in soggetti magri. Questo sta ad indicare che tanto più un soggetto accumula tessuto adiposo a livello viscerale tanto maggiore è il quantitativo di ECs circolanti con conseguente aumento dell'espressione del numero dei CB-1R.

Da ultimo, è stato osservato che l'attivazione del ECS a livello del tratto gastrointestinale, può modificare l'azione dei neuroni vagali che a loro volta trasmettono segnali a centri nervosi superiori influenzando il comportamento alimentare (82).

1.6 Obesità e alterato trasporto vescicolare.

Nel sistema nervoso i meccanismi di endocitosi ed esocitosi assumono caratteristiche molto importanti dal momento che i neuroni sono cellule estremamente polarizzate e di grandi dimensioni. I neuroni, infatti, hanno un corpo cellulare che si estende con dendriti e assoni che possono proiettarsi anche a notevoli distanze ed inoltre, all'interno di uno stesso assone i vari componenti cellulari da trasportare, denominati "cargo", devono essere spostati verso specifici compartimenti subcellulari per espletare le loro funzioni.

Il trasporto asso-plasmatico, detto anche trasporto assonale, è un processo cellulare che permette il movimento di mitocondri, lipidi, vescicole sinaptiche, proteine e organuli cellulari nel corpo cellulare del neurone (soma) e soprattutto fino alla parte terminale dell'assone, determinandone anche il loro riciclo o permettendo la rimozione delle proteine non ripiegate correttamente per evitare la formazione di aggregati tossici che

possono danneggiare la cellula (83). Oltre ad avere un ruolo nel metabolismo neuronale, il trasporto assonale è di fondamentale importanza per la trasmissione intracellulare neuronale e permette inoltre di rispondere efficacemente ai segnali trofici o alle condizioni di stress (83). Inoltre, vari studi hanno messo in evidenza che la compromissione del traffico asso-plasmatico è strettamente correlato all'insorgenza di vari disturbi tra cui le malattie neurodegenerative (83).

1.6.1 Trasporto anterogrado e retrogrado e struttura dei microtubuli.

Per convenzione vengono distinti due tipi di trasporto asso-plasmatico che si differenziano per velocità e tipi di cargo trasportati. La direzionalità del trasporto assonico può avvenire sia in senso anterogrado, cioè dal corpo cellulare verso le terminazioni assoniche, permettendo il trasporto di componenti membranosi di nuova sintesi, che in senso retrogrado, in direzione opposta, per il riciclo degli stessi. Inoltre, il traffico si divide in trasporto assonale veloce, che è responsabile dello spostamento di enzimi del metabolismo dei neurotrasmettitori, mitocondri e vescicole secretorie oppure trasporto assonale lento, che riguarda il movimento delle proteine citoplasmatiche (tra cui vari enzimi) e proteine del citoscheletro (84). Recenti studi hanno evidenziato che quest'ultimo meccanismo non è effettivamente lento ma è intervallato da varie fasi di stasi che ne rallentano il trasporto (85).

I componenti che permettono il trasporto neuronale a lunga distanza sono i microtubuli, che insieme ai microfilamenti e i neurofilamenti rappresentano i componenti strutturali del citoscheletro neurale (86). Tutti e tre i tipi di filamenti del citoscheletro, si formano come complessi elicoidali di subunità che si auto-associano, utilizzando una combinazione di contatti estremità-estremità o fianco-fianco e le differenze nelle forze che tengono unite tali subunità determinano differenze cruciali nella stabilità e nelle proprietà meccaniche dei singoli filamenti.

I microtubuli sono stabilizzati da diverse proteine ad essi associati costituendo a livello assonico delle vere e proprie piste lungo le quali i vari cargo vengono trasportati grazie all'ausilio di motori molecolari che sfruttano l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per muovere i cargo lungo i microtubuli stessi.

Tra i motori molecolari quelli che regolano il trasporto assonale sono: chinesina (87), dineina e miosina (88).

1.6.2 Selettività dei cargo e direzionalità del trasporto intraneuronale.

Il trasporto intra-neuronale e la sua direzionalità richiedono un processo selettivo di riconoscimento da parte dei motori molecolari, anche grazie all'eventuale aiuto di proteine adattatrici, di specifiche sequenze amminoacidiche che permettono di regolare con estrema precisione la selettività della scelta dei cargo da trasportare. Accanto a questo meccanismo di trasporto selettivo è stato mostrato che il legame del cargo al motore molecolare ne determina un cambiamento conformazionale che può influenzare la direzionalità del trasporto stesso. Inoltre, l'instabilità del macchinario di trasporto, a seguito di specifiche modificazioni post-traslazionali quali fosforilazioni, ubiquitinazioni o acetilazione, possono modulare il processo di trasporto intraneuronale. Difatti, molte evidenze sperimentali supportano l'idea che il trasporto mediato dalla chinesina e dalla dineina è modulata dalla fosforilazione dei motori molecolari o dei cargo. Per esempio, è stato osservato in colture cellulari che la fosforilazione della chinesina sui residui di serina determina il legame con il cargo (89) mentre la fosforilazione delle catene leggere (KLC) da parte di GSK3- β (90) determina il rilascio del cargo, agendo come un inibitore del trasporto anterogrado veloce (91). Questo rilascio del cargo dalla chinesina, lo si osserva anche attraverso l'inattivazione della CDK-5 (92), determinando così la diminuzione del trasporto assonale anterogrado

ma non retrogrado (93). Inoltre, anche la fosforilazione che avviene sui cargo regola il trasporto assonale (94, 95) promuovendo il loro distacco dai motori molecolari (96).

Le modificazioni post-traslazionali possono coinvolgere anche le strutture monometriche dei microtubuli, infatti, l'acetilazione della Lys40 ha mostrato un aumento del reclutamento della chinesina-1 ai microtubuli promuovendo il trasporto anterogrado di JIP-1 nelle cellule neuronali (97).

1.6.3 Rilascio vescicolare.

Il trasporto vescicolare avviene mediante intermedi di membrana che gemmano da un compartimento donatore, percorrono una certa distanza per poi fondersi in un compartimento accettore. Il traffico vescicolare tra il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi è determinato da vescicole di trasporto rivestite da COP-II, un complesso molecolare costituito da 5 sub-unità proteiche (98) in grado di reclutare le proteine cargo pronte per essere trasportate (99), inoltre tale complesso è in grado di polimerizzare il rivestimento ed attuare il rimodellamento della membrana per la formazione delle vescicole stesse (100). Una volta gemmate dal reticolo endoplasmatico, le vescicole di trasporto si fondono tra loro formando delle strutture tubulari prima di raggiungere l'apparato di Golgi. Questo compartimento intermedio formato da tali strutture tubulari, rappresenta una stazione di smistamento per le proteine derivanti dal reticolo endoplasmatico che da qui o vengono trasportate al Golgi mediante il traffico anterogrado, o vengono riportate indietro mediante il traffico retrogrado (101). Il traffico retrogrado è mediato da vescicole di trasporto rivestite dal complesso COP-I costituito da 7 sub-unità, implicato anche nel traffico retrogrado di vescicole che si muovono dal Golgi verso il reticolo e tra le diverse cisterne del Golgi stesso.

Un aspetto molto importante del traffico vescicolare è rappresentato dalla capacità delle vescicole di trasporto di legarsi e poi di fondersi con il compartimento cellulare bersaglio. Un esempio si osserva a livello delle terminazioni pre-sinaptiche in cui sono presenti strutture vescicolari specializzate, le vescicole sinaptiche, la cui funzione conosciuta è quella di acquisire e rilasciare i neurotrasmettitori (NT). Le vescicole, vengono sintetizzate a livello dell'apparato di Golgi ed una volta condotte al terminale presinaptico tramite il trasporto assonale rapido, rimangono legate ai microfilamenti di actina tramite la sinapsina fino a quando quest'ultima non viene fosforilata. Le vescicole, inizialmente vuote al loro interno, presentano sulla membrana delle proteine di trasporto composte da pompe protoniche che generano il gradiente elettro-chimico che permette l'assorbimento dei neurotrasmettitori (102, 103), oltre a presentare proteine coinvolte nel processo di esocitosi ed endocitosi. Una volta riempite con un tipo specifico di neurotrasmettitore le vescicole vengono indirizzate, dopo un opportuno segnale mediato da specifiche proteine, per esempio le Rab (GTPasi della superfamiglia delle proteine RAS) verso regioni specializzate del terminale pre-sinaptico dette zone attive (AZ) dove avverrà il rilascio dei neurotrasmettitori. I meccanismi molecolari che mediano il rilascio di neurotrasmettitori coinvolgono un elevato numero di proteine. Si stima che più di 1000 proteine funzionano nel terminale nervoso pre-sinaptico, ed un centinaio di queste si pensa siano coinvolte nel processo di esocitosi ed endocitosi delle vescicole sinaptiche. La AZ è una regione della membrana plasmatica spazialmente controllata da un reticolo di proteine che vanno a costituire il CAZ (Cytoskeletal matrix assembled at the AZ) (104). Le proteine che fanno parte del CAZ includono: Munc13 (105, 106), RIM (Rab3-interecting molecules) (107, 108), RBPs (RIM-binding protein), Piccolo e Bassoon, ERC (ELKS/Rab3-interecting molecules/CAST) (109-111) e α -liprins (112). Tutte queste proteine vengono trasportate in vescicole chiamate PTVs

(Piccolo-Bassoon Transport Vesicle) (113-116) dalla rete trans del Golgi tramite trasporto mediato dai microtubuli (115). Ogni PTV trasporta una parte di impalcatura pre-assemblata di CAZ e successivamente tutte le sue componenti si uniscono tra loro a formare un complesso unico a livello della zona attiva (117-120). Le RIM sono gli elementi centrali delle zone attive in quanto si legano indirettamente o direttamente a molte proteine sinaptiche. RIM, infatti, interagisce direttamente con il suo dominio zinc-finger N-terminale con Rab3 (proteine delle vescicole sinaptiche) e con Munc13-1 (proteina della zona attiva pre-sinaptica), con il suo dominio PDZ centrale interagisce con i domini C-terminale delle ERC e con il dominio C-terminale lega l' α -liprins. Inoltre, le ERC si legano direttamente ad α -liprina ed alle proteine Piccolo e Bassoon. Il complesso macromolecolare risultante, costituisce un'impalcatura necessaria per l'organizzazione dell'esocitosi delle vescicole sinaptiche (121). L'esocitosi delle vescicole sinaptiche è un processo dinamico che è spazialmente e temporalmente regolato da una serie di interazioni tra proteine (122-124) (Figura 2). La famiglia delle proteine Sec1/Munc18 (SM) è coinvolta in tutti gli eventi del traffico di membrana ed è essenziale per la regolazione dell'esocitosi. Munc18-1 (mammalian uncoordinated 18) non possiede domini capaci di legarsi alla membrana ma è in grado di influenzare la secrezione vescicolare, collegando le proteine di membrana con le proteine presenti sulle vescicole secretorie, difatti, interagisce con DOC-2 (93), che si trova sulla superficie vescicolare, con Mint-1 (94) e con la syntaxina-1 (95) presenti sulla membrana cellulare. La proteina Mint 1 agisce da reclutatore di Munc18-1 al sito di secrezione delle vescicole e potrebbe essere una delle proteine coinvolte nel ruolo syntaxina-indipendente per Munc18-1 nella fusione della vescicola. Altre proteine coinvolte nel rilascio vescicolare sono: omologhi di Sec18/N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF), Sec17/soluble NSF attachment proteins (SNAPs), recettori SNAP

(SNARE) e piccole GTPasi della famiglia Rab. Inoltre, altre proteine come ad esempio la sinaptotagmina 1, Munc13-1 e la complexina sono proteine cruciali per l'esocitosi Ca^{2+} -dipendente, ma non per gli altri eventi del traffico di membrana. Le proteine SNARE (solubile NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor) (125), sono i recettori della proteina SNAP (126,127) e guidano il processo di fusione delle vescicole secretorie. Questo processo a livello sinaptico è mediato da tre proteine SNARE: la sinaptobrevina o VAMP2 (vescicole-associated membrane protein) incorporata nelle membrane delle vescicole sinaptiche (v-SNARE), la syntaxina e la SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa) situate nella membrana del compartimento bersaglio (t-SNARE) (128-132). L'interazione specifica tra la v-SNARE con la t-SNARE, secondo un modello a chiusura lampo (zippering), è essenziale per il processo di fusione della vescicola con la membrana pre-sinaptica. La formazione del complesso fra le v-SNARE e le t-SNARE, determina il *docking* delle vescicole ed in questo momento le vescicole sono in grado di rispondere ai successivi incrementi di Ca^{2+} che si verificano all'arrivo del potenziale d'azione nel terminale presinaptico. Raggiunto il potenziale, si ha l'apertura dei canali per il Ca^{2+} , con ingresso di questi ultimi nella cellula, all'interno della quale il Ca^{2+} si lega alla sinaptotagmina-1, una proteina presente sulle vescicole sinaptiche che, in tale condizione subisce un cambiamento conformazionale che induce il suo distacco dal complesso SNARE ed il legame con i fosfolipidi di membrana portando ad un'immediata *fusion* delle due membrane. La membrana della vescicola quindi si fonde e si integra con quella plasmatica, permettendo il rilascio del contenuto nello spazio sinaptico. Il tempo che intercorre fra l'arrivo di un potenziale e il processo di fusione delle vescicole a livello del terminale pre-sinaptico è all'incirca di 0,5 ms (133). Un'altra classe di proteine che influenzano la funzione del complesso SNARE sono le sinaptofisine, abbondanti

proteine delle vescicole sinaptiche che si legano direttamente alla sinaptobrevina (134-137). Questo legame riduce la disponibilità della sinaptobrevina per la formazione del complesso SNARE e di conseguenza limita la fusione delle membrane (136, 138). Dopo l'esocitosi le vescicole vanno incontro ad un meccanismo di endocitosi. Le proteine della vescicola possono essere re-internalizzate tramite un meccanismo mediato dalla clatrina e dalla dinamina, che permette alle vescicole di staccarsi dalla membrana. Una volta re-internalizzate, le vescicole perdono il rivestimento di clatrina, indirizzandosi verso gli endosomi precoci con i quali si fondono per eliminare o sostituire le proteine di membrana, rigenerando così le vescicole. Sebbene molte vescicole vengano riciclate tramite l'endosoma, è possibile che alcune vescicole non passino per questa via. Infatti, le vescicole dopo il rilascio del neurotrasmettitore possono andare incontro ad endocitosi restando nella zona attiva (meccanismo "kiss and stay") o riciclando localmente senza la mediazione della clatrina (meccanismo "kiss and run"), entrambi i meccanismi sono molto più rapidi rispetto al processo mediato da clatrina (104).

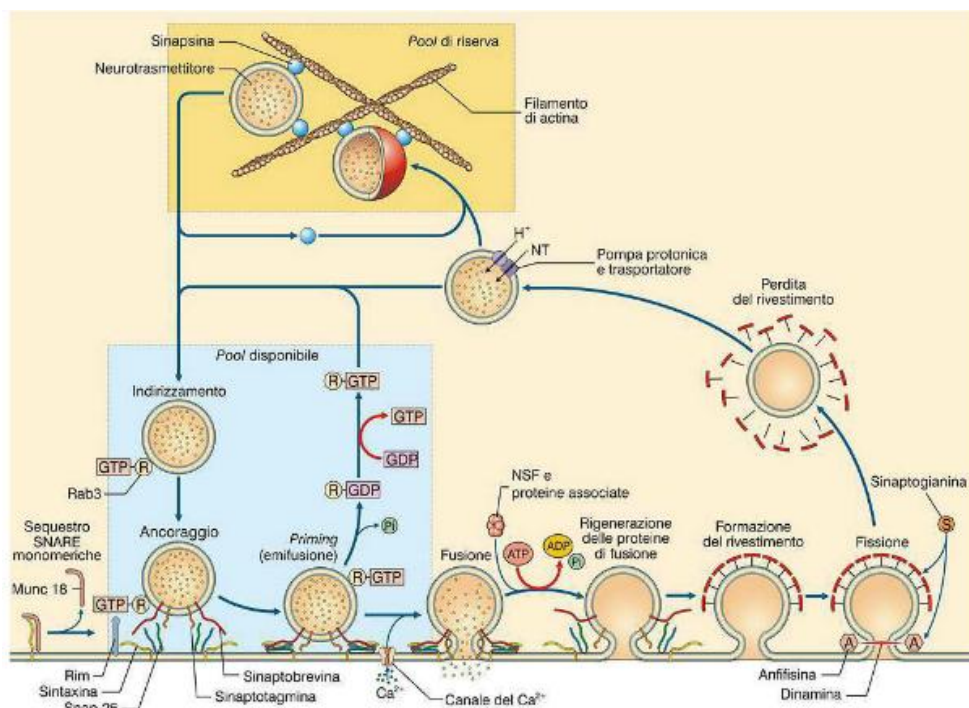


Figura 2. Meccanismo del rilascio dei neurotrasmettitori.

1.6.4 Difetti del trasporto assonale e malattie neurodegenerative.

Il corretto trasporto asso-plasmatico è una condizione importante per la fisiologica funzione e sopravvivenza neuronale. Il trasporto assonale può essere influenzato da alterazioni ai vari componenti del macchinario di trasporto stesso e tali difetti contribuiscono all'insorgenza di vari disordini neurodegenerativi, caratterizzati da un irregolare accumulo di organuli e proteine nel corpo cellulare e nell'assone. Questa condizione si riscontra, ad esempio, nei malati di Alzheimer (AD) in cui la presenza della proteina tau iper-fosforilata (139, 140), da parte della proteina chinasi CDK5-p25 o dalla glicogeno sintetasi chinasi 3β (GSK3 β), comporta la perdita della sua affinità per i microtubuli causandone la destabilizzazione e la formazione dei grovigli neurofibrillari con il conseguente collasso dell'intera rete citoscheletrica. Vari studi hanno evidenziato che i difetti del trasporto assonale, legati ad alterazioni della chinesina, possono determinare un incremento della condizione di stress assonale che conduce ad un'iper-fosforilazione anomala della proteina tau (141).

Così come nei pazienti malati di Parkinson (PD) dove si evidenzia un'iper-fosforilazione e accumulo della proteina α -sinucleina principale costituente dei corpi di Lewy (142), mentre nei soggetti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA) si osserva un accumulo di vescicole, lisosomi, mitocondri e filamenti intermedi nel tratto iniziale degli assoni alterando il traffico assonale stesso (143, 144). Inoltre, questi accumuli patogenetici di organuli a seguito di un danno al sistema di traffico neuronale comportano una marcata dilatazione assonale.

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da accumuli progressivi di specifiche proteine in diversi tipi di neuroni. I disturbi nel trasporto assonale sembrano essere la chiave degli eventi patologici che contribuiscono alla neurodegenerazione, come

dimostrato nelle patologie precedentemente descritte, sebbene la relazione causale tra le alterazioni del trasporto e la degenerazione rimangono ancora poco chiare.

L'identificazione di mutazioni nei geni codificanti proteine, noti per essere coinvolti nel trasporto assonale, sostengono con forza l'idea che il difettoso trasporto intracellulare può innescare direttamente la neurodegenerazione, evidenziando come tali deficit possano essere i primi eventi responsabili dell'insorgenza delle patologie neurodegenerative.

CAPITOLO 2

2.1 Obesità e proteomica.

2.1.1 Dalla genomica alla proteomica.

Il progetto “Genoma Umano” ha evidenziato che il numero dei geni identificati nel genoma umano sono di gran lunga inferiori rispetto al numero atteso, dal momento che specie considerate più semplici rispetto al genere umano, come il *Caenorhabditis elegans*, possiedono un simile numero di geni con una dimensione del genoma di gran lunga inferiore. Questa scoperta ha dunque posto in risalto che la complessità della specie umana non è direttamente proporzionale al numero dei geni ma all’enorme quantità di prodotti proteici che ne derivano dalla codifica di ciascun gene. Da quel momento in poi, parallelamente allo studio genomico si iniziò a porre l’attenzione sullo studio delle proteine, dando vita ad una nuova scienza ovvero la “proteomica” che si basa sulla caratterizzazione delle proteine e sull’analisi delle modifiche che si verificano dopo la loro traduzione. Tali modifiche definite “post-traduzionali” non dipendono esclusivamente dalla fisiologia della cellula ma possono instaurarsi a seguito di stimoli esterni alla cellula stessa. Lo studio dei singoli geni e delle singole proteine non permette di capire efficientemente tutti gli eventi che si verificano all’interno della cellula, per arrivare a tale scopo bisognerebbe studiare tutte queste componenti nella loro globalità. La proteomica costituisce in tal senso lo studio della totalità e della funzionalità delle proteine resa possibile grazie allo sviluppo di metodi sempre più sofisticati ed ottimizzati che permettono una più accurata separazione e identificazione delle proteine, grazie anche allo sviluppo di mezzi informatici sempre più avanzati che ne permettono la loro indagine. A questa necessità risponde la Bioinformatica, che applica la programmazione e il calcolo computazionale alla gestione e interpretazione

dei dati genomici oltre che proteomici e che ha permesso la formazione di banche dati e sistemi computazionali per lo studio di tali discipline.

2.1.2 Proteomica.

La Proteomica, è una disciplina estremamente vasta e complessa che consente l'identificazione, la quantizzazione e la caratterizzazione di tutte le proteine di una cellula, di un tessuto o di un organismo (145-153).

Non esiste una correlazione lineare tra genotipo (sequenza genica) e fenotipo di un organismo (la sua espressione), per di più il concetto secondo cui un gene codifica una sola specifica proteina è stato abbondantemente abbandonato poiché tramite studi proteomici si è scoperto come la formazione di proteine da parte dell'organismo è molto complessa.

Difatti, moltissimi geni umani, durante la trascrizione, vengono sottoposti a splicing alternativo per produrre sequenze differenti di mRNA che codificano isoforme proteiche provenienti dallo stesso gene. Da un singolo mRNA vengono quindi tradotte più proteine che a loro volta vanno incontro a modificazioni post-traduzionali, conducendo alla formazione di innumerevoli proteine funzionali (Figura 3).

Il proteoma, inoltre, a differenza del genoma, costituito unicamente da una sequenza di nucleotidi, non si limita solo alla sequenza amminoacidica di una proteina, ma tiene conto anche della struttura che la proteina assume nello spazio e delle interazioni che avvengono tra le proteine stesse (Interattomica). Infine, molteplici cause tra cui gli stati patologici, le risposte a stimoli esterni oppure diversi processi fisiologici possono determinare la variabilità del contenuto proteico in una cellula, in un tessuto o in un organismo (145).

Alla luce di quanto detto, il genoma può essere considerato “statico” rispetto al proteoma che è in continuo cambiamento.

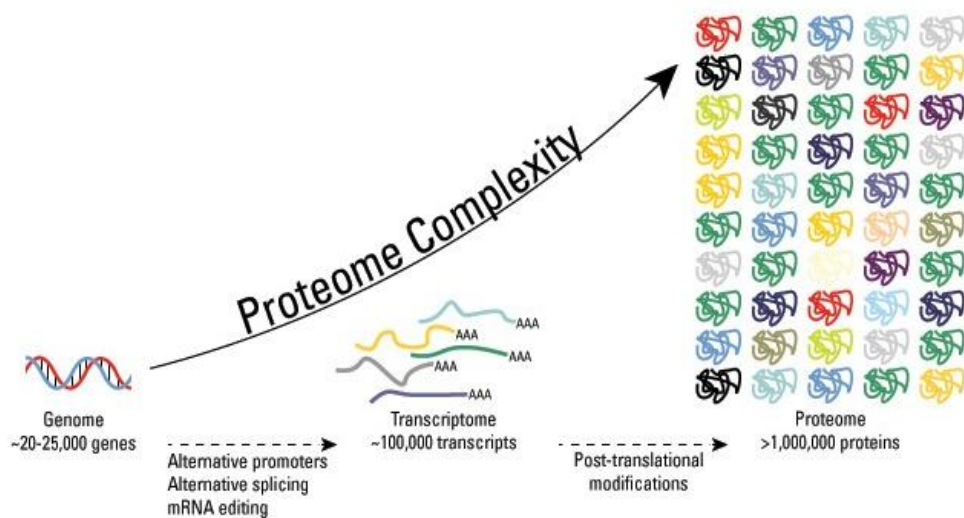


Figura 3. Processi che dal genoma conducono alla formazione di innumerevoli proteine funzionali.

Gli studi proteomici si concentrano su due aree principali: la proteomica di espressione, che mira a misurare i livelli proteici, e la proteomica funzionale finalizzata alla caratterizzazione delle attività proteiche, complessi multiproteici e vie di segnalazione (154-157).

Gli studi di proteomica di espressione analizzano l'espressione delle proteine in determinate condizioni fisiologiche o patologiche della cellula. Nelle applicazioni biomediche questo approccio ha una notevole importanza per l'identificazione di marcatori molecolari e bersagli terapeutici (158-161) in alcune patologie umane, in particolare quelle di origine tumorale, dove il proteoma delle cellule tumorali può essere direttamente confrontato con quello delle cellule sane. In questo modo è possibile identificare nuovi marcatori per una diagnostica precisa e precoce, comprendere le fasi e i meccanismi di sviluppo delle malattie tumorali e identificare nuovi bersagli molecolari per opportuni e mirati interventi terapeutici.

Gli approcci di proteomica funzionale affrontano, invece, due argomenti principali quali, la spiegazione della funzione biologica delle proteine sconosciute e la definizione dei meccanismi cellulari a livello molecolare. Nelle cellule, molte proteine mostrano la

loro funzione biologica attraverso l'associazione rapida e transitoria all'interno di grandi complessi proteici (162, 163).

Per finire, le applicazioni dell'analisi proteomica sono molteplici e sono utilizzate per:

- Valutare le variazioni dei livelli di espressione di alcune proteine in seguito ad opportuni stimoli e/o a condizioni fisio-patologiche.
- Identificare l'entità delle modifiche post-traduzionali a livello sia qualitativo che quantitativo.
- Analizzare le interazioni che le proteine stabiliscono con altre proteine, in relazione a determinati stimoli, determinando l'attivazione di fenomeni vitali come la crescita cellulare, il differenziamento e l'apoptosi.
- Identificare le proteine che interagiscono specificamente con ligandi naturali e di sintesi al fine di comprendere, per esempio, i meccanismi d'azione di farmaci.

2.1.3 Fosforilazione delle proteine e fosfoproteomica.

La fosforilazione delle proteine rappresenta una delle modificazioni post-traduzionali (PTM) più diffuse in natura ed è un meccanismo di regolazione essenziale sia per i procarioti che per gli eucarioti (164, 165).

L'importanza della fosforilazione risiede nella sua potenziale modificazione della stabilità e dell'attività catalitica della proteina, alterando anche le interazione proteina/proteina, proteina/RNA e proteina/DNA (166), regolando in tal modo una miriade di processi cellulari come le vie di segnalazione inter- e intracellulare, sintesi proteica, espressione genica, sopravvivenza cellulare e apoptosi (167).

L'evento di fosforilazione è attuato dalle proteine chinasi che catalizzano il trasferimento del gruppo fosforico acquisito da un composto organico ad alta energia, come ATP o la guanosina trifosfato (GTP), aggiunto alla catena laterale dei residui di

Serina (Ser), Treonina (Thr) o Tirosina (Tyr) in modo da formare il legame fosfodiesterico con tali residui.

Le chinasi comprendono l'1,7% dei geni umani (165), e le abbondanze relative di fosfoerine, fosfotreonine e fosfotirosine nel proteoma umano sono rispettivamente 90%, 10% e 0,05% (168). Questi valori sono dipendenti dalla metodica utilizzata per la loro misurazione, infatti, con lo svilupparsi della spettrometria di massa è stato possibile incrementare la rivelazione percentuale delle fosfotirosine. Ad oggi le percentuali delle fosfoerine, fosfotreonine e fosfotirosine sono rispettivamente di 86,4%, 11,8 e 1,8% (169). L'idrolisi del legame fosfodiesterico è effettuato dalle proteine fosfatasi che catalizzano la rimozione enzimatica dei gruppi fosfato dalle proteine riportandole alla condizione non fosforilata (170, 171).

Le fosfatasi hanno una maggiore cinetica rispetto alle chinasi (172) e ciò comporta la perdita di molte fosforilazioni durante la preparazione dei campioni a meno che le fosfatasi non siano inattivate attraverso l'uso di specifici inibitori (173).

La fosforilazione influisce sulla proteina cambiandone la carica e l'idrofobicità delle catene laterali dell'amminoacido cui si lega e gli amminoacidi carichi negativamente o positivamente che si trovano nelle immediate vicinanze al sito fosforilato saranno rispettivamente respinti o attratti. Questa condizione indurrà cambiamenti conformazionali della proteina alterandone le proprie caratteristiche (174) determinandone l'attivazione, l'inibizione oppure la variazioni dei partner proteici.

La risposta cellulare a stimoli esterni è affidata spesso a fosforilazioni reversibili che avvengono a cascata su varie proteine (175). Quando un ligando si lega al recettore transmembrana provoca un cambiamento conformazionale del dominio citosolico del recettore che induce l'attivazione di specifiche proteine chinasi o fosfatasi che

catalizzano l'attivazione o l'inibizione di altre proteine a valle della cascata determinando in questo modo la trasduzione del segnale.

Le cellule dei mammiferi esprimono più di 100 diversi recettori di membrana coinvolti nel controllo della trascrizione. Ogni tipo di recettore attiva solo un numero limitato di pathway di segnalazione, che a loro volta possono condividere tra loro vari componenti funzionali, agevolando il *cross-talk* tra i pathway (175).

Da questa osservazione si evince che il concetto dei percorsi di segnalazione lineari deve essere superato in quanto le vie di segnalazione si intersecano tra loro formando una complessa rete di segnali che determinano la risposta biologica (176).

La fosforilazione di proteine è coinvolta in diverse malattie e la conoscenza delle dinamiche di fosforilazione proteica, l'identità delle proteine chinasi o fosfatasi e dei substrati coinvolti, è di primaria importanza nella comprensione della cascata di eventi che avvengono all'interno delle cellule. La comprensione dettagliata dei pathway di segnalazione cellulare, sia in condizioni normali che in condizioni patologiche, possono quindi facilitare lo sviluppo di un intervento farmaceutico precoce, mirato ed accurato verso svariate patologie.

La Fosfoproteomica è la scienza che consiste nell'analisi delle fosfoproteine utilizzando un approccio di spettrometria di massa. Questi studi sono particolarmente complessi poiché solo una piccola frazione di proteine viene modificata in seguito ad uno stimolo ed inoltre i siti di fosforilazione di una proteina possono variare in maniera del tutto dipendente dalla specificità delle chinasi, generando così una complessa eterogeneità molecolare, per non dimenticare il ruolo svolto dalle fosfatasi che, come detto precedentemente possono modificare il quadro della fosforilazione.

Identificare il sito fosforilato di una proteina è spesso essenziale per chiarire specifici rapporti chinasi-substrato, il che fornisce un grosso supporto per comprendere i diversi

fenomeni biologici e i percorsi delle vie di trasduzione del segnale e permettere di comprendere appieno il ruolo che le proteine possono avere in numerose patologie. Nonostante gli intensi sforzi impiegati per chiarire tutti i meccanismi di regolazione della fosforilazione delle proteine, l'identificazione su larga scala e la caratterizzazione dei siti di fosforilazione rimane un problema ancora irrisolto. L'analisi delle fosfoproteine tramite spettrometria di massa (177, 178) ha permesso, grazie alla nascita di strumenti ad alta precisione e risoluzione come Q-TOF, FT-ICR e ORBITRAP, lo studio delle proteine fosforilate su larga scala, in grado di rilevare e quantificare più di 10000/20000 siti di fosforilazione (179-181), considerati comunque un numero inferiore rispetto ai numeri di siti stimati in una cellula di mammifero (181).

CAPITOLO 3

3.1 Scopo della tesi.

Lo scopo di questa tesi è mettere in evidenza la relazione tra nutrizione e neurodegenerazione attraverso l'analisi di pathway proteici utilizzando la tecnica della fosfoproteomica. Infatti, solo di recente l'utilizzo di questa tecnica multidisciplinare è stata applicata alle neuroscienze, in quanto rappresenta un ulteriore strumento per l'analisi più approfondita del ruolo dell'effetto dei nutrienti sull'omeostasi metabolica cerebrale attraverso lo studio di una delle modificazioni post-traduzionali (PTM) più diffusa in natura quale è la fosforilazione. In particolare questo progetto ha provato a delineare differenze in modificazioni post-traduzionali in modelli murini a fronte di due differenti regimi nutrizionali volti allo studio dell'obesità e della neurodegenerazione.

Numerosi studi sono stati effettuati a livello genetico ma ben poco, o quasi nulla, è stato osservato riguardo la differenza nell'espressione delle proteine tra dieta convenzionale, dieta iperlipidica e dieta iperglicemica. L'entità del danno cerebrale, indipendentemente dal quadro clinico, è il risultato di un'interazione fra predisposizione genetica e fattori ambientali. Tra questi fattori lo stile di vita, correlato soprattutto al tipo di alimentazione, gioca un ruolo molto importante nel determinare l'insorgenza di un precoce declino cognitivo (182).

Alcuni studi hanno dimostrato che una dieta ad alto contenuto in grassi o ad alto contenuto in carboidrati accelerano la neurodegenerazione (183) causata dall'aumento dell'espressione dei geni caratteristici della risposta infiammatoria (184, 185), e dalla riduzione dell'espressione dei geni regolatori dei processi ossidativi inducendo allo sviluppo di una condizione di stress ossidativa che danneggia la cellula (186). Inoltre, l'eccesso lipidico indotto dalle due diete potrebbe contribuire alla riduzione dell'attività

insulinica portando allo sviluppo di insulino-resistenza e di tutte le complicanze ad essa collegate (187) (Figura 4).

L'eccesso ponderale, oltre ad aumentare quindi il rischio di malattie cardiovascolari, favorisce l'insorgenza di demenza (188), osservandosi a livello sperimentale un'aumentata deposizione di β -amiloide nel cervello, mimando un quadro clinico tipico dell'AD (189). È stato inoltre dimostrato che una dieta a basso contenuto di colesterolo e grassi saturi ma con l'assunzione di grassi mono o poli insaturi, omega 3 e ricca di vegetali, legumi, verdure, cereali integrali è capace di ridurre il rischio di insorgenza di patologie neurodegenerative tra cui l'AD (190-194).

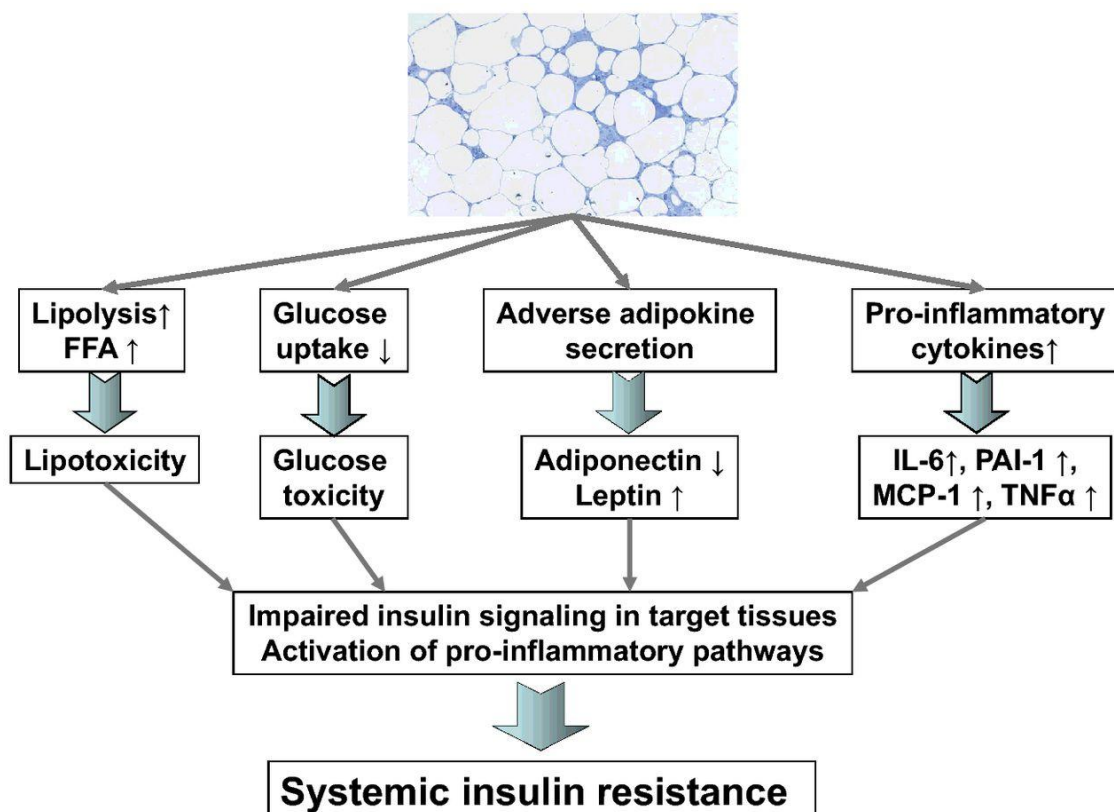


Figura 4. Insulino-resistenza indotta dall'obesità

3.2 Metodiche di analisi applicate allo scopo della tesi.

In questo lavoro di fosfo-proteomica basata sulla spettrometria di massa si esegue l'approccio sperimentali *bottom up gel-based* basato sulla pre-separazione delle proteine

tramite gel elettroforetico, in cui le proteine vengono separate in base alle loro proprietà intrinseche (peso molecolare e/o punto isoelettrico) e digerite, con degli enzimi specifici, all'interno del gel in peptidi che vengono successivamente estratti dal gel stesso, arricchiti per acquisire i fosfopeptidi di nostro interesse e sottoposti alla successiva analisi allo spettrometro (Figura 5).

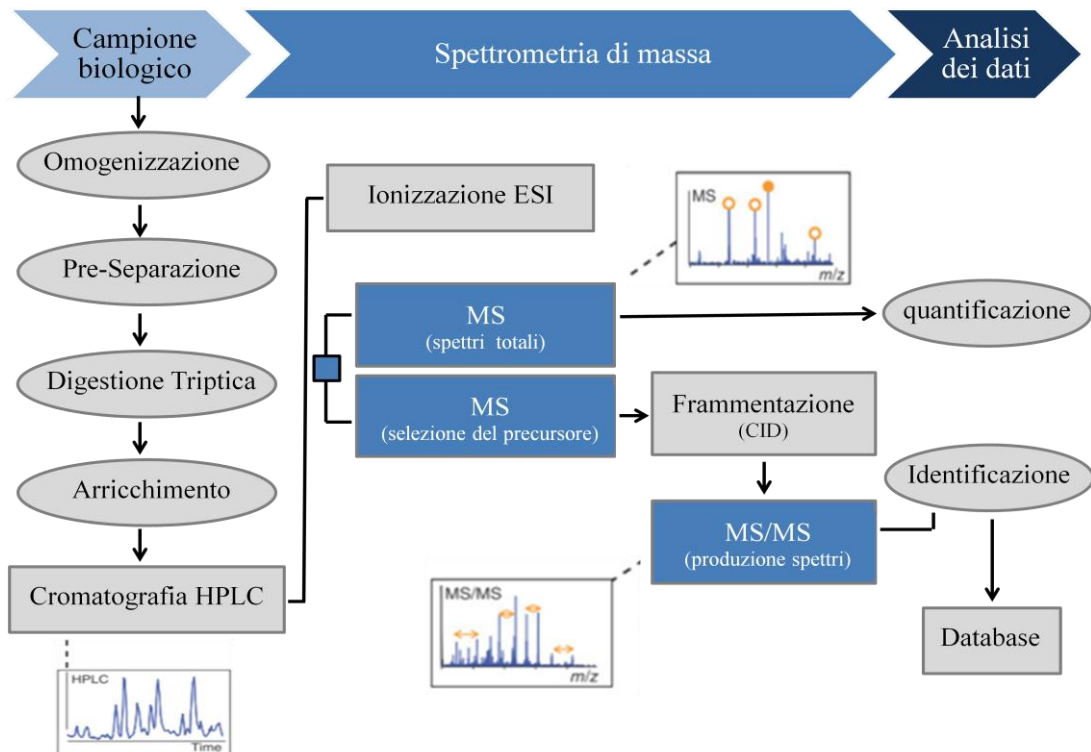


Figura 5: Flow chart dell'analisi Fosfo-proteomica.

La metodica bottom-up permette di identificare una proteina in modo semplice e veloce a seguito di una digestione enzimatica. Tuttavia, la qualità dei risultati dipende molto dalla purezza e dalla complessità dei campioni. La pre-separazione delle proteine dalla miscela risulta necessaria per una maggiore accuratezza di tale metodica.

3.2.1 Metodologia di frazionamento.

Vista la complessità del campione biologico considerato, si procede alla separazione delle proteine utilizzando come approccio sperimentale l'elettroforesi monodimensionale in gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) (195-197).

La separazione tramite un supporto solido consente di avere una maggiore risoluzione del proteoma ed inoltre, con l'elettroforesi tutte le impurità come detergenti e tamponi usati per l'omogenizzazione delle proteine vengono rimossi in modo da non interagire negativamente con la successiva analisi spettrometrica (198). L'elettroforesi monodimensionale permette la separazione delle singole specie proteiche di una miscela complessa di proteine in funzione della loro mobilità relativa (M_r), che in questo caso dipende dal peso molecolare. Affinché la separazione tenga conto solo del peso molecolare della proteina, bisogna che i polipeptidi abbiano tutti la stessa carica e forma, quindi devono essere completamente denaturati. A tale scopo viene utilizzato il sodio dodecil solfato (SDS) un detergente anionico che si lega alle proteine mediante la sua porzione idrofobica che le solubilizza e denatura attraverso la rottura dei legami idrogeno e delle interazioni idrofobiche, senza però essere in grado di rompere i ponti disolfuro; conseguenza di ciò è la distruzione delle strutture secondarie e terziarie della proteina. Peraltro l'SDS fornisce alle proteine una carica netta costante per unità di massa 1,4g SDS/1g proteina (1 SDS/2 aa), dando un rapporto m/z uguale per qualsiasi proteina. L'elevata forza di repulsione, che le cariche negative esercitano tra loro, permette alla catena polipeptidica di disporsi in maniera lineare, cosicché sottoposte al campo elettrico esse si separeranno solo sulla base delle loro dimensioni. Oltre all'uso dell'SDS è importante anche l'utilizzo di agenti riducenti, agenti alchilanti e tamponi. I primi (es. il β -mercaptoetanolo o il Ditiotreitolocon (DTT)) hanno la funzione di rompere i ponti disolfuro tra le cisteine rendendo la catena amminoacidica lineare, mentre gli agenti alchilanti (es la Iodoacetamide (IAA)) hanno la funzione di legarsi alle cisteine evitando la nuova formazione dei ponti disolfuro. I tamponi, solitamente Tris/HCl, sono necessari per mantenere un pH adeguato alla separazione e rendere il processo maggiormente riproducibile. I campioni caricati su gel, dopo la separazione

elettroforetica, vengono analizzati per avere informazioni sulla posizione e sulla quantità di ogni proteina, comparando le bande proteiche con lo standard di riferimento fatto correre in un pozzetto del gel. Le proteine vengono rese visibili mediante l'utilizzo di coloranti che si intercalano nel gel e legano solo le proteine che si distribuiranno in base al loro peso molecolare. In conclusione l'elettroforesi su gel è tipicamente una tecnica analitica, tuttavia essa può essere usata a scopi preparativi, perché le molecole contenute nelle bande possono essere recuperate dal gel per diffusione o mediante elettro-eluzione e sottoposte a successive analisi.

3.2.2 Metodologia di arricchimento.

La fosforilazione è una modificazione post-traduzionale in cui la componente fosforilata ha una bassa stechiometria rispetto alla sua controparte non fosforilata. Considerando i bassi livelli di espressione della maggior parte delle proteine regolate dalla fosforilazione, è indispensabile impiegare qualche tipo di strategia di arricchimento specifico per tali peptidi in modo da superare l'enorme complessità di un lisato cellulare ed isolare la frazione di interesse. La procedura utilizzata per l'arricchimento dei fosopeptidi che si è dimostrata molto efficace e selettiva, è la cromatografia con TiO_2 (199, 200). Nel 2004, il TiO_2 è stato riconosciuto come resina cromatografica per l'arricchimento selettivo dei fosopeptidi (201-203), grazie alle sue cariche positive che legano specificatamente i gruppi fosforici, carichi negativamente, di serina, tirosina e treonina. L'arricchimento dei fosopeptidi tramite TiO_2 è molto specifico e non risente, a differenza di altre metodiche, di tutta una serie di reagenti come PBS, TritonX-100, EDTA, vari sali, detergenti e reagenti biologici (204). Inoltre, l'aggiunta di SDS, ha mostrato un notevole miglioramento nella resa dell'arricchimento dei fosopeptidi, in quanto, i peptidi, specialmente quelli multifosforilati, tendono ad aderire alle superfici dei puntali e dei tubi utilizzati per la preparazione dei campioni, che viene evitato

proprio dalla presenza di questo detergente ionico (204). Questa metodica di arricchimento tramite TiO_2 è molto efficace ed è applicata in numerosi studi di fosfoproteomica grazie alla sua semplicità e soprattutto alla sua specificità (205-213).

3.2.3 Cromatografia (RP-HPLC).

Gli strumenti utilizzati in questo lavoro sperimentale sono il sistema cromatografo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) collegato in tandem allo spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific). In particolar modo è stata utilizzata la cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC), in cui la fase stazionaria è apolare rispetto alla fase mobile che risulta essere polare. Il tempo di ritenzione sarà diverso in base al tipo di analita; quelli con minore affinità alla fase stazionaria (analiti apolari) non saranno trattenuti ed eluiscono più velocemente rispetto a quelli con maggiore affinità alla fase stazionaria (analiti polari) che saranno trattenuti ed usciranno dalla colonna cromatografica man mano che il gradiente di polarità della fase mobile è sufficiente a contrastare le forze idrofobiche che mantengono i peptidi o le proteine adsorbiti alla resina della colonna cromatografica. Tramite un rilevatore a UV è possibile analizzare i differenti tempi di ritenzione degli analiti e l'elaborazione del dato analitico permette la formazione di un cromatogramma (Figura 6).

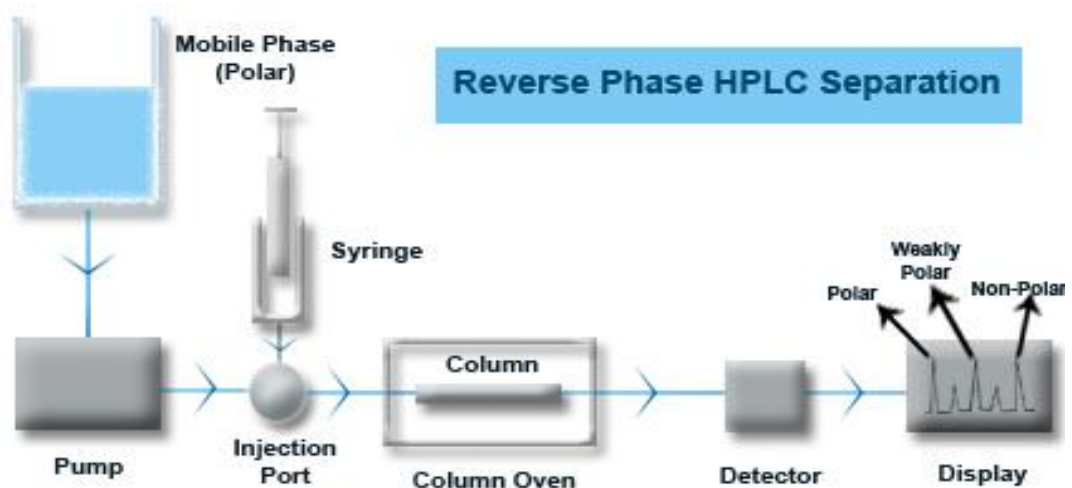


Figura 6. Schema di un sistema RP-HPLC.

3.2.4 Spettrometria di massa tandem (MS/MS).

Il campione, in uscita dal RP-HPLC, giunge all'interno della sorgente di ionizzazione con il compito di ionizzare gli analiti e di costituire un'interfaccia in grado di trasmettere gli ioni all'analizzatore senza perturbarne il vuoto (Figura 7).

Il lavoro svolto è stato condotto con l'utilizzo della metodica ESI. I peptidi, che derivano dal sistema cromatografico, operante in fase liquida ad alte pressioni, vengono nebulizzati formando ioni a carica multipla compatibile con la spettrometria di massa che opera in fase gassosa e in condizione di vuoto.

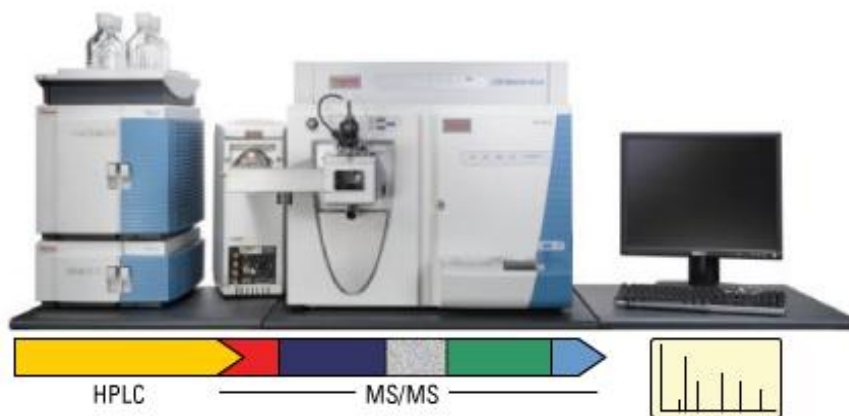


Figura 7. Dall'HPLC all'analisi degli spettri di massa.

L'Orbitrap ha il vantaggio di accoppiare il primo analizzatore (LTQ) con un secondo analizzatore in modo da ottenere uno spettro di massa dei frammenti peptidici più accurato (Figura 8). La spettrometria di massa che utilizza l'Orbitrap è chiamata spettrometria di massa tandem (MS/MS) poiché l'analisi della miscela avviene in due stadi: il primo analizzatore permette di isolare uno ione avente un determinato rapporto m/z definito ione "genitore" o "precursore", sottoporlo ad ulteriore frammentazione e, gli ioni "figli" o "prodotto" risultanti da questa frammentazione, verranno analizzati in un secondo stadio di analisi di massa.

Gli spettri di frammentazione si possono far risalire a frammentazioni statistiche del legame peptidico, con la conseguente generazione di due serie di ioni che ritengono la carica o sulla parte N-terminale (ioni di tipo b) o su quella C-terminale (ioni di tipo y). I dati sia relativi allo ione “genitore” che agli ioni “figli” vengono analizzati attraverso particolari software che applicano algoritmi deputati a risalire alla precisa sequenza amminoacidica di un polipeptide presente in una complessa miscela di proteine.

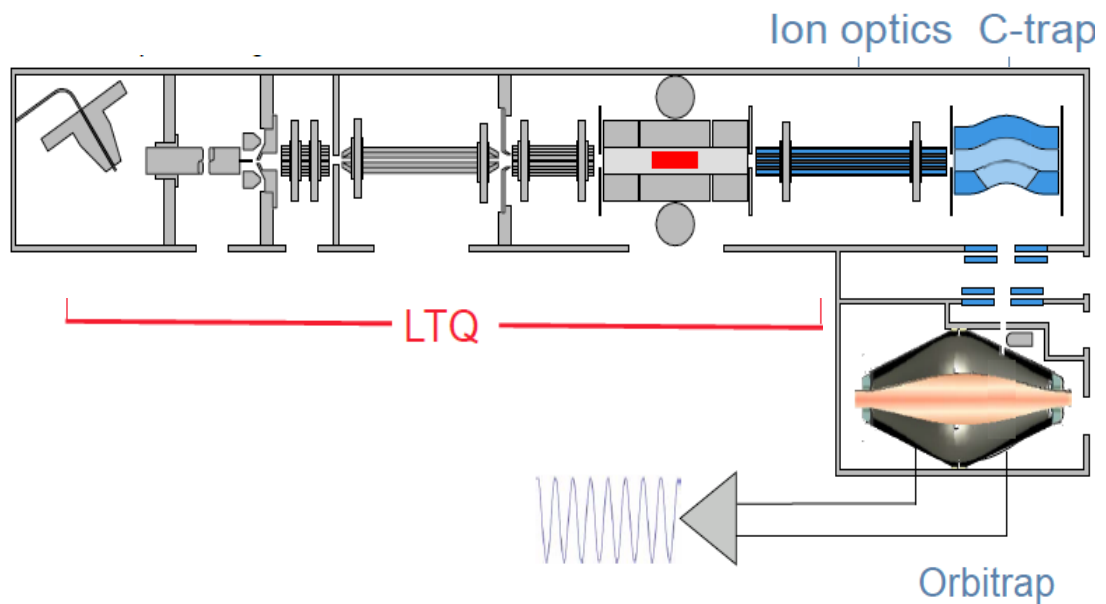


Figura 8. Componenti di base che costituiscono LTQ-Orbitrap.

CAPITOLO 4

4.1 Materiali e metodi.

4.1.1. Modello animale.

Lo studio è stato condotto su 9 topi maschi (M), appartenenti al ceppo C57BL/6J, mantenuti in condizioni standard di stabulazione che prevedono: alternanza di luce/buio ogni 12 ore, temperatura costante di 22-24°C, libero accesso a cibo e acqua. I topi, a partire dalla quarta settimana di età, sono stati suddivisi in 3 gruppi così composti: 3 M (I° gruppo) alimentati per 12 settimane con una dieta iperlipidica (High-Fat Diet; HFD, Charles River laboratories Italia Srl, Lecco) contenente 23% di proteine, 27% di carboidrati e 34% di grassi, con il 60% di calorie derivanti dai grassi (5,1kcal/g).

Tali animali sono denominati DIO (Diet Induced Obesity) poiché, a partire dalla decima settimana di regime alimentare iperlipidico, sviluppano obesità, accompagnata da iperglicemia, ipercolesterolemia ed ipertensione.

Il II° gruppo risulta costituito da 3 M alimentati anch'essi per 12 settimane con dieta iperglicidica (Hight-GI diet; Charles River laboratories Italia Srl, Lecco) contenente 16,8% di proteine, 74,3% di carboidrati e 4,8% di grassi, con il 60% di calorie derivanti dai glucidi (4,7 kcal/g) (214-216).

Il III° gruppo definito gruppo controllo, é costituito da 3 M alimentati per 12 settimane con dieta standard, costituita dal 17,7% di proteine, 60,1% di carboidrati e il 7,2 % di grassi, con un apporto calorico di 3,8 Kcal/g (Charles River laboratories Italia Srl, Lecco).

Durante le 12 settimane di alimentazione speciale, sono state periodicamente monitorate e paragonate tra i differenti gruppi di animali, le variazioni del peso corporeo e la quantità di cibo assunto quotidianamente (Food Intake), quest'ultimo valutato attraverso la differenza del peso del cibo nelle 24 ore.

4.1.2. Prelievo e trattamento del campione.

Al termine dei 4 mesi di trattamento si è proceduto al sacrificio degli animali avvenuto per dislocazione cervicale, con successivo rapido prelievo di sangue, attraverso puntura intracardiaca, e rapida asportazione di cervello.

Il sangue, raccolto all'interno di tubi eppendorf contenenti EDTA (1ml/mg), è stato centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti. Il plasma ottenuto è stato recuperato e congelato a -80 °C.

Il cervello intero dopo esser stato pesato, è stato conservato in apposite eppendorf sterili e posto in congelatore a -80°C, fino alle successive analisi biomolecolari.

4.1.3. Polverizzazione e omogenizzazione del tessuto cerebrale.

Per la polverizzazione del tessuto cerebrale si è sviluppato un protocollo (riportato di seguito) che richiede di lavorare costantemente in condizioni fredde, attraverso l'uso di ghiaccio secco ed azoto liquido, per preservare l'integrità del campione stesso.

Questa tecnica prevede l'utilizzo di un Dismembratore che si serve di singole palle metalliche poste all'interno di un cilindro in cui viene inserito il campione.

Il protocollo utilizzato consiste in:

1. Prendere il tessuto cerebrale congelato e inserirlo all'interno della cartuccia contenente la biglia (posta precedentemente in ghiaccio secco). Avvolgere velocemente la cartuccia con un foglio di carta alluminio e porre all'interno del contenitore di azoto liquido per 15 secondi.
2. Prendere la cartuccia, rimuovere il foglio di alluminio e porla al Micro-Dismembratore II (B.Braun, Germany) che provvederà ad agitare, in modo vigoroso, la cartuccia per 30 secondi. Una volta finita l'agitazione si riveste la cartuccia con un nuovo foglio di alluminio e si introduce per la seconda volta

all'interno del contenitore di azoto liquido per altri 15 secondi. Ripetere questo passaggio per 2 volte per tutti i campioni.

3. Terminata la procedura di agitazione, si dispone in ghiaccio secco la cartuccia contenente il tessuto polverizzato che sarà suddiviso, aliquotato e pesato in apposite eppendorf sterili da 1,5 ml.
4. Una volta che i campioni sono stati raccolti nelle eppendorf, vengono subito posti in freezer ad una temperatura di -20°C fino al momento del loro utilizzo.

Dopo la polverizzazione del tessuto si procede con l'omogeneizzazione dello stesso.

La metodica di omogeneizzazione prevede:

1. Aliquotare nell'eppendorf, con il nostro campione di interesse, una quantità 10 volte superiore rispetto al peso secco del cervello polverizzato di una soluzione di Sodio Dodecil Solfato (SDS) al 2%, più una quantità pari allo 0,05% di inibitori delle proteasi e fosfatasi.
2. Pipettare su e giù delicatamente per due volte con una siringa (in ghiaccio), in modo da omogeneizzare il campione con la soluzione.
3. Porre l'eppendorf al Thermo-Mixer per 10 minuti a 70°C .
4. Centrifugare a 16000 rpm per 1h nella camera fredda a 4°C .

Finita la centrifugazione si acquisisce il surnatante e si procede con la quantificazione delle proteine.

4.1.4. Quantificazione delle proteine.

La quantificazione delle proteine viene effettuata utilizzando il Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA).

Il metodo di quantificazione Lowry è un ottimo approccio per la quantificazione delle proteine solubili grazie alla sua sensibilità, semplicità e precisione. La procedura è basata sulla modificazione di Peterson del metodo Micro Lowry e utilizza l'SDS,

incluso nel reagente Lowry, per facilitare la dissoluzione delle lipoproteine (217). Tale tecnica utilizza anche una soluzione di Deossicolato (DOC) allo 0,15% ed una soluzione di acido Tricloroacetico (TCA) con la capacità di eliminare tutti i possibili prodotti chimici come Tris, solfato di ammonio, EDTA, saccarosio, citrato ed altre sostanze che possono interferire con il reagente Lowry.

Il metodo di Lowry punta a determinare la quantità presente di una proteina in una soluzione attraverso l'uso del Biureto (composto chimico di colore azzurro risultante dalla reazione di idrossido di sodio, tartrato sodico potassico e solfato di rame). La reazione porterà a una colorazione viola della nostra soluzione. L'intensità della colorazione dipende dalla concentrazione delle proteine contenute nella soluzione.

I reagenti del kit di quantificazione sono:

- Reagente Lowry.
- 0,15% Deossicolato (DOC), 1,5 mg/ml della soluzione acquosa di sodio deossicolato.
- Acido Tricloroacetico (TCA), 72% (w/v) della soluzione acquosa di acido tricloroacetico.
- Reagente fenolico Folin & Ciocalteu.
- Proteina standard BSA.

Protocollo di quantificazione:

1. Preparare le provette, opportunamente etichettate, con lo standard BSA in duplicato (volume finale 100 µl) per creare una curva standard di concentrazione crescente di BSA (20-80 µg).
2. Preparare le provette, opportunamente etichettate, con i campioni da quantificare, in duplicato (volume finale 100 µl).

3. Aggiungere 10 μl di soluzione DOC alle provette, agitare ed incubare 10 minuti.
4. Aggiungere 10 μl di soluzione TCA alle provette e vortexare.
5. Centrifugare a 13000 rpm per 10 minuti.
6. Rimuovere il surnatante.
7. Dissolvere il pellet con 100 μl di soluzione Lowry e 100 μl di H_2O .
8. Incubare 20 minuti.
9. Aggiungere 50 μl di reagente fenolico Folin & Ciocalteu e vortexare.
10. Incubare i campioni per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio.
11. Trasferire 200 μl della soluzione delle provette nella piastra per micro titolazioni e misurare l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 650 nm.

4.1.5 SDS-PAGE e digestione triptica.

L'elettroforesi monodimensionale è stata utilizzata per la separazione delle proteine contenute nell'omogenato del tessuto cerebrale. Sono stati utilizzati gel pre-cast della Bio-Rad ad una concentrazione di poliacrilamide del 12%.

I campioni da analizzare, precedentemente quantificati, vengono aliquotati con un'appropriata quantità di Laemmli buffer (LB) e β -mercaptoetanololo in un rapporto di 1:2 e riscaldati a 95°C per 5 minuti in Thermomixer. Il gel precast viene introdotto nella strumentazione usata per elettroforesi verticale della Bio-Rad contenente all'interno il running buffer (acqua milliQ q.b., 0,025 M di Tris base, 0,15 M di glicina e 0,1% di SDS). 1000 μg di ogni campione vengono caricati nei pozzetti del gel in duplicato. Per ciascun gel oltre ai campioni viene caricato il marker (ColorBurst Electrophoresis 8-220 kDa, Sigma-Aldrich) con la funzione di riferimento per la determinazione del peso molecolare delle specie proteiche contenute nelle bande elettroforetiche.

La differenza di potenziale applicata agli elettrodi è di 200 V e ciascun gel è stato corso per circa 40 minuti. Dopo la corsa elettroforetica si procede con l'apertura del precast

gel e si dispone il gel in un contenitore contenente acqua milliQ per pulire dalla soluzione di running buffer. Si effettuano tre lavaggi del gel da 10 minuti ciascuno con acqua milliQ e successivamente si procede con la colorazione per evidenziare le bande elettroforetiche. I gel vengono incubati con il colorante Gel Code Blue (Thermo Fisher, USA) per circa 30 minuti. Tale procedimento permette al reagente di legarsi con le proteine e di renderle visibili dopo decolorazione e risciacquo con acqua distillata.

Completata la separazione, si prosegue con il taglio delle bande elettroforetiche dal gel per effettuare la decolorazione delle stesse e la successiva digestione delle proteine contenute al loro interno. Il protocollo di digestione consente di ottenere una miscela di peptidi che verrà poi analizzata tramite spettrometria di massa. Protocollo di digestione in gel:

1. Tagliare le bande proteiche di nostro interesse con un bisturi e successivamente ognuna di esse è suddivisa in piccoli pezzi di 1 mm³ e poste all'interno delle rispettive eppendorf da 1,5 ml.
2. Effettuare 3 lavaggi decoloranti di 10 minuti ciascuno, in agitazione al thermomix a temperatura ambiente, aliquotando nelle eppendorf 100 µl di una soluzione decolorante costituita da 50% ACN / 25 mM di Ammonio Bicarbonato (AMBIC).

(Se la decolorazione non è del tutto rimossa si procede con la rimozione della soluzione di lavaggio e incubare i pezzi di gel con 100 µl di ACN 100% per 10 minuti. Dopo l'incubazione si reidratano con 100 µl di AMBIC 100 mM per 10 minuti e si effettua una successiva incubazione con ACN 100% per altri 10 minuti).

3. Effettuata la decolorazione, rimuovere la soluzione e seccare il gel per 10 minuti nello Speed-vac.
4. Aliquotare all'interno delle eppendorf 30 μ l di DTT 10 mM in 100 mM di AMBIC ed incubare per 1h a 55°C. La funzione del DTT è di rompere i ponti disolfuro tra i residui di cisteina.
5. Assicurarsi di aver rimosso il DTT prima di procedere.
6. Dispensare all'interno delle eppendorf 30 μ l di IAA 55 mM in 100 mM di AMBIC ed incubare per 45 minuti al buio a temperatura ambiente. La funzione dell'IAA è di legare il gruppo tiolico delle cisteine in modo da evitare il riformarsi dei ponti disolfuro.
7. Assicurarsi di aver rimosso la IAA prima di procedere.
8. Effettuare i lavaggi alternando 10 minuti di incubazione con AMBIC (100 mM) con 10 minuti di incubazione con ACN nel thermomixer a temperatura ambiente.
9. Ripetere 3 volte.
10. Portare a secco il gel nello Speed-vac per 10 minuti.
11. Porre le eppendorf in ghiaccio.
12. Aggiungere l'adeguata quantità di tripsina in rapporto 50:1 (proteina/tripsina).
13. Lasciare le eppendorf in ghiaccio per 45 minuti in modo che i pezzi di gel si reidratino e l'enzima penetri bene al loro interno.
14. Procedere con l'incubazione per tutta la notte dei campioni ad una temperatura di 37°C, per attivare l'enzima, per un tempo non superiore a 15 ore.
15. Dopo l'incubazione, si procede con l'estrazione dei peptidi digeriti aliquotando nei campioni 30 μ l di una soluzione costituita dal 75% di ACN e 5% di FA e porre le eppendorf in agitazione.

L'acido formico serve ad arrestare la digestione da parte dell'enzima mentre l'acetonitrile permette la fuoriuscita dei peptidi dal gel.

16. Recuperare la soluzione di estrazione, contenente i peptidi di interesse, e conservare.
17. Essiccare la soluzione contenente i peptidi in Speed-vac per 1h.
18. Risospendere i peptidi essiccati e concentrati in 10 μ l di una soluzione 0,1% di FA.

Una volta estratti i peptidi, tramite "in-gel digestion", si procede con l'arricchimento dei fosfo-peptidi. Questa metodica prevede l'uso di biglie magnetiche (TiO_2 Mag Sepharose, GE Healthcare) che legano specificatamente i peptidi fosforilati in modo da isolarli dalla miscela peptidica. Il TiO_2 , possedendo una carica positiva, si lega specificatamente ai gruppi fosforici, carichi negativamente, di serina, tirosina e treonina.

La procedura prevede:

1. Aggiungere 40 μ l di Binding buffer nell'eppendorf con i 10 μ l dei nostri peptidi estratti.
2. Aggiungere 50 μ l di Medium slurry (contenente 10 μ l di biglie) in nuove eppendorf etichettate per i rispettivi campioni e poste all'interno di un magnete.
3. Rimuovere il liquido.
4. Aggiungere 500 μ l di Binding buffer alle eppendorf contenenti le biglie.
5. Agitare le eppendorf, porle nel magnete e rimuovere il liquido.
6. Aggiungere alle rispettive eppendorf, contenenti le biglie, i 50 μ l dei nostri campioni precedentemente preparati (passaggio n° 1).
7. Agitare le eppendorf ed incubare per 30 minuti all'Eppendorf thermomix a 800 rpm.

8. Rimuovere il liquido e conservare (*flow-through*, contenente i peptidi non fosforilati).
9. Aggiungere alle eppendorf con le sole biglie 500 µl di Binding buffer.
10. Agitare le eppendorf, porle nel magnete e rimuovere il liquido.
11. Aggiungere alle eppendorf con le sole biglie 500 µl di Wash buffer.
12. Agitare le eppendorf, porle nel magnete e rimuovere il liquido.
13. Ripetere gli ultimi 4 passaggi (passaggi n° 9 - 12).
14. Eluire i nostri peptidi di interesse (fosfopeptidi), adsorbiti alle biglie, aggiungendo 50 µl di Elution buffer e incubare per 5 minuti al vortex.
15. Recuperare la soluzione di eluizione contenente i peptidi.
16. Ripetere gli ultimi 2 passaggi (passaggi n° 14 e 15).
17. Essiccare sottovuoto i fosfopeptidi tramite l'utilizzo dello Speed-vac per 1h.
18. Risospendere i fosfopeptidi essiccati e concentrati in 8 µl di una soluzione 0,1% di FA.
19. Aliquotare nelle apposite fiale 5 µl della soluzione precedentemente preparata (passaggio n° 18) per iniettare il campione nello spettrometro di massa.

4.1.6 Acquisizione ed arricchimento dei glico-peptidi.

L'estrazione dei peptidi glicosilati segue una metodica complessa che può essere divisa in tre moduli. A differenza della metodica utilizzata per la fosforilazione, le proteine non sono state corse su gel di poliacrilammide bensì si procede con una digestione in soluzione, per ottenere una maggiore quantità di proteine necessarie affinché l'estrazione dei peptidi glicosilati sia efficace.

Per questa procedura sono necessari 50 mg di tessuto in modo da ottenere circa 5 mg di proteine, quantità indispensabile per effettuare tale analisi proteomica.

Il primo modulo ha come obiettivo l'omogenizzazione e l'estrazione delle proteine dal campione e la loro successiva digestione in peptidi. Il protocollo prevede:

1. Prendere il tessuto cerebrale, precedentemente polverizzato, ed aggiungere 500 μ l di *lysis buffer* composto dal 50% di Trifluoroethanol (TFE) e dal 50% di Tampone fosfato salino (PBS).
2. Aggiungere alla soluzione di lisi il RapiGest all'1%, un reagente che aiuta la solubilizzazione delle proteine rendendole più suscettibili alla successiva digestione enzimatica tramite PNGase F.
3. Centrifugare il lisato a 2000 rpm per 30 minuti a 4°C.
4. Incubare il campione al Thermo-Mixer in agitazione per 2 ore a 60°C.
5. Centrifugare il campione a 2000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e successivamente trasferire il surnatante in nuove eppendorf sterili da 1,5 ml.
6. Acquisito il campione si procede con la quantificazione delle proteine utilizzando il Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) precedentemente descritto.

In base ai risultati della quantificazione delle proteine si calcola la quantità di campione da utilizzare e si procede alla riduzione e all'alchilazione delle proteine in soluzione mediante l'uso, rispettivamente, del DTT e dell'IAA. In seguito si procede alla digestione enzimatica delle proteine mediante l'uso della tripsina.

7. Aliquotare all'interno dell'eppendorf 3,77 μ l di DTT 1 M in acqua MilliQ ed incubare per 30 minuti a 60°C in agitazione a 800 rpm. Controllare il pH della soluzione (pH 8).
8. Dispensare all'interno dell'eppendorf 40 μ l di IAA 0,5 M in acqua MilliQ ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Controllare il pH della soluzione (pH 8).

9. Aggiungere alla soluzione 51 μl di N-acetil-cisteina 0,5 M in acqua MilliQ ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Controllare il pH della soluzione (pH 8).
10. Aliquotare 844 μl di AMBIC 0,1 M nella fiala contenente 20 μg di tripsina.
11. Dispensare l'opportuna quantità di tripsina all'interno dell'epENDORF contenente il nostro campione e incubare a 37°C in agitazione per tutta la notte.

Dopo la digestione, si procede con l'acquisizione dei peptidi attraverso l'uso di cartucce C18 (Sep-Pak) contenenti al loro interno una resina che permette di adsorbire gli analiti dalla soluzione acquosa tramite un meccanismo a fase inversa. Le cartucce vengono posizionate nel Vacuum 24 manifold per le colonne Miniprep (Promega) collegato al vuoto che permette di aspirare e rimuovere le soluzioni introdotte.

12. Dispensare all'interno della cartuccia 2 ml di metanolo e rimuovere il *flow-through*.
13. Pulire la cartuccia con 2 ml di una soluzione composta da 80% di ACN e 0,1% di FA e rimuovere il *flow-through*.
14. Equilibrare la cartuccia con 6 ml (3 x 2 ml) di FA allo 0,1% e rimuovere il *flow-through*.
15. Acidificare la soluzione contenente i nostri peptidi con FA all'88% fino a raggiungere un pH 2/3. Il pH acido permette il legame dei peptidi alla resina.
16. Caricare la nostra soluzione acidificata all'interno della cartuccia e rimuovere il *flow-through*.
17. Lavare la cartuccia con 2 ml di FA allo 0,1% e rimuovere il *flow-through*.
18. Eluire i peptidi adsorbiti alla resina con 2 ml di una soluzione composta da FA allo 0,1% e ACN al 50% ed acquisire il *flow-through* dividendolo in due nuove eppENDORF sterili da 1,5 ml.

19. Concentrare il campione, senza portarlo completamente a secco, allo Speed-vac fino al raggiungimento di un volume pari a circa 100 μ l totali.

Il secondo modulo della metodica prevede le fasi di ossidazione e di accoppiamento dei peptidi.

20. Diluire il campione con buffer di ossidazione (costituito da sodio acetato 20 mM e cloruro di sodio 100 mM, pH 5) fino a raggiungere un volume finale di 200 μ l.

21. Dispensare all'interno dell'ependorf 20 μ l di sodio meta-periodato 80 mM e controllare il pH della soluzione (pH 4.5/5).

22. Incubare il campione per 1 ora a 6°C al buio in agitazione al Thermo-Mixer a 600 rpm.

23. Dopo l'incubazione, effettuare l'acquisizione dei peptidi attraverso l'uso di cartucce C18 (Sep-Pak), metodica precedentemente descritta (passaggi n° 12 – 18).

24. Concentrare il campione, senza portarlo completamente a secco, allo Speed-vac fino al raggiungimento di un volume pari a circa 400 μ l totali.

25. Una volta estratti i peptidi si procede con l'arricchimento dei glico-peptidi. In questa fase viene utilizzato un supporto polimerico macroporoso (Affi-Prep Hz Hydrazide Support, della BIORAD), in cui sono legati covalentemente gruppi idrazide che legano specificatamente ed in modo covalente i carboidrati ossidati dei peptidi glicosilati in modo da isolarli dal resto della popolazione di peptidi ottenuti dalla digestione (218). La procedura prevede:

26. Dispensare, in un eppendorf da 2 ml, 500 μ l della soluzione contenente la resina di legame in isopropanolo. Centrifugare ed eliminare l'isopropanolo.

27. Lavare la resina con 1,5 ml di acqua MilliQ per 3 volte, centrifugando ogni volta per 30 secondi a 2000 rpm ed eliminando il surnatante.
28. Lavare la resina con 1,5 ml di buffer di accoppiamento (costituito da sodio acetato 100 mM e cloruro di sodio 1M, pH 4,5) per 3 volte, centrifugando ogni volta per 30 secondi a 2000 rpm ed eliminando il surnatante.
29. Risospendere la resina con 400 µl di buffer di accoppiamento e successivamente aggiungere il nostro campione precedentemente concentrato (passaggio n° 24).
30. Incubare la soluzione a temperatura ambiente in agitazione tutta la notte.
31. Dopo l'incubazione, si centrifuga per 30 secondi a 2000 rpm.
32. Rimuovere il surnatante e conservare (*flow-through*, che contiene i peptidi non glicosilati).
33. Lavare la resina con 500 µl di buffer di accoppiamento per 2 volte, centrifugando ogni volta per 30 secondi a 2000 rpm.
34. Rimuovere il surnatante, per ogni lavaggio, e conservare con il *flow-through*, proveniente dal passaggio n° 32.

Il terzo e ultimo modulo prevede il lavaggio della resina con diverse soluzioni e la successiva acquisizione dei peptidi glicosilati legati alla resina tramite l'utilizzo dell'enzima PNGase F.

La metodica prevede:

35. Ripetere i lavaggi per 3 volte ciascuno con i seguenti reagenti: cloruro di sodio 5 M in HPLC-H₂O, HPLC-H₂O, 80% ACN in HPLC- H₂O, metanolo puro. Tra ciascun passaggio centrifugare per 30 secondi a 2000 rpm ed eliminare il supernatante.

L'ultimo lavaggio della resina viene effettuato con AMBIC 100 mM in HPLC-H₂O per 5 volte, centrifugando ogni volta per 30 secondi a 2000 rpm ed eliminando il surnatante.

36. Aliquotare 5 µl della soluzione contenente l'enzima PNGase F (1U/µl) all'interno dell'eppendorf contenete la resina. L'enzima ha la funzione di staccare i peptidi glicosilati dalla resina.
37. Incubare a 37°C in incubatore tutte la notte.
38. Dopo l'incubazione, controllare il pH della soluzione (pH 8) e centrifugare per 30 secondi a 2000 rpm.
39. Rimuovere il surnatante e conservare in nuove eppendorf sterili da 1,5 ml (questa frazione contiene i peptidi glicosilati).
40. Lavare la resina con 500 µl di ACN all'80% per 2 volte, centrifugando ogni volta per 30 secondi a 2000 rpm.
41. Rimuovere il supernatante, per ogni lavaggio, e conservare con la soluzione del passaggio n° 39.
42. Concentrare il campione, senza portarlo completamente a secco, allo Speed-vac fino al raggiungimento di un volume pari a circa 100 µl totali.

A questo punto si procede con l'acquisizione dei peptidi attraverso l'uso di cartucce C18 (Sep-Pak) per effettuare la successiva analisi proteomica. La procedura prevede:

43. Dispensare all'interno della cartuccia 0,5 ml di metanolo e rimuovere il *flow-through*.
44. Pulire la cartuccia con 0,5 ml di una soluzione composta da 80% di ACN e 0,1% di FA e rimuovere il *flow-through*.
45. Equilibrare la cartuccia con 1 ml di FA allo 0,1% e rimuovere il *flow-through*.

46. Acidificare la soluzione contenente i nostri peptidi con FA all'88% fino a raggiungere un pH 2/3. Il pH acido permette il legame dei peptidi alla resina.
47. Caricare la nostra soluzione acidificata all'interno della cartuccia e rimuovere il *flow-through*.
48. Lavare la cartuccia con 0,5 ml di FA allo 0,1% e rimuovere il *flow-through*.
49. Eluire i peptidi adsorbiti alla resina con 0,5 ml di una soluzione composta da FA allo 0,1% e ACN al 50% ed acquisire il *flow-through* in una nuova eppendorf sterile da 1,5 ml.
50. Essiccare completamente i glicopeptidi allo Speed-vac.
51. Risospendere i glicopeptidi essiccati e concentrati in 10 µl di una soluzione 0,1% di FA e 3% di ACN.
52. Aliquotare nelle apposite fiale 6 µl della soluzione precedentemente preparata (passaggio n° 51) per iniettare il campione nello spettrometro di massa.

4.1.7 Acquisizione degli spettri.

Una volta corso il campione nello strumento i picchi cromatografici sono salvati sotto forma di RAW files, i quali vengono poi convertiti in mzML ed MGF files ed importati in Proteios.SE (Version 2.20.0-dev <http://www.proteios.org>) (219).

L'identificazione delle proteine é avvenuta utilizzando X-Tandem, per l'identificazione delle proteine confrontando le sequenze ottenute contro il database Uniprot *Mus Musculus* (mouse) (<http://www.uniprot.org>) (contenente 170.598 sequenze e 74.055.650 residui).

I parametri sono stati settati come segue:

Massa dei frammenti monoisotopici: 5 ppm

Massa dei parenti monoisotopici: 0,5 Da

Miss clivaggi permessi: 1

Modificazione fissa: carboamidometilazione delle cisteine

Modificazione variabile: fosforilazione delle serine, treonine e tirosine (STY)

Proteasi: tripsina

La lista dei peptidi identificati é stato esportato da Proteios ed i valori sono stati normalizzati, utilizzando Normalyzer (220). Il file excel con tali dati normalizzati é stato utilizzato per ulteriori analisi statistiche.

4.1.8 Analisi statistica.

I file con tutte le sequenze proteiche presenti in ogni campione e nelle diverse frazioni sono stati filtrati per fosforilazione e glicosilazione, per eliminare aspecifici. Le singole frazioni sono state combinate tra loro. L'organizzazione dei dati e le elaborazioni per l'analisi statistica sono state implementate con l'uso del software statistico R (R Development Core 2016).

Sono stati applicati algoritmi di dicotomizzazione che tengono conto dell'esito delle repliche all'interno del trattamento; sulla base di questi algoritmi le proteine sono state classificate in espresse o non espresse. I valori di espressione misurati sono stati sintetizzati da medie aritmetiche e la variabilità delle medie è stata calcolata tenendo conto dei diversi valori (intensità per ciascun campione acquisito dallo spettrometro di massa). Si è proceduto a confrontare in che modo il trattamento (lipidico e/o glucidico) avesse effetto sull'espressione delle proteine rispetto alla dieta controllo. Per paragonare le differenze in espressione di ciascuna proteina tra la dieta controllo e la dieta lipidica o glucidica, é stato utilizzato un T-test per la differenza di due medie, fissando una probabilità di errore di 0,05 ($p\text{-value} \leq 0,05$). Questo approccio ci ha permesso di ottenere risultati qualitativi per identificare quelle proteine che manifestano un diverso livello di espressione fra trattamenti e controllo in modo da poter delineare eventuali pathway di espressione proteica.

CAPITOLO 5

5.1 Risultati e discussione.

5.1.1. Modello murino.

Come modello animale, sono stati utilizzati 9 topi di sesso maschile appartenenti al ceppo C57BL/6J, mantenuti in condizioni standard di stabulazione e nutriti con un regime dietetico idoneo alla nostra ricerca.

Nello specifico, per questo lavoro sperimentale, i topi sono stati divisi in tre gruppi ed alimentati per 12 settimane con tre differenti diete a partire dalla quarta settimana di età.

Un gruppo ha seguito una dieta ad alto tenore lipidico (HFD), un altro gruppo ha condotto una dieta ad alto tenore glucidico (HGD), sviluppando già alla decima settimana una condizione di obesità, l'ultimo gruppo, infine, ha seguito una dieta standard (gruppo controllo) (Tabella 3).

Percentuale componenti macromolecolari	HFD	HGD	Controllo
Percentuale di Proteine	23%	16.8%	17.7%
Percentuale di Carboidrati	27%	74.3%	60.1%
Percentuale di Grassi	34%	4.8%	7.2%
Kcal/g	5,1	4,7	3,8

Tabella 3. Valori percentuali delle componenti macromolecolari delle diete.

Sono state monitorate e paragonate mensilmente le variazioni di parametri come: la glicemia a digiuno, il peso corporeo e la quantità di cibo assunto quotidianamente (*Food Intake*) (Figura 9).

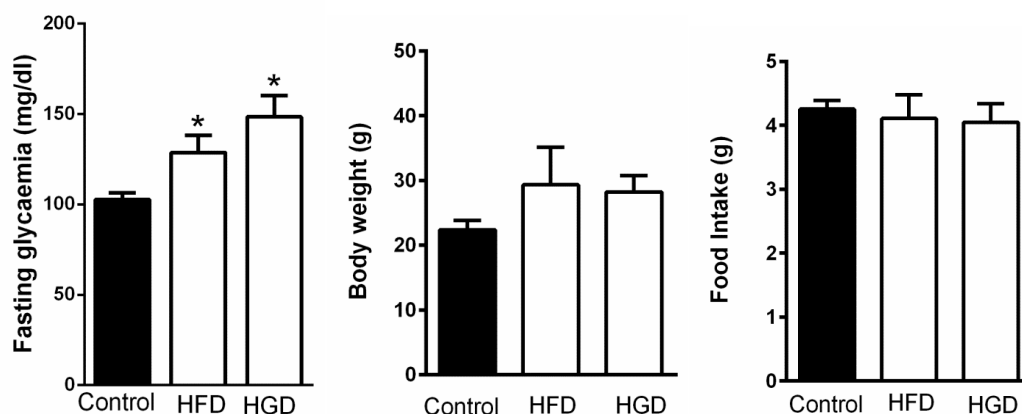


Figura 9. Variazione di glicemia a digiuno, *food intake* e peso corporeo tra i gruppi.

Dalla figura 9, si evince un aumento significativo della glicemia a digiuno tra i gruppi HFD e HGD. Invece, nessuna differenza significativa tra i gruppi si è riscontrata per quanto riguarda il *food intake* ed il peso corporeo, probabilmente perché il trattamento con le diverse diete è stato breve.

È probabile che una maggiore durata delle diete, avrebbe cagionato delle differenze significative non riscontrate tra i gruppi in esame, nonché la possibile insorgenza di insulino-resistenza.

5.1.2 Analisi dei fosfo- e glico-peptidi.

I campioni, prima dell'analisi, sono stati divisi in singole frazioni. Si riporta, in tabella 4 e 5, il quantitativo dei peptidi totali identificati, le componenti fosforilate e glicosilate e le relative percentuali per singole frazioni.

	Frazione 1	Frazione 2	Frazione 3
Numero totale di peptide	1156	1505	574
Numero totale di fosfo-peptidi	867	623	327
Percentuale di fosfo-peptidi	75%	41,4%	57%

Tabella 4. Numero di peptidi fosforilati.

	Frazione Controllo	Frazione HFD	Frazione HGD
Numero totale di peptide	193	145	148
Numero totale di glico-peptidi	90	84	13
Percentuale di glico-peptidi	46,6%	58%	8%

Tabella 5. Numero di peptidi glicosilati.

In tabella 4 e 5 si nota come, l'arricchimento delle proteine tramite TiO_2 ha portato a buone percentuali di peptidi fosforilati in maniera abbastanza omogenea tra le 3 frazioni. In tabella 5, per la glicosilazione, si è riscontrata una maggiore variabilità nell'arricchimento peptidico con una percentuale di peptidi glicosilati molto bassa nella frazione HGD. Questi risultati sono in linea con l'attività sperimentale considerando che la glico-proteomica è un campo in via di sviluppo e che ancora molti laboratori sono alla ricerca di tecniche più efficienti per tale arricchimento peptidico (221).

I dati ottenuti sono stati quindi interpretati e le singole frazioni sono state riunite per valutare la presenza di differenze significative nell'espressione dei fosfo-peptidi e glico-peptidi tra i diversi gruppi in esame (Controllo, HFD e HGD). Per valutare le possibili differenze tra le diete, la lista di peptidi è stata divisa in due gruppi: Controllo vs HFD e Controllo vs HGD e, per ogni gruppo creato, è stata calcolata la media, la deviazione standard ed eseguito un T test. La differenza tra le medie è considerata significativa per un $p \text{ value} \leq 0,05$. Analizzando in dettaglio questi primi risultati comparativi dei peptidi fosforilati e glicosilati, si evince che, per quanto riguarda i glico-peptidi, a causa della loro scarsità e della variabilità, tra i gruppi analizzati, non è stato possibile effettuare un'analisi statistica. In ogni caso le proteine glicosilate sono state tenute in considerazione per designare un possibile pathway, affiancate alle proteine fosforilate significative. Per i fosfo-peptidi, invece, a fronte dei 3235 peptidi totali acquisiti tramite

analisi statistica, si è ottenuto un totale di 1094 peptidi fosforilati i cui valori sono statisticamente significativi (tabella 6). Gli stessi, sono stati successivamente valutati con sistemi computerizzati di interazione proteina-proteina.

	Fosfo-peptidi significativi
Controllo HFD	605
Controllo HGD	489

Tabella 6. Numero di fosfo-peptidi significativi Controllo HFD e Controllo HGD

Come riportato dalla tabella 6, dei 1094 fosfo-peptidi significativi totali identificati, 605 fosfo-peptidi derivano specificatamente dal gruppo Controllo-HFD e 489 fosfo-peptidi dal gruppo Controllo-HGD che corrispondono rispettivamente a 283 e 227 specie proteiche, molte delle quali espresse da entrambi i gruppi.

5.1.3 GO Analysis.

Le proteine sono state successivamente classificate secondo la loro funzione molecolare, localizzazione cellulare e processo biologico, in accordo con la banca dati *Gene Ontology* (GO) per dare una descrizione delle caratteristiche delle proteine individuate.

Osservando la GO Analysis (Figura 10 e 11), è possibile mettere in evidenza le funzioni biologiche delle proteine in esame. Le proteine identificate risultano coinvolte principalmente in processi di regolazione delle attività cellulari e di legame a DNA, RNA e ulteriori proteine. In particolare è possibile distinguere proteine coinvolte principalmente in processi legati alla neurogenesi, alla modulazione della trasmissione sinaptica e alla comunicazione cellulare, in linea con la nostra ipotesi di studio. In base ai protocolli della tecnica che prevedono l'omogenizzazione di tutto il tessuto cerebrale

non possiamo entrare in dettaglio su specifiche localizzazioni, infatti l'analisi ha messo in evidenza proteine provenienti da vari comportamenti cellulari (citoplasma, membrana plasmatica cellulare e vescicolare). Le caratteristiche di queste proteine sono state osservate in entrambi i gruppi di studio (Ctrl-HFD e Ctrl-HGD), indicando che le due differenti diete, iper-lipidica ed iper-glucidica, non presentano differenze significative dal punto di vista della variazione di espressione proteica nel merito della fosforilazione.

Mentre si ha una variazione dell'espressione proteica tra le due diete e i controlli. Questo indica probabilmente una variazione a livello cerebrale di determinati circuiti, causata dall'obesità, indipendentemente da come tale condizione patologica viene raggiunta (dieta lipidica o dieta glucidica). Probabilmente i meccanismi che risiedono alla base della neuro-infiammazione e perdita neuronale sono indipendenti dal tipo di dieta ma dipendono solo dall'incremento di peso e dalle relative alterazioni metaboliche.

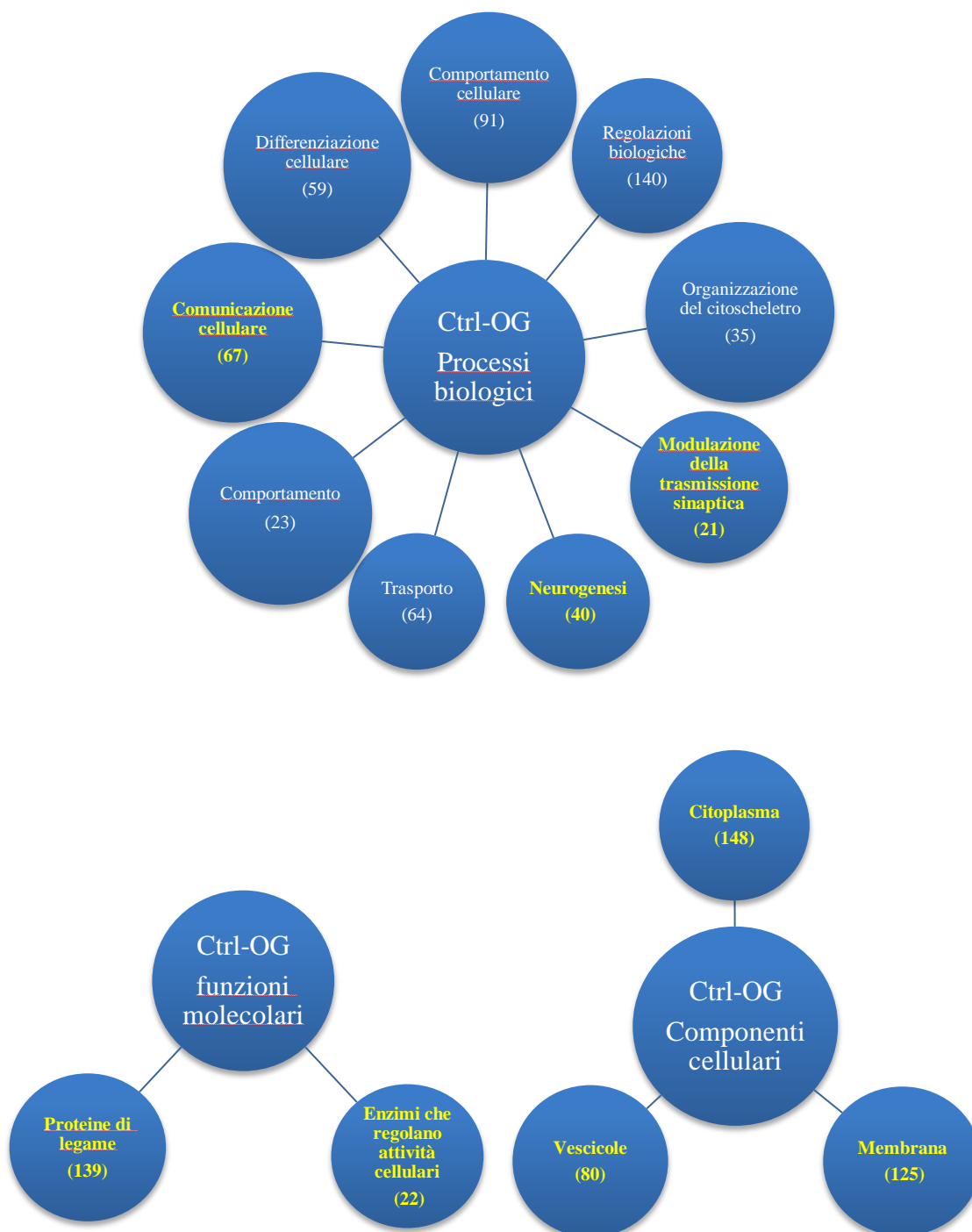


Figura 10. GO Analysis fosfo-peptidi gruppo Ctrl-OG riguardo i processi biologici, funzioni molecolari e componenti cellulari.

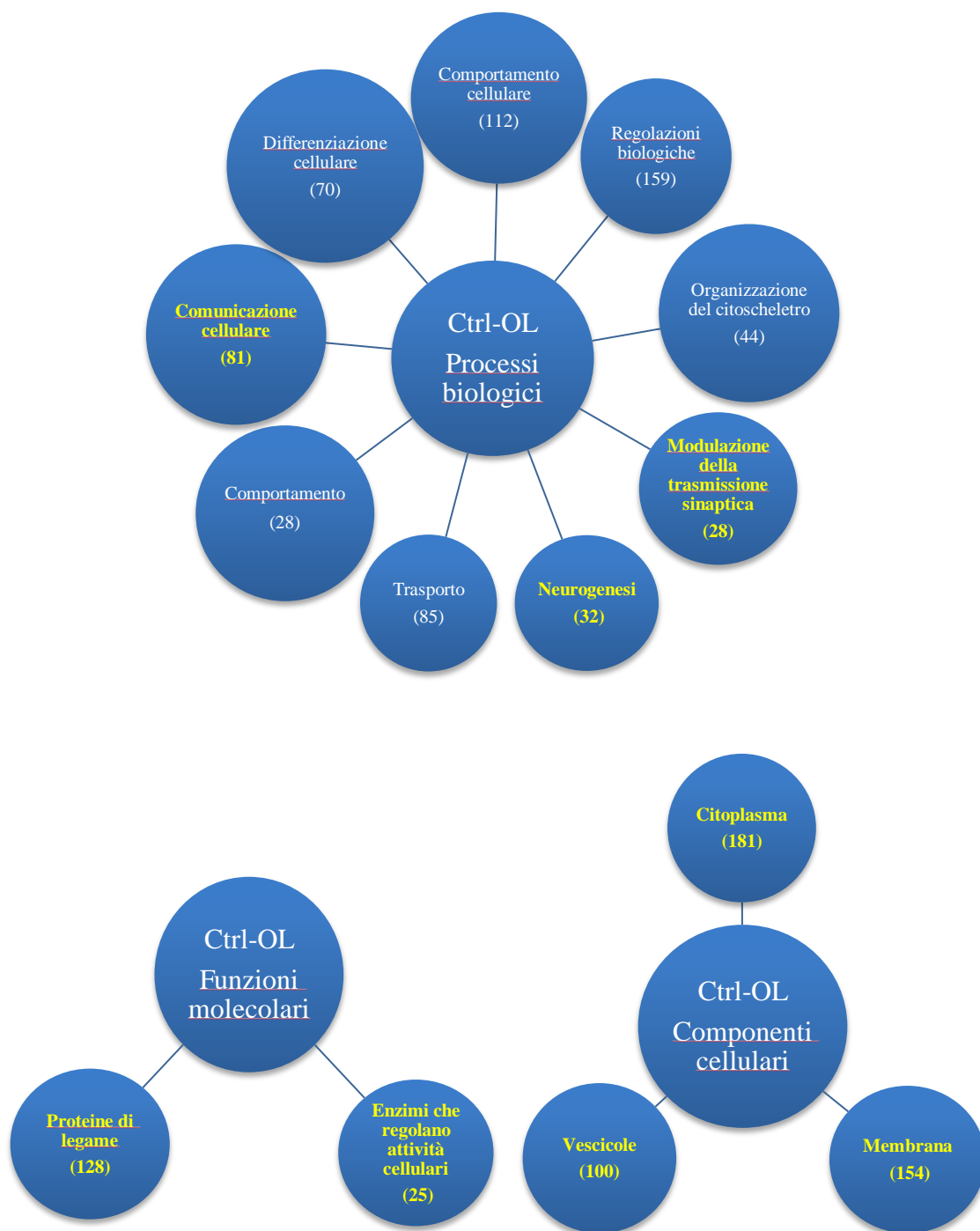


Figura 11. GO Analysis fosfo-peptidi gruppo Ctrl-OL riguardo i processi biologici, funzioni molecolari e componenti cellulari.

5.1.4 Obesità e alterazione del traffico vescicolare.

È ormai noto che l'obesità è un importante fattore di rischio per l'insorgenza di patologie che compromettono severamente lo stato di salute dell'uomo. L'obesità risulta essere una condizione patologica, che insieme ad altri fattori determinano la Sindrome Metabolica (SM).

Varie ricerche hanno messo in evidenza, negli ultimi anni, come l'obesità sia un importante fattore di rischio implicato nel determinare un precoce e rapido declino cognitivo (222-225).

I nostri risultati hanno rivelato la presenza di proteine legate alla neurodegenerazione, in particolar modo associate alla AD. È stato possibile identificare un incremento dell'espressione della proteina tau e del precursore della proteina APP in entrambe le diete (Grafici 1 e 2), in accordo con studi condotti su modelli murini che hanno evidenziato un aumento dei livelli di A β nei cervelli di topi resi obesi dalla dieta, sia in topi transgenici per l'Alzheimer sia in topi wilde-type (226). Questi risultati suggeriscono che l'obesità determina un'eccessiva produzione del frammento β -amiloide attraverso il processamento amilodogenico dell'APP.

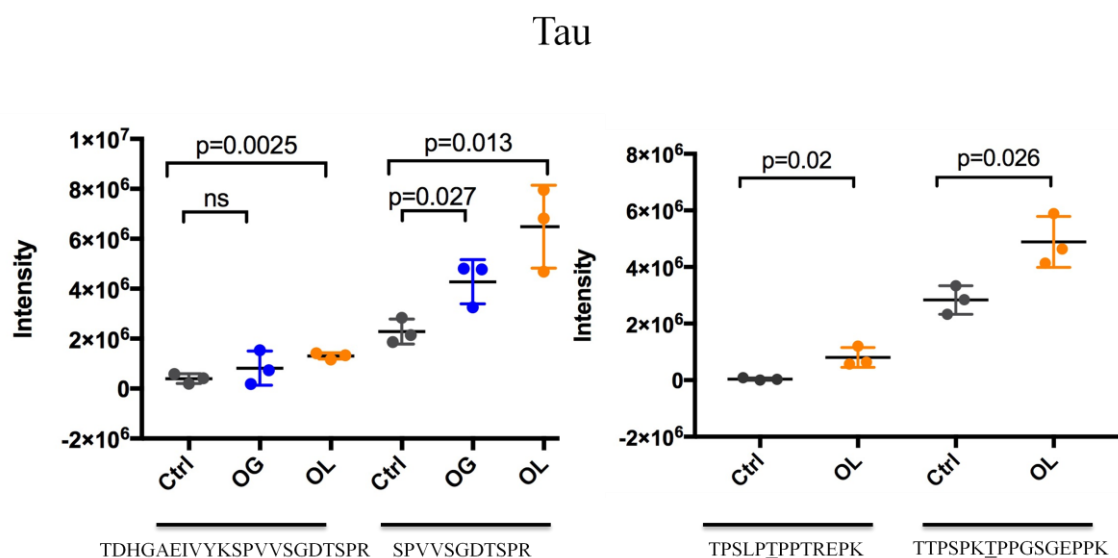


Grafico 1. Aumento dell'espressione della proteina Tau in entrambe le diete.

Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 1

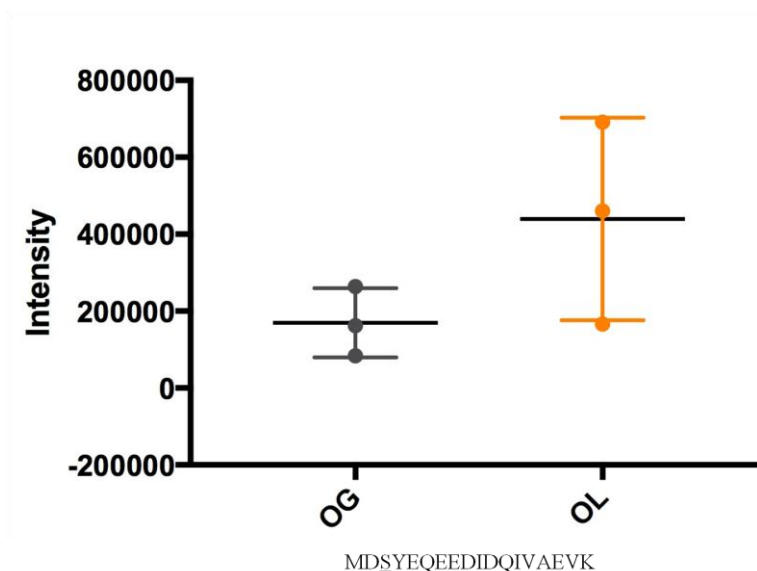


Grafico 2. Aumento dell'espressione della proteina Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 1 in entrambe le diete.

La formazione della proteina $A\beta$ causa molteplici effetti negativi sulla funzione ed integrità dei terminali sia pre- che post-sinaptici, attraverso vari fattori quali l'induzione dello stress ossidativo (227-230), alterato metabolismo del calcio e del glucosio (231, 232), alterazioni della funzione mitocondriale e del reticolo endoplasmatico. Inoltre, la proteina $A\beta$ ha effetti negativi sulla proteina tau, proteina importante per la stabilità dei microtubuli, causando deficit nel trasporto assonale e determinando la formazione di ammassi neurofibrillari e morte cellulare (233).

Le modificazioni nel trasporto assonale, giocano un ruolo fondamentale nella neurodegenerazione determinando variazioni nella quantità e nella localizzazione delle proteine sinaptiche con conseguente alterazione nel processo di riciclo delle vescicole stesse (234). Nell'AD, infatti, molte proteine che regolano il riciclo vescicolare mediato da clatrina sono ridotte, incluse anche altre proteine come la dinamina, AP-2 e AP-180. I nostri risultati, suggeriscono una riduzione d'espressione di alcune delle proteine implicate proprio nel processo di endocitosi mediato da clatrina (tabella 7). La

compromissione del riciclo delle vescicole può causare l'allargamento dei terminali assonici documentate in studi ultrastrutturali di AD e che potrebbe anche portare alla ridotta segnalazione del fattore neurotrofico (BDNF) che coinvolge l'endocitosi mediata dalla clatrina dei recettori attivati.

N.	Uniprot ID	Nome proteina		Espres.
1	P39053	Dynamin	Ctrl-OG	-
2	Q3UHQ0	AP-2 associated kinase	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
3	Q7TT20	Clathrin coat assembly protein AP180	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
4	Q8VD37	SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
5	Q80TZ3	DnaJ homolog subfamily C member 6	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
6	E9Q3I8	Intersectin-1	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
7	Q8CHC4	Synaptojanin	Ctrl-OL	+

Tabella 7. Proteine implicate nell'endocitosi mediata da clatrina.

5.1.5 *Obesità e aumento della sindrome metabolica.*

Nel corso della ricerca, si è cercato di studiare la connessione tra l'obesità e SNC, individuando come possibile collegamento l'ECS che, come evidenziato in numerosi studi scientifici, è un sistema biologico associato al controllo di diversi processi metabolici e soprattutto un importante "target" farmacologico per contrastare l'obesità (235-237) (Figura 12).

Il sistema Endocannabinoide ha suscitato il nostro interesse principalmente per i differenti meccanismi d'azione e le diverse funzioni che esercita.

Tra le principali funzioni cerebrali dell'ECS, ricordiamo la modulazione delle proprietà di gratificazione del cibo che agisce su aree mesolimbiche nel cervello e il controllo

dell'appetito e dell'introito di cibo che lavora in specifiche aree ipotalamiche. È interessante evidenziare che, l'ECS controlla diverse funzioni metaboliche, agendo sui tessuti periferici come gli adipociti, gli epatociti, il muscolo scheletrico e il pancreas endocrino. La rilevanza dell'ECS è maggiormente rafforzata dal fatto che, l'obesità viscerale sembra essere una condizione in cui si riscontra un'iper-attivazione patologica di tale sistema (238) che induce un eccessivo accumulo della massa grassa ed un conseguente incremento delle alterazioni metaboliche riscontrate negli individui obesi. Si attiva, in questo modo, un meccanismo a feedback positivo che perpetua un'azione di tipo oressigena che si traduce in un continuo aumento dell'introito calorico a discapito della spesa energetica, compromettendo sempre più lo stato di salute. L'eccessivo aumento ponderale, a sua volta, è associato a disfunzioni dei normali processi del tessuto adiposo che portano ad una secrezione anomala dei livelli di citochine derivati dall'attivazione del processo infiammatorio quali $TNF\alpha$ e IL-6. Inoltre, queste alterazioni possono contribuire ad un incremento dei livelli di acidi grassi liberi in circolo, che determinano un effetto citotossico sia locale che sistemico, che a lungo andare causano una diminuzione della risposta all'insulina nei tessuti bersaglio. Questo processo, quindi, influenza negativamente l'omeostasi del glucosio innescando la comparsa d'insulino-resistenza promuovendo così, tramite l'attivazione di chinasi quali JNK (C-Jun N-terminal Kinase), IKK (I kappa B kinase- β) e PKC (protein C kinase), la formazione del peptide $A\beta$ e fosforilazione di Tau, generando un circolo vizioso che conduce alla precoce insorgenza dell'AD.

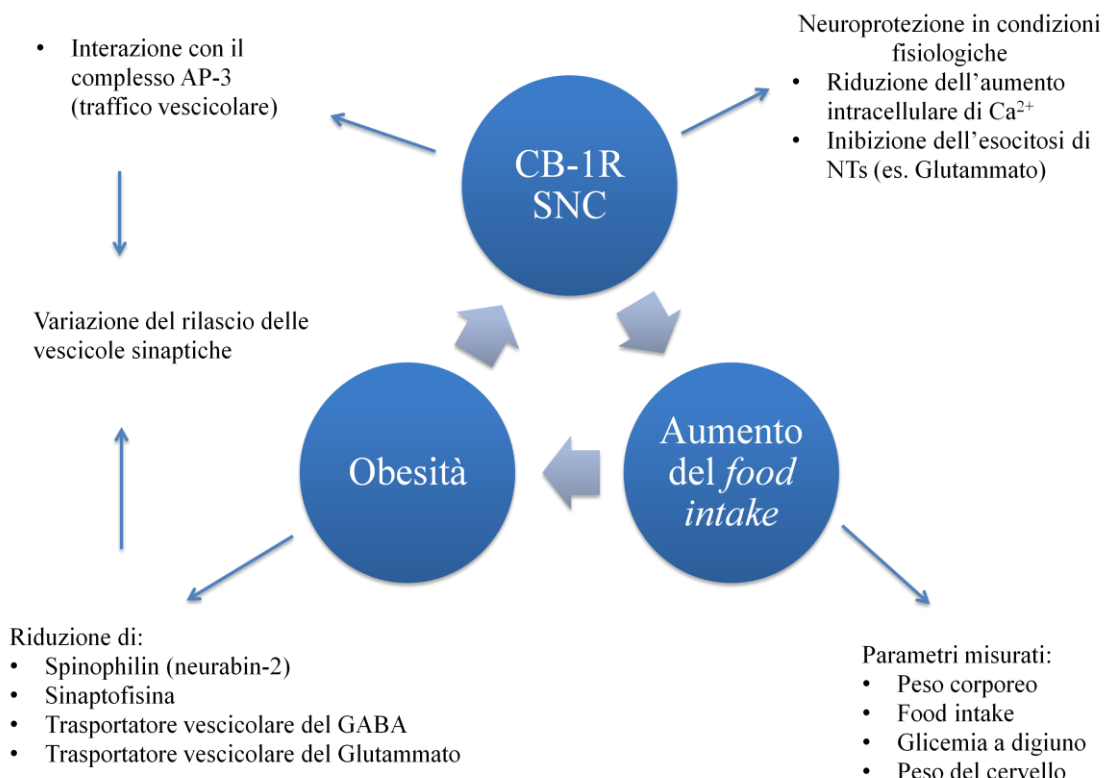


Figura 12. Schema ipotesi di studio.

Oltre alla modulazione dell'introito di cibo, è stato dimostrato che in condizioni fisiologiche, a livello cerebrale, l'ECS determina un'inibizione dell'adenilato ciclasi con conseguente riduzione dell'attività di cAMP e PKA, influenzando importanti eventi di segnalazione cellulare tra i quali la riduzione dell'aumento di Ca^{2+} intracellulare. Questo meccanismo, determina un'inibizione del rilascio di neurotrasmettitori generalmente di tipo inibenti (239) esercitando, così, un effetto neuro-protettivo (240). In condizioni di obesità, si ha un'iper-attivazione dell'ECS ed inoltre, si assiste ad un'ulteriore inibizione di determinate proteine legate al traffico vescicolare, tra cui la neurabin-2, la sinaptofisina, i trasportatori vescicolari del GABA e del glutammato (241). Tutti questi fattori, associati insieme, conducono ad un'alterazione dei processi fisiologici di trasporto cellulare, determinando variazioni nel rilascio delle vescicole sinaptiche. Da quanto detto, è possibile affermare che un punto comune tra l'obesità ed l'ECS è

l'alterazione del sistema vescicolare con una conseguente variazione dei livelli di neurotrasmettitori e alterazione degli scambi ionici inter- e intra-cellulari.

Da un totale di 510 proteine fosforilate identificate, la maggior parte espresse da entrambi i gruppi di studio, sono state selezionate 47 proteine (elencate in tabella 8) che corrispondono alle proteine implicate nel processo del trasporto vescicolare e rilascio dei neurotrasmettitori.

Durante lo studio svolto, non è stata riscontrata l'espressione del CB-1R, probabilmente persa nella manipolazione del campione nelle fasi di preparazione e/o durante l'analisi allo spettrometro. Infatti dati in letteratura riportano come l'estrazione di fosfo-peptidi con TiO₂ è in grado di rivelare solo il 5% del fosfo-proteoma. Questa risulta essere una grande limitazione ma ad oggi non sono presenti tecniche o strumenti in grado di determinare più di tale percentuale (242). In ogni caso siamo stati in grado di osservare una variazione nell'espressione di proteine legate all'ESC nel SNC.

Delle 47 proteine identificate, la maggior parte di quelle coinvolte nel traffico vescicolare, sono down-regolate evidenziando un'alterazione del processo di trasporto e di conseguenza una riduzione del rilascio dei neurotrasmettitori nella fessura sinaptica.

N.	Uniprot ID	Nome proteina		Espres.
1	Q9CYT6	Adenylyl cyclase-associated protein (Cap2)	Ctrl-OL	+
2	P05064	Aldolase A	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-/+
3	P05063	Aldolase C	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
4	Q7TQF7	Amphiphysin	Ctrl-OL	-
5	O08539	Amphiphysin II	Ctrl-OL	+
6	Q3UHJ0	AP-2 associated kinase	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
7	O54774	Ap3 complex	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-

8	Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+/-
9	P28652	CaM kinase II subunit beta	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
10	P11798	Camk2	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
11	P39053	Dynamin	Ctrl-OG	-
12	P39053	Dynamin-1	Ctrl-OG	-
13	Q8BZ98	Dynamin-3	Ctrl-OL	-
14	D3Z2M9	Dyneectin1	Ctrl-OG	-
15	Q8R1Q8	Dynein	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
16	Q8VD37	Endophilin-3-interacting protein	Ctrl-OL	-
17	P17182	Enolase-alpha	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
18	Q3TUZ9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Ctrl-OL	+
19	Q3TUZ9	GPDH	Ctrl-OL	+
20	A2A610	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms	Non espresso in Ctrl solo in OG e OL	
21	P11499	Heat shock protein HSP 90-beta	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
22	P16125	L-lactate dehydrogenase	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
23	P14873	Map-1	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
24	P10637	Map-tau	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
25	Q99104	Myosin-Va	Ctrl-OG	+
26	Q6PIE5	Na(+)/K(+) ATPase alpha-2 subunit	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
27	P06837	Neuromodulin	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
28	Q8VEM8	Phosphate carrier protein, mitochondrial	Ctrl-OL	-
29	Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	Ctrl-OL	-
30	Q9R0K7	Plasma membrane Ca ²⁺ transporting ATPase 2	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
31	P35486	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit α	Ctrl-OL	-
32	Q8BMG7	Rab3 GTPase-activating protein	Ctrl-OG	-
33	A0A0A6YVS6	Ras/Rap GTPase-activating protein SynGAP	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-

34	Q9ES97	Reticulon3	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
35	Q99P72	Reticulon4	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
36	Q99NE5	Rims1	Ctrl-OG	-
37	Q9EQZ7	Rims2	Ctrl-OL	-
38	O35609	Scamp3	Ctrl-OL	-
39	Q52KH2	Sep-05	Ctrl-OG	-
40	O55131	Sep-07	Ctrl-OL	-
41	Q61548	Snap91	Ctrl-OL e Ctrl-OG	-
42	O88935	Synapsin-1	Ctrl-OL	-
43	Q8CHC4	Synaptojanin	Ctrl-OL	+
44	O70439	Syntaxin 7	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
45	O35526	Syntaxin-1a	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
46	O08599	Syntaxin-binding protein1	Ctrl-OL	+
47	P17751	Triosephosphate isomerase	Ctrl-OL	-

Tabella 8. Elenco delle proteine correlate al traffico vescicolare.

Diversi studi, per di più, hanno mostrato l'interazione di CB-1R con il complesso AP-3, complesso coinvolto nel traffico dalla rete trans del Golgi ai lisosomi per determinarne la degradazione delle proteine (243-246). Infatti, il significativo aumento dell'espressione di CB-1R sulla membrana plasmatica è causato da una riduzione di AP-3, individuando in questo complesso un forte regolatore del traffico di CB-1R endogeno (247). I nostri risultati suggeriscono una down-regolazione di AP-3 in entrambe le diete, quindi possiamo ipotizzare che la riduzione di AP-3 determina un incremento dell'espressione del recettore CB-1R sulla membrana plasmatica in linea con gli studi trovati in letteratura.

5.1.6 *Obesità e alterazione dell'omeostasi del calcio.*

Come mostrata dalla tabella 9, quasi tutte le proteine riscontrate nel nostro esperimento e correlate al flusso degli ioni Ca^{2+} presentano un incremento della loro espressione, indicando che nei nostri modelli sperimentali resi obesi dalla dieta si assiste ad un'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} .

N.	Uniprot ID	Nome proteina		Espres.
1	P97445	Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
2	S4R1C4	Calcium-transporting ATPase	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
3	Q01097	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
4	Q9R0K7	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+
5	O55143	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	Ctrl-OL e Ctrl-OG	+

Tabella 9. Proteine correlate al trasporto del Ca^{2+} .

I nostri dati sono in accordo con le osservazioni effettuate su pazienti con AD che presentano elevate quantità di Ca^{2+} ed iper-attivazione di proteasi Ca^{2+} dipendenti e chinasi attivate dal Ca^{2+} (248). La produzione di $\text{A}\beta$ può determinare l'alterata regolazione di Ca^{2+} inducendo stress ossidativo che danneggia le pompe di membrana per il Ca^{2+} aumentando il flusso attraverso i canali voltaggio-dipendente ed i recettori ionotropici del glutammato. Altri risultati indicano che $\text{A}\beta$ può promuovere il flusso di Ca^{2+} attraverso la formazione di canali nelle membrane o attivando i recettori della superficie cellulare accoppiati al flusso di Ca^{2+} (249, 250).

5.1.7 *Obesità ed espressione glico-proteica.*

L'analisi delle proteine glicosilate ha messo in evidenza proteine coinvolte nella vescicolazione come la Synaptic vesicle glycoprotein 2A e la Synaptic vesicle

glycoprotein 2B, nel metabolismo del calcio come il Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1 e il Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1 e nel metabolismo dell'insulina come l'Insulin-like growth factor 1 receptor.

Inoltre proteine come l'Haptoglobin, l'IgLON family member 5 e la Neuronal pentraxin 1 coinvolte nell'infiammazione, suggeriscono che l'obesità è una condizione associata all'attivazione di uno stato infiammatorio in linea con studi presenti in letteratura (251) (Tabella 10).

Sebbene l'analisi delle proteine tramite la metodica della glico-proteomica non abbia permesso un'analisi statistica a causa della loro esiguità e della loro variabilità, la loro presenza rafforza l'ipotesi creata analizzando i dati della fosfo-proteomica.

N.	Uniprot ID	Nome proteina		Espres.
1	P35438	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1	Ctrl-OL e Ctrl-OG	NS
2	E9Q1X8	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1	Ctrl-OL e Ctrl-OG	NS
3	Q61646	Haptoglobin	Ctrl-OL e Ctrl-OG	NS
4	Q8HW98	IgLON family member 5	Ctrl-OL e Ctrl-OG	NS
5	Q3U1L4	Insulin-like growth factor 1 receptor	Ctrl-OL e Ctrl-OG	NS
6	Q62443	Neuronal pentraxin 1	Ctrl-OL e Ctrl-OG	NS
7	Q9JIS5	Synaptic vesicle glycoprotein 2A	Ctrl-OL e Ctrl-OG	NS
8	Q8BG39	Synaptic vesicle glycoprotein 2B	Ctrl-OL e Ctrl-OG	NS

Tabella 10. Proteine glicosilate espresse in entrambe le diete non statisticamente significative.

CAPITOLO 6

6.1 Conclusioni.

Nonostante l'approccio genomico-funzionale basato sullo studio del DNA e dell'RNA siano ampiamente utilizzate e di enorme importanza scientifica, queste non danno informazioni importanti per quanto riguarda i livelli di espressione proteica, delle isoforme che possono essere prodotte da un medesimo gene e/o la presenza di determinate modificazioni post-traduzionali. Lo studio della caratterizzazione, dell'espressione e dell'identificazione delle proteine è tanto difficoltoso quanto essenziale per aprire nuove frontiere sulla conoscenza dei meccanismi cellulari. Nonostante il numero delle proteine espresse sia notevolmente superiore al numero dei geni codificanti le stesse proteine, (in seguito a splicing alternativo, modificazioni post-traduzionali ecc.), è importante evidenziare che non sono i grandi numeri a rendere la proteomica una scienza complessa, ma la difficoltà sostanziale è quella di assicurare l'identificazione delle proteine che si presentano a concentrazioni molto basse e che potrebbero essere quelle biologicamente più rilevanti.

Il nostro intento è stato studiare a livello cerebrale, in modelli murini resi obesi con due differenti diete, la relazione tra nutrizione e neurodegenerazione andando a valutare nel dettaglio, tramite analisi fosfo- e glico-proteomica, la differente espressione delle proteine fosforilate e glicosilate tra dieta convenzionale, dieta iperlipidica e dieta iperglicemica. In questo modo si è cercato di valutare le alterazioni di differenti pathway metabolici e/o di diversi processi cellulari che conducono a neurodegenerazione.

Considerando i bassi livelli di espressione della maggior parte delle proteine regolate dalla fosforilazione, risulta fondamentale l'ottimizzazione di metodiche che permettono l'acquisizione specifica di tali proteine.

I risultati ottenuti hanno suggerito che nel sistema murino le due diete iper-lipidica e iper-glucidica hanno lo stesso peso e rilevanza dal punto di vista della fosfo-proteomica e glico-proteomica.

In particolare, il sistema della vescicolazione sembra essere regolato negativamente alla luce della minore espressione delle proteine identificate; tra queste si evidenziano la Amphiphysin, AP-2 associated kinase, Clathrin coat assembly protein AP180, SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1, DnaJ homolog subfamily C member 6, Intersectin-1, Camk2, Rab3 GTPase-activating protein, Dynamin, Dynamin-1, Dynamin-3, Dynectin1, Rims1, Rims2, Scamp3, Sep-07, Snap91, Synapsin-1, proteine coinvolte sia nel processo di endocitosi che in quello di esocitosi.

Le modificazioni nel processo della vescicolazione sono rilevanti ai fini della possibile insorgenza del declino cognitivo.

Di contro i canali del calcio, sembrano essere regolati positivamente dall'espressione delle proteine come il Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1°, Calcium-transporting ATPase, Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2, Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 e Adenylyl cyclase-associated protein (Cap2).

Non potendo risalire alla quantità di calcio intracellulare, ipotizziamo che questo aumento d'espressione delle proteine coinvolte nel flusso degli ioni Ca^{2+} , sia un evento assolutamente normale in fisiologia che sta alla base della desensibilizzazione recettoriale come meccanismo compensatorio della ridotta secrezione vescicolare.

È stato inoltre riscontrato un incremento dell'espressione dell'Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 1 che potrebbe modulare il processamento del precursore della proteina β -amiloide. Non avendo identificato la proteina $A\beta$ ma avendo riscontrato un incremento dell'Amyloid beta A4 precursor protein-binding

family A member 1 è possibile ipotizzare, come confermato in letteratura, che il processamento amiloidogenico dell'APP nei modelli murini obesi, determina un aumento della proteina β -amiloide. Quest'ultima, a supporto dei risultati ottenuti, determina una riduzione dell'espressione delle proteine correlate al traffico vescicolare ed è anche causa dell'alterazione della proteina tau, proteina necessaria per la stabilizzazione dei microtubuli, che come osservato nei nostri risultati è up-regolata. $A\beta$, inoltre, promuove il flusso di Ca^{2+} attraverso vari meccanismi come la formazione di canali nelle membrane o attraverso l'attivazione di recettori della superficie cellulare accoppiati al flusso di Ca^{2+} , oppure, attraverso l'iper-attivazione di proteasi Ca^{2+} dipendenti e chinasi attivate dal Ca^{2+} come osservato in soggetti affetti da AD che presentano elevate quantità di Ca^{2+} . Queste osservazioni portano ad avvalorare i dati ottenuti sulla regolazione positiva dell'espressione proteica delle proteine associate alla regolazione del calcio.

Non è trascurabile, ulteriormente, il complesso AP-3, un complesso regolatore del traffico di CB-1R endogeno. Nel caso dell'obesità, come evidenziato in letteratura, si realizza un'iper-attivazione di CB-1R nel terminale presinaptico; l'attività svolta, seppur non individuando CB-1R, ha portato all'identificazione di AP-3, il quale down-regolato permette di ipotizzare la possibile iper-espressione di CB-1R che oltre a determinare un'alterazione del metabolismo energetico influenza negativamente la segnalazione cellulare mediata dal Ca^{2+} intracellulare. Tale evidenza supporta i nostri risultati associati ad una compromissione del trasporto vescicolare.

Le ipotesi di studio suggerite dall'analisi delle proteine fosforilate sono evidenziate anche dai dati ottenuti dall'analisi delle proteine glicosilate.

Insieme, tutti questi risultati sostengono la tesi sulla fondamentale importanza che l'obesità possiede a livello cerebrale e su come la dieta possa portare a un danneggiamento dei circuiti neuronali.

Dai risultati ottenuti è possibile riassumere come l'obesità comporti un'alterazione del metabolismo energetico. A causa di tale condizione si assiste a tutte le conseguenze indotte dall'eccesso della massa grassa con particolare attenzione alle modificazioni che coinvolgono i processi legati al traffico vescicolare. Queste alterazioni, indotte dalle complicanze dell'obesità, determinano la compromissione del trasporto asso-plasmatico che conduce alla perdita della funzione cellulare e conseguente morte cellulare.

Quanto appena detto, ha portato la comunità scientifica a sostenere che l'obesità possa essere un fattore di rischio per lo sviluppo di demenza e soprattutto un fattore di rischio per la malattia di Alzheimer, seppur il meccanismo d'azione, a oggi, è ancora poco chiaro.

La fosfo-proteomica e la glico-proteomica, negli ultimi anni, sono state utilizzate per lo studio e la ricerca di proteine da adoperare in campo terapeutico sia nel contesto oncologico che di patologie neurodegenerative. Numerosi sono gli studi sperimentali che si servono di questa piattaforma in modelli animali prima e dopo la somministrazione di una determinata terapia, con il fine di enfatizzare una via di azione del farmaco, nonché di mettere in evidenza meccanismi di regolazione (apoptosi, differenziamento, proliferazione) e processi cellulari. Negli ultimi anni, dati in letteratura hanno messo in evidenza l'uso della fosfo-proteomica nell'analisi di tessuti come quello adiposo, muscolare, cardiaco ed epatico, mentre nell'ambito metabolico pochi studi sono stati effettuati al fine di correlare l'obesità al danno cerebrale. Il lavoro svolto in questi tre anni di ricerca, è uno dei pochi studi che ha lo scopo di collegare obesità e SNC utilizzando un approccio proteomico qualitativo. Ulteriori studi sono

comunque necessari per confermare le nostre ipotesi riguardo la possibile correlazione tra obesità, sindrome metabolica e malattie neurodegenerative.

Bibliografia.

- 1.Hossain P, Kawar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world a growing challenge. *N Engl J Med.* 2007 Jan 18;356(3):213-5.
- 2.Yach D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nat Med.* 2006 Jan; 12(1):62-6.
- 3.Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, et al: Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1994-2004. *JAMA* 295:1549-1555, 2006.
- 4.Preventing chronic diseases: A vital investment. Geneva, Switzerland, World Health Organization Press, 2005.
- 5.Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet.* 2005 Oct 1; 366(9492):1197-209.
- 6.WHO. Obesity and Overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (accessed 27 October 2015).
- 7.Laitien J, Power C, Jarvelin MR. Family social class, maternal body mass index, childhood body mass index and age at menarche as predictors of adult obesity. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:287-294.
- 8.Epidemiologia dell'obesità. *Obesità.* 2006. Fonte Internet www.obesità.org.
- 9.Wellman PJ. Norepinephrine and the control of food intake. *Nutrition* 2000; 16: 837-42.
- 10.Mirenowicz J, Schultz W. Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature* 1996; 379: 449-51.
- 11.Nonogaki K, Strack AM, Dallman MF, Tecott LH. Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene. *Nat Med* 1998; 4: 1152-6.
- 12.Rankinen T, Bray MS, Hagberg JM, Pérusse L, Roth SM, Wolfarth B, Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Nov;38(11):1863-88.
- 13.Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:409-24. Review.
- 14.Mutch, D.M. & Clement, K. Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genet.* 2, e188 (2006).
- 15.Chung WK, Leibel RL. Molecular physiology of syndromic obesities in humans. *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Aug;16(6):267-72.

- 16.Kousta E, Hadjiathanasiou CG, Tolis G, Papathanasiou A. Pleiotropic genetic syndromes with developmental abnormalities associated with obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2009 Jul;22(7):581-92.
- 17.Lee YH et al. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842: 358-69.
- 18.Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med.* 1995 Apr 1;122(7):481-6.
- 19.Manson JE, Nathan DM, Krolewski AS, Stampfer MJ, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of exercise and incidence of diabetes among US male physicians. *JAMA.* 1992 Jul 1;268(1):63-7.
- 20.Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH Weight, weight change, and coronary heart disease in women. Risk within the 'normal' weight range *JAMA*, 1995 Feb 8;273(6):461-5.
- 21.Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci E, Ascherio A, Spiegelman D, Colditz GA, Willett WC Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men *Am J Epidemiol*, 1995 Jun 15;141(12):1117-27.
- 22.Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, Speizer FE, Manson JE. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women *JAMA*, 1997 May 21;277(19):1539-45.
- 23.Stampfer MJ, Maclure KM, Colditz GA, Manson JE, Willett WC. Risk of symptomatic gallstones in women with severe obesity *Am J Clin Nutr*, 1992 Mar;55(3):652-8.
- 24.Kato I, Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH Prospective study of clinical gallbladder disease and its association with obesity, physical activity, and other factors *Dig Dis Sci*, 1992 May;37(5):784-90.
- 25.Rabkin SW, Chen Y, Leiter L, Liu L, Reeder BA Risk factor correlates of body mass index. Canadian Heart Health Surveys Research Group *CMAJ*, 1997 Jul 1;157 Suppl 1: S26-31.
- 26.Matteoni C, Younossi ZM, McCullough A 1999 Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical pathological severity. *Gastroenterology* 116:1413.
- 27.Strohl KP, Strobel RJ, Parisi RA 2004 Obesity and pulmonary function. In: Bray GA, Bouchard C, James WP, eds. *Handbook of obesity: etiology and pathophysiology.* 2nd ed. New York, Marcel Dekker; 725–739.
- 28.Folsom AR, Kaye SA, Potter JD, Prineas RJ Association of incident carcinoma of the endometrium with body weight and fat distribution in older women: early findings of the Iowa Women's Health Study *Cancer Res*, 1989 Dec 1;49(23):6828-31.

29. Lee IM, Paffenbarger RS Jr. Quetelet's index and risk of colon cancer in college alumni. *J Natl Cancer Inst*, 1992 Sep 2;84(17):1326-31.
30. Sellers TA, Kushi LH, Potter JD, Kaye SA, Nelson CL, McGovern PG, Folsom AR. Effect of family history, body-fat distribution, and reproductive factors on the risk of postmenopausal breast cancer. *N Engl J Med*, 1992 May 14;326(20):1323-9.
31. Fontaine KR, Barofsky I. Obesity and health-related quality of life. *Obes Rev*, 2001 Aug;2(3):173-82.
32. Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med*, 2003 Jan 7;138(1):24-32.
33. Bay GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2583-2589, 2004.
34. Bray GA. Obesity: A time bomb to be defused. *Lancet* 352:160-161, 1998.
35. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010, Chronic disease – prevention and control, epidemiology, mortality. World Health Organization 2010.
36. Fain JN, Cheema P, Tichansky DS, Madan AK. Stimulation of human omental adipose tissue lipolysis by growth hormone plus dexamethasone. *Mol Cell Endocrinol* 295: 101–105, 2008.
37. Bray G, Bouchard C, James W. *Handbook of Obesity*. New York: Dekker, 1998, p. 1012.
38. Vague J. La différenciation sexuelle: facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Med* 30: 339–340, 1947.
39. Bray GA. An approach to the classification and evaluation of obesity. In: Bjorntorp P., Brodoff B.N., eds *Obesity* Lippincott, Philadelphia 1992; 294-308.
40. Licata G, Argano C, Di Chiara T, Parrinello G, Scaglione R. Obesity: a main factor of metabolic syndrome? *Panminerva Med*. 2006 Jun;48(2):77-85.
41. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004 May; 53(5):1285-92.
42. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec; 112(12):1796-808.
43. Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Klötting N, Stumvoll M, Bashan N, Rudich A. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun; 92(6):2240-7.

44. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005 Aug; 54(8):2277-86.
45. Inouye KE, Shi H, Howard JK, Daly CH, Lord GM, Rollins BJ, Flier JS. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes*. 2007 Sep; 56(9):2242-50.
46. Zhang H, Cui J, Zhang C. Emerging role of adipokines as mediators in atherosclerosis. *World J Cardiol*. 2010 Nov 26;2(11):370-6.
47. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004;145:2273-82.
48. Dietz JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003;148:293-300.
49. Ukkola O, Santaniemi M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med* 2002;80:696-702.
50. Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, Maachi M, Quignard-Boulangé A, Capeau J, Caron M. Long-term treatment with interleukin-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia*. 2006 Sep; 49(9):2162-73.
51. Balistreri CR et al. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:802078.
52. Abizaid A, Gao Q, Horvath TL: Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron* 2006;51:691–702.
53. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443:289– 295.
54. López M, Tovar S, Vázquez MJ, Williams LM, Diéguez C: Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 2007;66: 131–155.
55. Coll AP, Farooqi IS, O’Rahilly S: The hormonal control of food intake. *Cell* 2007;129:251–262.
56. Van Bloemendaal L, ten Kulve JS, la Fleur SE, Ijzerman RG, Diamant M. Effects of glucagon-like peptide 1 on appetite and body weight: focus on the CNS. *J Endocrinol*. 2014;221(1):T1-16.
57. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. The gut hormones in appetite regulation. *J Obes*. 2011;2011:528401.

- 58.Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation.
- 59.Mercer JG, Speakman JR. Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulating energy balance: from rodent models to human obesity. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 101-16.
- 60.Pocai A, Obici S, Schwartz GJ, Rossetti L. A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab* 2005; 1: 53-61.
- 61.Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, et al. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301: E567-84.
- 62.Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Jr., Schwartz MW. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 1999; 848: 114-23.
- 63.Bates SH, Dundon TA, Seifert M, Carlson M, Maratos-Flier E, Myers MG, Jr. LRB-STAT3 signaling is required for the neuroendocrine regulation of energy expenditure by leptin. *Diabetes* 2004; 53: 3067-73.
- 64.Korner J, Leibel RL. To eat or not to eat - how the gut talks to the brain. *N Engl J Med* 2003; 349: 926-8.
- 65.Le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ, et al. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology* 2006; 147: 3-8.
- 66.Matson CA, Reid DF, Cannon TA, Ritter RC. Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R882-90.
- 67.Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, et al. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4696- 701.
- 68.Kogan NM, Mechoulam R. The chemistry of endocannabinoids. *J Endocrinol Invest* 2006; 29 (Suppl): 3-14.
- 69.Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 873-84.
- 70.Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 389-462.
- 71.Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 2006; 27: 73–100.

72. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab* 2013; 17: 475–490.
73. Pagotto U. et al. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* 2006; 27:73-100.
74. Kola B. et al. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One*. 2008; 3(3) e1797.
75. Di Marzo V. et al. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* 2005; 8:585-589.
76. Marsicano, G; Kuner, R. Anatomical distribution of receptor, ligands and enzymes in the brain and in the spinal cord: circuitries and neurochemistry. In *cannabinoids and the brain*; kofalvi, A., Ed.; Springer: New York, 2008; pp 161-201.
77. Izzo AA, Piscitelli F, Capasso R, Aviello G, Romano B, Borrelli F et al. Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 451–461.
78. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001; 410: 822–825.
79. Malcher-Lopes R, Franco A, Tasker JG. Glucocorticoids shift arachidonic acid metabolism toward endocannabinoid synthesis: a non-genomic anti-inflammatory switch. *Eur J Pharmacol* 2008; 583: 322–339.
80. Tucci SA, Rogers EK, Korbonits M, Kirkham TC. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 520–523.
81. Engeli S. Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 110–115.
82. Burdyga G. et al. Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J. Neurosci.* 2004; 24:2708–2715.
83. Perlson, E., Maday, S., Fu, M. M., Moughamian, A. J. & Holzbaur, E. L. Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends Neurosci.* 33, 335–344 (2010).
84. Lasek, R. J., Garner, J. A. & Brady, S. T. Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *J. Cell Biol.* 99, 212s–221s (1984).
85. Brown 2003. Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective. *J Cell Biol.* 2003 Mar 17;160(6):817-21.
86. Franker MA, Hoogenraad CC. Microtubule-based transport – basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 11):2319–2329.

- 87.Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(10):682–696.
- 88.Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell.* 2003;112(4):467–480.
- 89.Lee, K. D. & Hollenbeck, P. J. Phosphorylation of kinesin in vivo correlates with organelle association and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 270, 5600–5605 (1995).
- 90.Ivaska, J. et al. Integrin $\alpha 2\beta 1$ promotes activation of protein phosphatase 2A and dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase 3 β . *Mol. Cell. Biol.* 22, 1352–1359 (2002).
- 91.Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N. & Brady, S. T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J.* 21, 281–293 (2002).
- 92.Morfini, G. et al. A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J.* 23, 2235–2245 (2004).
- 93.Ratner, N., Bloom, G. S. & Brady, S. T. A role for cyclin-dependent kinase(s) in the modulation of fast anterograde axonal transport: effects defined by olomoucine and the APC tumor suppressor protein. *J. Neurosci.* 18, 7717–7726 (1998).
- 94.Ackerley, S. et al. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *J. Cell Biol.* 161, 489–495 (2003).
- 95.Shea, T. B. et al. Cdk5 regulates axonal transport and phosphorylation of neurofilaments in cultured neurons. *J. Cell Sci.* 117, 933–941 (2004).
- 96.Jung, C. et al. The high and middle molecular weight neurofilament subunits regulate the association of neurofilaments with kinesin: inhibition by phosphorylation of the high molecular weight subunit. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 141, 151–155 (2005).
- 97.Reed, N. A. et al. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* 16, 2166–2172 (2006).
- 98.Barlowe C., Orci L., Yeung T., Hosobuchi M., Hamamoto S., Salama N., Rexach M.F., Ravazzola M., Amherdt M. and Schekman R. (1994).COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77: 895-907.
- 99.Kuehn M.J., Hermann J.M. and Schekman R. (1998). COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* 391: 187-190.
- 100.Matsuoka K., Orci L., Amherdt M., Bednarek S.Y., Hamamoto S., Schekman R. and Yeung T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93: 263-275.

101. Appenzeller-Herzog C. and Hauri H.P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell Sci.* 119: 2173-2183.
102. Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW, Jahn R. 1988. Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes *J. Biol. Chem.* 263:15423–28.
103. Fykse EM, Fonnum F. 1996. Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem. Res.* 21:1053–60.
104. Südhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:509–547.
105. Betz, A., Thakur, P., Junge, H. J., Ashery, U., Rhee, J. S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J., and Brose, N. (2001) *Neuron* 30, 183–196.
106. Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J. S., Brose, N., Enk, C., Reim, K., and Rosenmund, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9037–9042.
107. Wang, Y., Sugita, S., and Südhof, T. C. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 20033–20044.
108. Schoch, S., Castillo, P. E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R. C., and Südhof, T. C. (2002) *Nature* 415, 321–326.
109. Ohtsuka, T., Takao-Rikitsu, E., Inoue, E., Inoue, M., Takeuchi, M., Matsubara, K., Deguchi-Tawarada, M., Satoh, K., Morimoto, K., Nakanishi, H., and Takai, Y. (2002) *J. Cell Biol.* 158, 577–590.
110. Wang, Y., Liu, X., Biederer, T., and Südhof, T. C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14464–14469.
111. Takao-Rikitsu, E., Mochida, S., Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Inoue, M., Ohtsuka, T., and Takai, Y. (2004) *J. Cell Biol.* 164, 301–311.
112. Schoch S, Gundelfinger ED (2006) Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* 326:379 –391.
113. Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2001) Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* 29:131–143.
114. Shapira M, Zhai RG, Dresbach T, Bresler T, Torres VI, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2003) Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron* 38:237–252.
115. Dresbach T, Torres V, Wittenmayer N, Altmann WD, Zamorano P, Zuschratter W, Nawrotzki R, Ziv NE, Garner CC, Gundelfinger ED (2006) Assembly of active zone precursor vesicles: obligatory trafficking of presynaptic cytomatrix proteins Bassoon and Piccolo via a trans-Golgi compartment. *J Biol Chem* 281:6038–6047.

- 116.Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsubara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H, Takai Y (2002) Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol* 158:577–590.
- 117.Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED. 2001. The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:94–116.
- 118.Lonart G. 2002. RIM1: an edge for presynaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 25:329– 32.
- 119.Ziv NE, Garner CC (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci* 5:385–399.
- 120.Waites CL, Craig AM, Garner CC (2005) Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* 28:251–274.
- 121.Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED (2000) Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr Opin Neurobiol* 10:321–327.
- 122.Südhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature.* 1995 Jun 22;375(6533):645-53.
- 123.Jahn R, Südhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:863-911.
- 124.Lin RC, Scheller RH. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:19-49.
- 125.Chen YA, Scheller RH. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):98-106.
- 126.Clary D.O. & Rothman J.E. (1990) Purification of three related peripheral membrane proteins needed for vesicular transport. *J. Biol. Chem.* 265: 10109-10117.
- 127.Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 1993;362(6418):318– 324.
- 128.Schoch S, Deák F, Königstorfer A, et al. SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science.* 2001;294(5544):1117–1122.
- 129.Deak F, Schoch S, Liu X, Südhof TC, Kavalali ET. Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol.* 2004;6(11):1102–1108.
- 130.Deák F, Shin OH, Kavalali ET, Südhof TC. Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion. *J Neurosci.* 2006;26(25):6668–6676.
- 131.Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science.* 2009;323(5913):474–477.

- 132.Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, et al. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318–24.
- 133.Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W. & Weis, W. I. Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* 94, 525–536 (1998).
- 134.Johnston PA, Südhof TC. 1990. The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homooligomerization. *J. Biol. Chem.* 265:8869–73.
- 135.Calakos N, Scheller R. 1994. Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J. Biol. Chem.* 269:24534–37.
- 136.Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R. 1995. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 14:224–31.
- 137.Washbourne P, Schiavo G, Montecucco C. 1995. Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. *Biochem. J.* 305:721–24.
- 138.Becher A, Drenckhahn A, Pahner I, Margittai M, Jahn R, Ahnert-Hilger G. 1999. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.* 19:1922–31.
- 139.Ishihara, T. et al. Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24, 751–762 (1999).
- 140.Zhang, B. et al. Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy. *J. Neurosci.* 24, 4657–4667 (2004).
- 141.Falzone TL, Gunawardena S, McCleary D, Reis GF, Goldstein LS. Kinesin-1 transport reductions enhance human tau hyperphosphorylation, aggregation and neurodegeneration in animal models of tauopathies. *Hum Mol Genet.* 2010;19(22):4399–4408.
- 142.Saha, A. R. et al. Parkinson's disease α -synuclein mutations exhibit defective axonal transport in cultured neurons. *J. Cell Sci.* 117, 1017–1024 (2004).
- 143.Sasaki, S., Maruyama, S., Yamane, K., Sakuma, H. & Takeishi, M. Ultrastructure of swollen proximal axons of anterior horn neurons in motor neuron disease. *J. Neurol. Sci.* 97, 233–240 (1990).
- 144.Corbo, M. & Hays, A. P. Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 51, 531–537 (1992).

145. Godovac-Zimmermann J, Brown LR. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 2001 Jan-Feb;20(1):1-57.
146. Panisko EA, Conrads TP, Goshe MB, Veenstra TD. The postgenomic age: characterization of proteomes. *Exp Hematol.* 2002 Feb;30(2):97-107.
147. Michaud GA, Snyder M. Proteomic approaches for the global analysis of proteins. *Biotechniques.* 2002 Dec;33(6):1308-16.
148. Souchelnytskyi S J. Proteomics in studies of signal transduction in epithelial cells. *Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002 Oct;7(4):359-71.
149. Taylor SW, Fahy E, Ghosh SS. Global organellar proteomics. *Trends Biotechnol.* 2003 Feb;21(2):82-8.
150. Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:311-23.
151. Dreger M. Proteome analysis at the level of subcellular structures. *Eur J Biochem.* 2003 Feb;270(4):589-99.
152. Godovac-Zimmermann J, Brown LR. Proteomics approaches to elucidation of signal transduction pathways. *Curr Opin Mol Ther.* 2003 Jun;5(3):241-9.
153. Neubauer G, Gottschalk A, Fabrizio P, Séraphin B, Lührmann R, Mann M. Identification of the proteins of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 21;94(2):385-90.
154. Shevchenko A, Keller P, Scheiffele P, Mann M, Simons K. Identification of components of trans-Golgi network-derived transport vesicles and detergent-insoluble complexes by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Electrophoresis.* 1997 Dec;18(14):2591-600.
155. Pandey A, Fernandez MM, Steen H, Blagoev B, Nielsen MM, Roche S, Mann M, Lodish HF. Identification of a novel immunoreceptor tyrosine-based activation motif-containing molecule, STAM2, by mass spectrometry and its involvement in growth factor and cytokine receptor signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000 Dec 8;275(49):38633-9.
156. Hinsby AM, Olsen JV, Bennett KL, Mann M. Signaling initiated by overexpression of the fibroblast growth factor receptor-1 investigated by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2003 Jan;2(1):29-36.
157. C. Dass, «Protein and peptides: structure determination.» in *Fundamentals of contemporary mass spectrometry.*, Wiley, 2007, pp. 289-332.
158. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, Selby PJ. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet.* 2000 Nov 18;356(9243):1749-56.

159. Dunn MJ. Studying heart disease using the proteomic approach. *Drug Discov Today*. 2000 Feb;5(2):76-84.
160. Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Müller EC, Sokolowska-Köhler W, Grabher G, Stöffler G. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis*. 1999 Jul;20(10):2100-10.
161. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003 Jan;3(1):36-44.
162. Gavin AC, Bösche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Höfert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelman A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):141-7.
163. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sørensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):180-3.
164. Cozzone, A. J., Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 1988, 42, 97–125.
165. Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., Sudarsanam, S., Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 2002, 27, 514–520.
166. Johnson, L. N., Barford, D., The Effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1993, 22, 199–232.
167. Hunter, T., Signaling-2000 and beyond. *Cell* 2000, 100, 113–127.
168. Hunter, T., Sefton, B. M., Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77, 1311–1315.
169. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B. et al., Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 2006, 127, 635–648.
170. Barford, D., Molecular mechanisms of the protein serine/ threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 1996, 21, 407–412.

- 171.Zhang, Z. Y., Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002, 42, 209–234.
- 172.MacKintosh, C., in: Hardie, G. D. (Ed.), *Protein Phosphorylation: A Practical Approach*, IRL Press, New York, NY 1993, p. 328.
- 173.Thingholm, T. E., Larsen, M. R., Ingrell, C. R., Kassem, M. et al., TiO₂-based phosphoproteomic analysis of the plasma membrane and the effects of phosphatase inhibitor treatment. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 3304–3313.
- 174.Tarrant, M. K., Cole, P. A., The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 2009, 78, 797–825.
- 175.Pawson, T., Nash, P., Protein–protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* 2000, 14, 1027–1047.
- 176.Jordan, J. D., Landau, E. M., Iyengar, R., Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell* 2000, 103, 193–200.
- 177.Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev.* 2001 Feb; 101(2):269-95.
- 178.McLachlin DT, Chait BT. Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol.* 2001 Oct; 5(5):591-602.
- 179.Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C. et al., Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci. Signal.* 2010, 3, ra3.
- 180.Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A. et al., A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 10762–10767.
- 181.Tan, C. S., Pasculescu, A., Lim, W. A., Pawson, T. et al., Positive selection of tyrosine loss in metazoan evolution. *Science (New York, NY)* 2009, 325, 1686–1688.
- 182.Hosking DE, Nettelbeck T, Wilson C, Danthiir V. Retrospective lifetime dietary patterns predict cognitive performance in community-dwelling older Australians. *Br J Nutr.* 2014 Jul 28;112(2):228-37.
- 183.Power SE, O'Connor EM, Ross RP, Stanton C, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Jeffery IB. Dietary glycaemic load associated with cognitive performance in elderly subjects. *Eur J Nutr.* 2015 Jun;54(4):557-68. doi: 10.1007/s00394-014-0737-5. Epub 2014 Jul 18.
- 184.Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G, Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats, *Br. J. Nutr.*, 90:953-960, 2003.

185. Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J, De Fronzo RA, Jenkinson CP, Mandarino LJ, Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle, *J Biol Chem*, 280: 10290-10297, 2005.
186. Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR, A high-fat diet co-ordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle, *Diabetes* 54:1926-1933, 2005.
187. Blüher M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? (*Clin Sci (Lond)*. 2016 Sep 1;130(18):1603-14.
188. Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler NM. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 42:776-782, 1997.
189. Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, Liu H, Landers T, Gross DR. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126:88-94, 1994.
190. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA *Ann Neurol*. 2006 Jun; 59(6):912-21.
191. Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality. Scarmeas N, Luchsinger JA, Mayeux R, Stern Y *Neurology*. 2007 Sep 11; 69(11):1084-93.
192. Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Ann Rev Neurosci*. 26:81–104.
193. Mattson MP. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med*. 139:441–444.
194. Pope SK, Shue VM, Beck C. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Annu Rev Public Health*. 24:111–132.
195. Beausoleil, S. A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J. E. et al., Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 12130–12135.
196. Stensballe, A., Andersen, S., Jensen, O. N., Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with offline mass spectrometry analysis. *Proteomics* 2001, 1, 207–222.
197. U. Laemmli, «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.» *Nature*, vol. 227, pp. 680-685, 1970.
198. C. Dass, «Protein and peptides: structure determination.» in *Fundamentals of contemporary mass spectrometry.*, Wiley, 2007, pp. 289-332.

- 199.Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol.* 2002 Mar; 20(3):301-5.
- 200.Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, Marto JA, Shabanowitz J, Herr JC, Hunt DF, Visconti PE. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem.* 2003 Mar 28; 278(13):11579-89.
- 201.Kuroda, I., Shintani, Y., Motokawa, M., Abe, S. et al., Phosphopeptide-selective column-switching RP-HPLC with a titania precolumn. *Anal. Sci.* 2004, 20, 1313–1319.
- 202.Pinkse, M. W. H., Uitto, P. M., Hilhorst, M. J., Ooms, B. et al., Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-nanoLCESI- MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal. Chem.* 2004, 76, 3935–3943.
- 203.Sano, A., Nakamura, H., Chemo-affinity of titania for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides. *Anal. Sci.* 2004, 20, 565–566.
- 204.Jensen, S. S., Larsen, M. R., Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 3635–3645.
- 205.Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B. et al., Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 2006, 127, 635–648.
- 206.Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A. et al., A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 10762–10767.
- 207.Wilson-Grady, J. T., Villen, J., Gygi, S. P., Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 1088–1097.
- 208.Delcourt, N., Thouvenot, E., Chanrion, B., Galeotti, N. et al., PACAP type I receptor transactivation is essential for IGF-1 receptor signalling and antiapoptotic activity in neurons. *EMBO J.* 2007, 26, 1542–1551.
- 209.Molina, H., Horn, D. M., Tang, N., Mathivanan, S. et al., Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 2199–2204.
- 210.Baker, C. L., Kettenbach, A. N., Loros, J. J., Gerber, S. A. et al, Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the *Neurospora* circadian clock. *Mol. Cell* 2009, 34, 354–363.
- 211.Engholm-Keller, K., Birck, P., Storling, J., Pociot, F. et al., TiSH—a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO₂, SIMAC, and HILIC. *J. Proteomics* 2012, 75, 5749–5761.

- 212.Palmisano, G., Parker, B. L., Engholm-Keller, K., Lendal, S. E. et al., A novel method for the simultaneous enrichment, identification and quantification of phosphopeptides and sialylated glycopeptides applied to a temporal profile of mouse brain development. *Mol. Cell. Proteomics* 2012, 11, 1191–1202.
- 213.Engholm-Keller, K., Hansen, T. A., Palmisano, G., Larsen, M. R., Multidimensional strategy for sensitive phosphoproteomics incorporating protein prefractionation combined with SIMAC, HILIC, and TiO(2) chromatography applied to proximal EGF signaling. *J. Proteome Res.* 2011, 10, 5383–5397.
- 214.Park S, Ahn J, Kim NS, Lee BK. High carbohydrate diets are positively associated with the risk of metabolic syndrome irrespective to fatty acid composition in women: the KNHANES 2007-2014. *Int J Food Sci Nutr.* 2016 Nov 8:1-9.
- 215.Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *Int J Obes (Lond).* 2013 Feb;37(2):216-23.
- 216.Jiménez-Gómez Y, Marín C, Peérez-Martínez P, Hartwich J, Malczewska-Malec M, Golabek I, Kiec-Wilk B, Cruz-Teno C, Rodríguez F, Gómez P, Gómez-Luna MJ, Defoort C, Gibney MJ, Pérez-Jiménez F, Roche HM, López-Miranda J. A low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with long-chain (n-3) fatty acids alters the postprandial lipoprotein profile in patients with metabolic syndrome. *J Nutr.* 2010 Sep;140(9):1595-601.
- 217.Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 1977 Dec;83(2):346-56.
- 218.O'Shannessy DJ, Quarles RH. Labeling of the oligosaccharide moieties of immunoglobulins. *J Immunol Methods.* 1987 May 20;99(2):153-61.
- 219.Häkkinen J, Vincic G, Månsson O, Wårell K and Levander F. The Proteios Software Environment - An extensible multi-user platform for management and analysis of proteomics data. *J Proteome Res* 2009).
- 220.Chawade, A.; Alexandersson, E.; Levander, F. Normalyzer: a tool for rapid evaluation of normalization methods for omics data sets. *J. Proteome Res.* 2014, 13 (6), 3114 –20).
- 221.Zhang H, Li XJ, Martin DB, Aebersold R. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 2003 Jun;21(6):660-6. Epub 2003 May 18.
- 222.Cohen RA. Obesity-associated cognitive decline: excess weight affects more than the waistline. *Neuroepidemiology* 34: 230-231 (2010).
- 223.Gunstad J, Lhotsky A, Wendell CR, Ferrucci L, Zonderman AB. Longitudinal examination of obesity and cognitive function: results from the Baltimore longitudinal study of aging. *Neuroepidemiology* 34: 222-229 (2010).

- 224.Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HAP, Hofman A, Breteler MMB. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam Study. *Neurology* 53:1937-1942 (1999).
- 225.Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler NM. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 42:776-782, 1997.
- 226.Levin-Allerhand JA, Lominska CE, Smith JD. Increased amyloid- levels in APPSWE transgenic mice treated chronically with a physiological high-fat high-cholesterol diet. *J NutrHealthAging*. 2002;6:315–319.
- 227.Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*. 1997; 77:1081–1132.
- 228.Chapman PF, et al. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci*. 1999; 2:271–276.
- 229.Ehehalt R, et al. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*. 2003; 160:113–123.
- 230.Cutler RG, et al. Involvement of perturbed ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:2070–2075.
- 231.Mattson MP. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med*. 139:441–444.
- 232.Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J Biol Chem*. 269:13623–13628.
- 233.Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24:1121–1159.
- 234.Yao PJ. Synaptic frailty and clathrin-mediated synaptic vesicle trafficking in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 2004; 27:24–29.
- 235.Pagotto U, Vanuzzo D, Vicennati V, Pasquali R. Pharmacological therapy of obesity. *G Ital Cardiol (Rome)* 2008.
- 236.Pagotto U, Vicennati V, Pasquali R. The endocannabinoid system and the treatment of obesity. *Ann Med*. 2005;37(4):270-5.
- 237.Bellocchio L, Cervino C, Pasquali R, Pagotto U. The endocannabinoid system and energy metabolism. *J Neuroendocrinol*. 2008 Jun;20(6):850-7.
- 238.Engeli S. Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 110–115.

- 239.Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 873-84.
- 240.Bocarsly ME, Fasolino M, Kane GA, LaMarca EA, Kirschen GW, Karatsoreos IN, McEwen BS, Gould E. Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Dec 22;112(51):15731-6.
- 241.Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA. Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol*. 2006 Mar;69(3):691-6.
- 242.Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B. et al., Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 2006, 127, 635–648.
- 243.Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS. Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell*. 1999; 3:11–21.
- 244.Peden AA, Oorschot V, Hesser BA, Austin CD, Scheller RH, Klumperman J. Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *J Cell Biol*. 2004; 164:1065–1076.
- 245.Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*. 2003; 72:395–447.
- 246.Newell-Litwa K, Seong E, Burmeister M, Faundez V. Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery. *J Cell Sci*. 2007; 120:531–541.
- 247.Rozenfeld R, Devi LA. Regulation of CB1 cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein AP-3. *FASEB J*. 2008 Jul;22(7):2311-22.
- 248.Saito K, et al. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:2628–2632.
- 249.Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*. 2003; 34:385–397.
- 250.Le Y, et al. Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J Neurosci*. 2001; 21:RC123.
- 251.Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 May;9(5):367-77.