

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia

**DOTTORATO DI RICERCA IN TERAPIE AVANZATE
MEDICO-CHIRURGICHE
XXXII° CICLO**

Direttore: Prof. Giovanni Di Minno

TESI DI DOTTORATO

**“Dismetabolie mitocondriali: 3,5-diiodo-L-tironina e proteina
disaccoppiante-3”**

Relatore:

Prof.ssa Assunta Lombardi

Candidato:

Alessandra Gentile

ANNO ACCADEMICO 2019/2020

Indice:

INTRODUZIONE	1
1. I MITOCONDRI.....	3
1.1 Struttura e funzione dei mitocondri	3
1.2 La glicerolo-3-fosfato deidrogenasi mitocondriale	6
1.3 L'organizzazione di complessi respiratori in supercomplessi (SCs).....	8
1.4 L'inefficienza della fosforilazione ossidativa: proton leak	10
2. LA 3,5-DIIODO-L-TIRONINA	13
2.1 3,5-diiodo-l-tironina: una iodotironina metabolicamente attiva.....	13
2.2 Effetti di 3,5-T2 sulla velocità metabolica di ratto e sulla prevenzione dell'insorgenza dell' obesità e delle patologie dismetaboliche ad essa correlate	17
2.3 Siti di legame intracellulari della 3,5-T2	23
3. LA PROTEINA DISACCOPPIANTE-3	26
3.1 Le proteine disaccoppianti (UCPs).....	26
3.2 La proteina disaccoppiante 3 (UCP3): aspetti generali e strutturali	27
3.3 Ruoli di UCP3	28
SCOPO DEL LAVORO	36
PARTE SPERIMENTALE	41
4. PRIMO DISEGNO SPERIMENTALE	41
4.1 Trattamento degli animali:.....	41
4.2 Isolamento dei mitocondri di fegato di ratto	42
4.3 Dosaggio proteico.....	42
4.4 Valutazione della respirazione mitocondriale in mitocondri di fegato di ratto.....	43
4.5 Determinazione della cinetica della proton leak nei mitocondri di fegato	44
4.6 Determinazione delle vie respiratorie mitocondriali associate ai complessi I, II, IV e a glicerolo fosfato deidrogenasi.....	45

4.7 Separazione dei complessi respiratori e supercomplessi attraverso (BN-PAGE) e colorazione istochimica per l'attività in gel di mitocondri di fegato di ratto.....	46
4.8 SDS-PAGE e Western Blot	47
4.9 Analisi statistica.....	48
5. SECONDO DISEGNO SPERIMENTALE	49
5.1 Modello animale: Topi WT e KO per UCP3 stabulati alla temperatura di termoneutralità.....	49
5.2 Valutazione della spesa energetica a riposo	49
5.3 Saggio immunoenzimatico per il rilevamento dei livelli serici di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG).....	50
5.4 Analisi istologiche e microscopia elettronica.....	51
5.5 Isolamento dei mitocondri dal muscolo scheletrico (SkM).....	52
5.6 Determinazione della proton leak nei mitocondri isolati da SkM.....	53
5.7 Isolamento dei mitocondri dal BAT	54
5.8 Dosaggio proteico.....	54
5.9 Determinazione della respirazione mitocondriale in mitocondri isolati dal BAT	54
5.10 Valutazione della differenza di potenziale ai capi della membrana mitocondriale interna di mitocondri di BAT	55
5.11 Valutazione del rilascio di H ₂ O ₂ mitocondriale nel BAT	56
5.12 Determinazione dell'electron leak mitocondriale del BAT.....	57
5.13 Misura degli idroperossidi lipidici in mitocondri di BAT.....	58
5.14 Preparazione dei campioni per l'analisi dei campioni mediante SDS-PAGE.....	59
5.15 Separazione dei complessi respiratori e supercomplessi attraverso (BN-PAGE) e colorazione istochimica per l'attività in gel dei complessi mitocondriali e della mG3PDH in mitocondri di BAT	60
5.16 BN-SDS-PAGE bidimensionale (2D) e identificazione delle proteine attraverso l'analisi di spettrometria di massa (MS).....	61

5.17 Preparazione dei lisati tissutali di WATg di topi WT e KO per UCP3 per la valutazione dell'attività della citocromo c ossidasi (COX) e della Fosfofruttochinasi (PFK)	62
5.18 Misurazione dell'attività dell'enzima Citocromo c ossidasi (COX) nel WATg	63
5.19 Misurazione dell'attività dell'enzima Fosfofruttochinasi (PFK) in lisati tissutali di WATg	64
5.20 Determinazione del rilascio di glicerolo da parte del tessuto adiposo bianco gonadico (WATg)	65
5.21 Determinazione dello stress ossidativo attraverso il metodo fluorimetrico della 2',7'-di-idro-clorofluorescina-diacetato (DCFH-DA) all'interno di lisati tissutali di WATg	66
RISULTATI.....	68
6. RISULTATI DEL PRIMO DISEGNO SPERIMENTALE	68
6.1 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidei sull'assunzione di cibo e sul guadagno di peso corporeo	68
6.2 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidei sui parametri respiratori mitocondriali e sulla cinetica della proton-leak determinata in mitocondri isolati da fegato	69
6.3 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidei sulle vie respiratorie mitocondriali associate ai complessi I, II, IV e G3PDH determinate in mitocondri di fegato	72
6.4 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidei sull'attività in gel dei complessi respiratori determinata in mitocondri isolati da fegato	75
6.5 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidei sull'abbondanza dei complessi respiratori in mitocondri di fegato di ratto	78
7. RISULTATI DEL SECONDO DISEGNO SPERIMENTALE	81
7.1 Effetto dell'assenza di UCP3 sui parametri metabolici, sullo stress ossidativo sistemico e sulla morfometria dei tessuti	81
7.2 Effetto dell'assenza di UCP3 sui parametri respiratori mitocondriali e sulla cinetica della proton leak del muscolo scheletrico	86

7.3 Effetto dell'assenza di UCP3 sulla morfologia degli adipociti e dei mitocondri di BAT.....	88
7.4 Effetto dell'assenza di UCP3 sui livelli proteici di UCP1 e di PGC-1 α nel BAT	90
7.5 Effetto dell'assenza di UCP3 sui parametri respiratori di mitocondri isolati da BAT.....	91
7.6 Effetto dell'assenza di UCP3 sull'abbondanza e sull'attività in gel dell'enzima mG3PDH e dei complessi della catena respiratoria mitocondriale nel BAT	93
7.7 Effetto dell'assenza di UCP3 sullo stress ossidativo e sulle difese enzimatiche antiossidanti mitocondriali	96
7.8 Effetto dell'assenza di UCP3 sull'organizzazione delle proteine mitocondriali in supercomplessi respiratori	98
7.9 Effetto dell'assenza di UCP3 sulle dimensioni degli adipociti e sul metabolismo lipidico e glucidico del WATg.....	101
7.10 Effetto dell'assenza di UCP3 sulla capacità ossidativa del WATg e sulle vie metaboliche glicolitiche	104
7.11 Effetto dell'assenza di UCP3 sullo stress del reticolo, sulla capacità antiossidante enzimatica mitocondriale del WATg e sulla produzione di ROS	106
DISCUSSIONE	109
BIBLIOGRAFIA.....	122

INTRODUZIONE

Convenzionalmente i mitocondri sono considerati organelli cellulari deputati principalmente alla produzione di energia sottoforma di ATP e ad altri processi metabolici quali la β -ossidazione degli acidi grassi e il metabolismo degli amminoacidi (1). Tuttavia, numerose evidenze emerse negli ultimi vent'anni hanno sottolineato il loro ruolo nella segnalazione intracellulare e in processi che determinano il destino cellulare (2–7). Essi, infatti, oltre ad essere la principale fonte energetica della cellula, producono precursori per le principali macromolecole quali i nucleotidi, gli acidi grassi, il colesterolo, il glucosio, gli amminoacidi o il gruppo eme (8); svolgono, inoltre, un ruolo centrale nel metabolismo dell'azoto, nell'apoptosi e nella produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)(9). I mitocondri sono anche coinvolti nei processi adattativi che la cellula mette in atto in condizioni di stress quali, la carenza di nutrienti, lo stress ossidativo, i danni a carico del DNA e lo stress del reticolo endoplasmatico (10) (Figura 1).

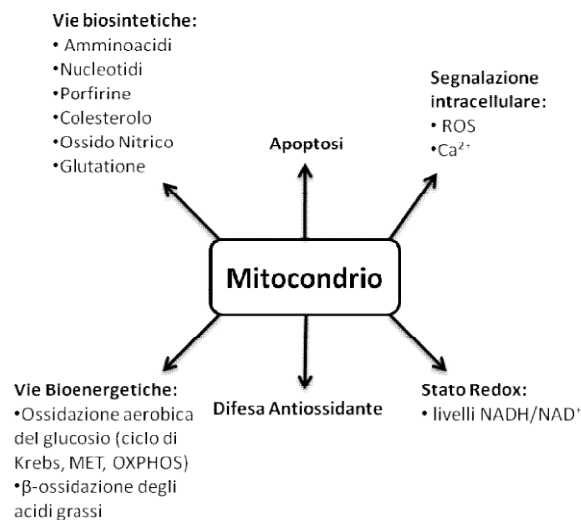


Figura1. Schema riassuntivo delle principali funzioni del mitocondrio nel metabolismo cellulare.

Uno stretto controllo della funzionalità di tali organuli, pertanto, è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi energetica e metabolica della cellula, così come quella dell'intero organismo; di conseguenza, alterazioni della funzionalità mitocondriale sono spesso responsabili dell'insorgenza e/o della progressione di numerose patologie.

Mutazioni a carico del DNA mitocondriale (mtDNA) o del DNA nucleare che codifica per proteine mitocondriali, infatti, portano a conseguenze devastanti per l'organismo, tipiche delle cosiddette "patologie mitocondriali primarie", quali ad esempio la sindrome di Leigh, o la sindrome di Kearns-Sayre; (2-4, 13-17). D'altro canto, malattie definite "patologie mitocondriali secondarie" non originano da un danno mitocondriale, ma da disturbi che portano ad alterazioni della funzionalità dell'organello, che, a loro volta, contribuiscono alla progressione della patologia (7,15,18,19,20,21). Le malattie dismetaboliche, tra cui obesità, insulino-resistenza e steatosi epatica, sono tra le più comuni patologie mitocondriali secondarie ad alto impatto economico, sociale e sanitario (22).

Nonostante cambiamenti nello stile di vita, quali una dieta equilibrata associata ad un aumento dell'attività fisica, rappresentino la principale strategia terapeutica per contrastare obesità e le patologie dismetaboliche ad essa associata, tali interventi consentono di ottenere buoni risultati nel breve ma non nel lungo termine (23), pertanto è spesso necessario intervenire farmacologicamente. In questo contesto i mitocondri rappresentano un promettente target terapeutico per lo sviluppo di nuove terapie mirate a contrastare le patologie dismetaboliche.

Studi finalizzati a identificare i fattori in grado di regolare la funzionalità mitocondriale e ad individuare le proteine mitocondriali che svolgono un ruolo chiave nell'omeostasi energetica sono fondamentali per la realizzazione delle predette strategie terapeutiche.

1. I MITOCONDRI

1.1 Struttura e funzione dei mitocondri

I mitocondri sono organelli cellulari presenti nella maggior parte delle cellule eucariotiche, caratterizzati da una doppia membrana e un genoma indipendente da quello nucleare.

L'assemblaggio dei mitocondri avviene grazie alla cooperazione tra il genoma nucleare e quello mitocondriale. Il genoma mitocondriale dei mammiferi (mtDNA) codifica per 37 geni di cui 13 codificano per componenti polipeptidiche del sistema di fosforilazione ossidativa ed anche per i 22 tRNA e 2 rRNA necessari alla loro trascrizione e traduzione all'interno dell'organello (2-7). I mitocondri contengono numerose proteine codificate dal genoma nucleare, che vengono poi importate nei mitocondri dalla traslocasi della membrana esterna mitocondriale (TOM) e quella della membrana interna (TIM) (23,20). I fosfolipidi possono essere sintetizzati nell'organello o importati dopo la sintesi nel reticolo endoplasmatico (6,12).

La membrana mitocondriale esterna è caratterizzata da una composizione simile alle altre membrane cellulari e presenta un poro formato da un canale anionico voltaggio dipendente (VDAC) che consente gli scambi tra il citosol e lo spazio intermembrana (20). La membrana mitocondriale interna, dove si trovano i complessi proteici della fosforilazione ossidativa, contiene una grande quantità di un particolare fosfolipide, la Cardiolipina, e presenta ripiegamenti appiattiti, chiamati creste, che ne aumentano notevolmente la superficie (12). Lungo la parte ripiegata delle creste mitocondriali sono presenti numerosi dimeri di F_0F_1 , le due principali unità dell'ATP sintasi, mentre, all'estremità di tali ripiegamenti, si trovano i siti di contatto tra la membrana mitocondriale interna e quella esterna, mantenuti strutturalmente grazie al sistema di organizzazione delle creste e dei siti di contatto mitocondriali (MICOS) (12). L'estesa

superficie della membrana interna mitocondriale creata dalle creste è necessaria per un efficace processo di fosforilazione ossidativa (3,6). Al contrario di quanto si sia pensato in passato, i mitocondri non sono organelli isolati, ma rappresentano un dinamico sistema cellulare in continua fusione e divisione da cui dipende la morfologia dell'organello stesso (12,14,15). La fusione mitocondriale avviene grazie a proteine quali le mitofusine MFN1, MFN2 e OPA1, mentre la fissione è controllata principalmente dalla proteina DRP1(14,15) e consente, inoltre, al mitocondrio di prendere diretto contatto con il reticolo endoplasmatico. Tali processi contribuiscono, oltretutto, al sistema di controllo di qualità mitocondriale e alla degradazione degli organelli danneggiati attraverso la mitofagia (12,14,15); tale sistema si avvale di un gran numero di proteasi, lipasi, e nucleasi che degradano o riparano gli elementi danneggiati (16,24,25) o ne veicolano l'estrusione attraverso la formazione di vescicole (26,27).

Il contenuto mitocondriale di una cellula viene determinato dall'equilibrio tra biogenesi e degradazione mitocondriale ed è regolato da fattori di trascrizione quali NRF1 e NRF2 (*Nuclear Respiratory Factors*) e PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α*), in grado di modulare l'espressione del genoma nucleare e mitocondriale in risposta alle richieste energetiche e metaboliche della cellula (14,15,28-31). Essi stessi, infatti, subiscono modificazioni post-traduzionali indotte da sensori energetici cellulari, primo fra tutti la chinasi attivata da AMP ciclico (AMPK) che, una volta attivata da bassi livelli dei rapporti ATP:ADP o ATP:AMP, inibisce i processi anabolici a favore di quelli catabolici (32).

Il metabolismo energetico è la principale funzione del mitocondrio. Il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) o ciclo di Krebs, scompone la parte acetilica dell'AcetilCoa, formatosi dal Piruvato derivante dalla glicolisi, in anidride carbonica, donando elettroni al NADH della matrice mitocondriale o al pool di Coenzima Q (CoQ) della membrana mitocondriale interna, formato da ubiquinone in forma ossidata (Q) e in forma ridotta (QH₂) (2-7,20). Anche la β

ossidazione degli acidi grassi produce AcetilCoA e fornisce elettroni al NADH o al pool di CoQ. A sua volta, il NADH trasferisce gli elettroni, attraverso il Complesso I della catena respiratoria mitocondriale (*electron transport chain*, ETC), al pool di CoQ che riceve elettroni anche da altre vie (20). Dal pool di CoQ, gli elettroni vengono trasferiti prima al complesso III, poi al Citocromo C, ed infine al complesso IV che riduce l'ossigeno molecolare ad acqua. La differenza di potenziale redox guida il movimento degli elettroni attraverso i diversi complessi della catena respiratoria, e, allo stesso tempo, attraverso i complessi I, III e IV, alcuni protoni vengono pompati nello spazio intermembrana, generando una forza protonmotrice (Δp) ai capi della membrana mitocondriale interna, composto da una differenza di potenziale $\Delta \psi$ di ~150–160 mV e un gradiente di pH di 0.5 unità (20,33). Tale gradiente di pH viene poi utilizzato dalle subunità F_0F_1 dell'ATP sintasi, per sintetizzare ATP.

Gli elettroni possono essere forniti alla catena di trasporto elettronica anche attraverso il complesso II o attraverso una via non convenzionale che coinvolge la glicerolo 3 fosfato deidrogenasi (mG3PDH). Il complesso II o succinato deidrogenasi, catalizza il trasferimento di elettroni dal succinato al FAD, legatocovalentemente all'enzima, riducendolo a $FADH_2$. Quest'ultimo, a sua volta, trasferisce gli elettroni al pool di CoQ. Il complesso II a differenza dei complessi I, III e IV non è una pompa protonica.

La mG3PDH, catalizza il trasferimento degli elettroni dal glicerolo 3 fosfato al FAD riducendolo. Questo a sua volta fornisce elettroni al pool di CoQ (Figura 2).

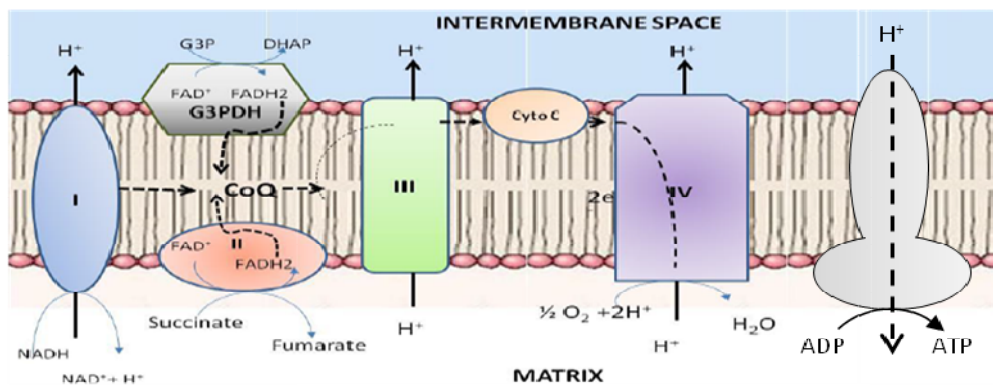


Figura 2. Rappresentazione schematica della fosforilazione ossidativa mitocondriale. L'ossidazione dei substrati metabolici genera coenzimi ridotti (NADH e FADH₂) che cedono gli elettroni alla catena di trasporto elettronica. Al trasporto di elettroni lungo la catena è accoppiato un pompaggio attivo di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana, che genera una forza protonica (Δp). I protoni dallo spazio intermembrana, spinti dalla forza protonica, rientrano nella matrice attraverso il complesso V dell'ATP sintasi, con formazione di ATP. In figura sono rappresentati i vari complessi della catena di trasporto elettronica responsabili del trasferimento elettronico e della sintesi di ATP.

Il trasportatore di nucleotidi adeninici (ANT) attua lo scambio tra l'ATP prodotto nella matrice mitocondriale allo spazio intermembrana e l'ADP, che viene trasportato nel verso opposto; una volta nello spazio intermembrana l'ATP diffonde nel citosol dove può essere utilizzato per i processi cellulari che richiedono energia (34).

1.2 La glicerolo-3-fosfato deidrogenasi mitocondriale

La glicerolo-3-fosfato deidrogenasi mitocondriale (mG3PDH) non è inclusa in molti schemi tradizionali della catena respiratoria, ed è considerata una componente non-standard, tessuto-specifica dei mitocondri dei mammiferi. Nonostante la sua struttura molto semplice, è un enzima molto importante del metabolismo intermedio ed è una componente chiave dello shuttle del glicerolo fosfato (GP-shuttle): esso agisce al crocevia della glicolisi, della fosforilazione ossidativa e del metabolismo degli acidi grassi (35).

Sono stati finora suggeriti tre possibili ruoli metabolici per la mG3PDH e per il sistema GP-shuttle: I) riossidare il NADH citosolico nelle cellule glicolitiche; II) bypassare il complesso I durante l'ossidazione di NADH citosolico con possibili implicazioni nella termogenesi e / o nell'efficienza metabolica; e III) regolare la disponibilità di glicerolo 3 fosfato (G3P) citosolico come metabolita che collega la glicolisi, la lipogenesi e la fosforilazione ossidativa (OXPHOS). Diverse evidenze suggeriscono un ruolo della mG3PDH nella termogenesi. Questo enzima è una deidrogenasi legata all'adenina-flavindinucleotide (FAD), ed è situato sulla superficie esterna della membrana mitocondriale interna; esso trasferisce direttamente equivalenti riducenti (H^+ , e^-) al complesso III della catena respiratoria (36). L'interconversione tra di-idrossiacetone fosfato (DHAP) e G3P svolge un ruolo importante nel metabolismo intermedio. Il DHAP serve come accettore transitorio diequivalenti riducenti generati nel citoplasma e trasferiti dal NADH e dal NADPH (37) al DHAP, in una reazione catalizzata dalla G3PDH citoplasmatica. Il G3P risultante viene riossidato a DHAP dalla mG3PDH (Figura 3).

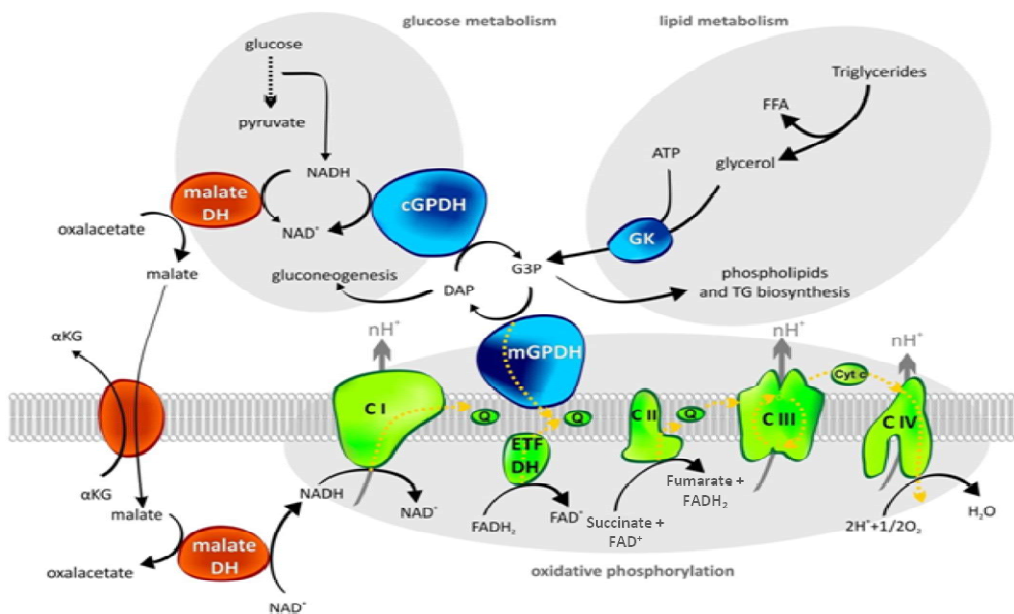


Figura 3. L'enzima mG3PDH e il suo ruolo nel metabolismo intermedio. Gli enzimi che costituiscono il sistema shuttle del GP sono evidenziati in blu, come anche la glicerolo chinasi (GK) che fosforila il glicerolo derivante dalla lipolisi. Parte dello shuttle malato-aspartato, che rappresenta una via alternativa di produzione di agenti riducenti, è disegnato in arancione. I complessi della catena respiratoria mitocondriale sono in verde, mentre le frecce gialle indicano il flusso di elettroni lungo la catena (35).

Q: Coenzima Q; CI: complesso I, CII: complesso II, CIII: complesso III, CIV: complesso IV, ETF DH: ETF:Q deidrogenasi, FFA: acidi grassi liberi, G3P: glicerolo-3-fosfato, DAP: diidrossiacetone fosfato

Le due G3P deidrogenasi costituiscono lo shuttle del GP, che insieme allo shuttle malato-aspartato trasferisce equivalenti riducenti dal citoplasma ai mitocondri. Lo shuttle del GP consente quindi la rapida generazione di ATP in condizioni aerobiche. Poiché gli equivalenti riducenti dal G3P vanno direttamente al complesso III della catena respiratoria, si generano solo due, anziché tre, molecole di ATP per atomo di ossigeno (o coppia di elettroni trasferita); l'efficienza, cioè, della generazione di ATP da questa via è inferiore rispetto a quando gli equivalenti riducenti vengono ceduti al complesso I della catena respiratoria. Di conseguenza, l'espressione di mG3PDH è particolarmente elevata nei tessuti che richiedono una rapida generazione di ATP, come il muscolo di volo degli insetti, le cellule spermatiche e le cellule β -pancreatiche, ma anche nei tessuti che producono calore, come il tessuto adiposo bruno (BAT) (35). La mG3PDH è anche espressa in diversi altri tessuti. Nel topo, il muscolo scheletrico è, insieme al BAT, il tessuto più ricco di mG3PDH, seguito da cervello, rene e fegato (38).

1.3 L'organizzazione di complessi respiratori in supercomplessi (SCs)

A partire dal 2000, un gran numero di studi strutturali e biochimici hanno fornito forti evidenze che i singoli complessi della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale si possano assemblare in strutture sovramolecolari, note come supercomplessi (SCs) (39). È stato ipotizzato che tale organizzazione aumenti l'efficienza del trasporto degli elettroni lungo i

complessi dell'ETC grazie al meccanismo di “*substrate channelling*”, una sorta di direzionamento dei substrati che aumenta l'efficienza e la velocità delle reazioni enzimatiche che li utilizzano (40); in questo modo, inoltre, si limita la produzione di specie reattive dell'ossigeno mitocondriali (ROS), grazie alla ridotta perdita di elettroni durante il loro passaggio attraverso i complessi della catena (41).

Attualmente sono noti tre modelli ipotetici per l'organizzazione strutturale dei complessi dell'ETC : “*fluid model*” (che esclude l'interazione tra i vari complessi della catena), il “*solid model*” (per cui i complessi sono organizzati in supercomplessi), e “*plasticity model*” (un ibrido tra i primi due modelli)(42). In particolare, da diverse analisi effettuate tramite *blue native polyacrylamide gel electrophoresis* (BN-PAGE) su mitocondri di cuore bovino, i complessi I, III e IV risultano assemblati a formare una struttura chiamata “respirosoma” (43,46) (Figura 4). In particolare, le subunità del complesso I, NDUFA11 e NDUFB4, interagiscono direttamente con il complesso III attraverso le subunità UQCRC1 e UQCRFS1; le interazioni con il complesso IV, invece, sono più deboli e variabili e coinvolgono la subunità COX7C, che lega la subunità ND5 del complesso I, e la subunità COX7A che interagisce con le subunità UQCR11, UQCRC1 e UQCRB del complesso III (46,47). Oltre al principale respirosoma, esistono altri supercomplessi in cui i complessi dell'ETC sono organizzati con diverse stechiometrie ad eccezione del Complesso II, l'unico che finora non è stato mai identificato all'interno di strutture sovramolecolari (43,45-48) .

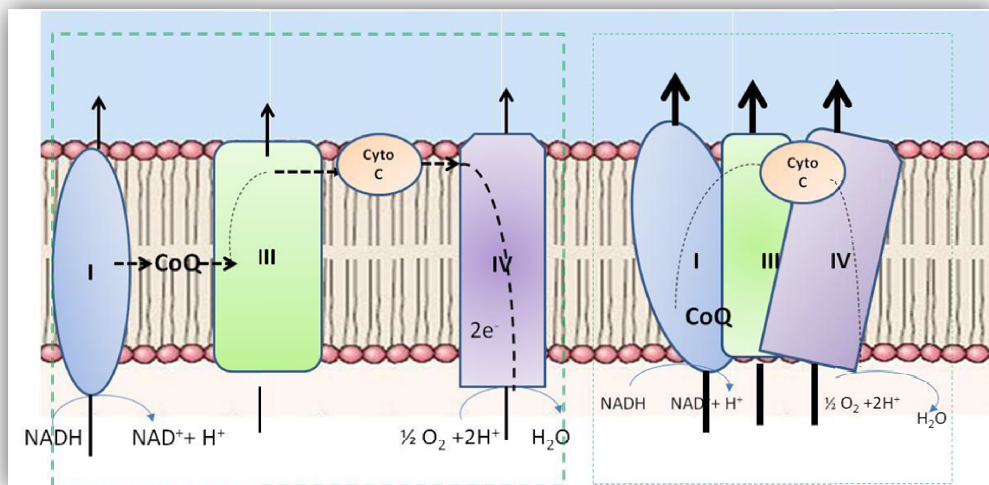


Figura 4. Rappresentazione schematica dell'assemblaggio dei complessi della catena respiratoria mitocondriale in supercomplessi. I complessi della catena di trasporto elettronica possono muoversi mediante la libera diffusione laterale all'interno della membrana (a sinistra), oppure aggregarsi in supercomplessi per consentire il channeling diretto degli elettroni tra i diversi componenti della catena (destra). L'aggregazione in supercomplessi rappresenta un vantaggio cinetico, un migliore controllo della produzione di ROS e una migliore stabilizzazione dei singoli complessi all'interno della membrana.

1.4 L'inefficienza della fosforilazione ossidativa: proton leak

La funzionalità mitocondriale è strettamente correlata a due componenti importanti: il funzionamento della catena respiratoria e il grado di accoppiamento tra l'ossidazione dei substrati energetici e la fosforilazione ossidativa. Quest'ultimo aspetto è di notevole importanza per il metabolismo energetico in quanto una significativa parte dell'energia liberata dall'ossidazione dei substrati viene dissipata sotto forma di calore, anziché essere convertita in ATP. Come descritto in dettaglio precedentemente, il trasferimento degli elettroni lungo la catena respiratoria ed il pompaggio attivo dei protoni dalla matrice allo spazio intermembrana portano alla formazione di un gradiente elettrochimico protonico Δp .

Tale gradiente elettrochimico, generato ai capi della membrana mitocondriale interna, è la principale fonte di energia per la sintesi cellulare di ATP. Tuttavia,

non tutta l'energia disponibile in tale gradiente viene utilizzata per tale scopo: una parte viene infatti sfruttata dalle reazioni di “*proton leak*” in cui, i protoni, pompatis nello spazio intermembrana, rientrano all'interno della matrice attraverso vie di conduttanza protonica alternative all'ATP sintasi, generando calore.

Numerosi studi hanno stabilito che il fenomeno di proton leak contribuisce notevolmente alla velocità metabolica a riposo dell'animale (*Resting Metabolic Rate*, RMR) ed è un fenomeno ubiquitario che si verifica in tutte le cellule eucariotiche (49,50). La composizione fosfolipidica della membrana mitocondriale interna è strettamente correlata alla sua conduttanza protonica (51-53). Tuttavia, modificazioni nella quantità e nella qualità degli acidi grassi che compongono la membrana mitocondriale interna non sembrano indurre differenze significative nella proton leak (51,54), indicando che anche altri aspetti, relativi alla composizione di tale membrana, determinano la sua permeabilità ai protoni, come la presenza di specifiche proteine in grado di partecipare a tale processo. La traslocasi di nucleotidi adeninici (ANT) non sembra essere ampiamente coinvolta nel processo basale di proton leak in quanto, studi effettuati in lievito overesprimendo ANT, mostrano che il grado di disaccoppiamento non risulta incrementato (55). Tuttavia, Skulacev (56), sostiene che ANT e altri membri della famiglia dei carrier mitocondriali, quali le proteine disaccoppianti (UCPs), possano catalizzare una proton leak dipendente da acidi grassi (proton leak inducibile).

La figura seguente rappresenta uno schema della fosforilazione ossidativa e del disaccoppiamento del trasporto elettronico dalla sintesi di ATP mediato dal processo di proton leak (Figura 5).

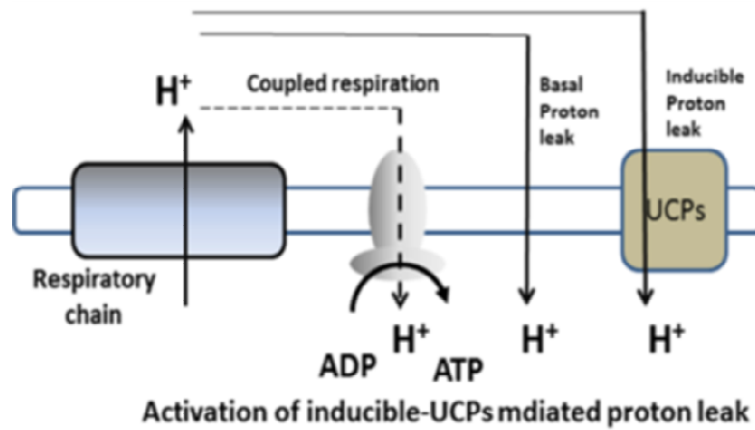


Figura 5. Rappresentazione schematica della conduttanza protonica della membrana mitocondriale interna. Parte degli elettroni pompato all'interno dello spazio intermembrana rientrano nella matrice attraverso l'ATP sintasi in un processo accoppiato alla sintesi di ATP; una parte invece rientra all'interno della matrice grazie a processi basali o inducibili quali, appunto, le proteine disaccoppianti (UCPs). ANT non è rappresentata in figura.

2. LA 3,5-DIIODO-L-TIRONINA

2.1 3,5-diiodo-l-tironina: una iodotironina metabolicamente attiva

La tiroide produce e secerne le iodotironine 3,5,3,5'-tetraiodotironina (tiroxina o T4), 3,5,3'-triiodotironina (T3) e 3,3',5'-triiodotironina (T3 inversa o rT3). T3 rappresenta l'ormone biologicamente attivo, T4 il suo pro-ormone, mentre rT3 ha scarsi o nulli effetti biologici.

Della T3 presente nei fluidi biologici, solo una parte è prodotta dalla tiroide. Infatti, circa l'80% della T3 serica è il risultato della conversione periferica di T4 a T3. Tale conversione ha luogo nei tessuti bersaglio degli ormoni tiroidei, che esprimono enzimi detti "deiodinasi" o "desiodasi", in grado di catalizzare la rimozione di un atomo di iodio dalla T4 con conseguente formazione di T3 o di rT3, a seconda se la rimozione dell'atomo di iodio interessa l'anello fenolico (esterno) o quello tirosilico (interno).

Nei fluidi biologici, oltre a T4, T3 e rT3 sono presenti anche diiodotironine e monoiodotironine, derivanti dalla deiodinazione sequenziale di T3 e rT3. In particolare, dalla deiodinazione di T3 si formano 3,3'-diiodo-l-tironina (3,3'-T2) e la 3,5-diiodo-l-tironina (3,5-T2), mentre la rT3 sarebbe precursore di 3,3'-T2 e 3',5'-diiodo-l-tironina (3',5'-T2) (Figura 6). Nonostante la via di formazione della 3,3'-T2 a partire da T3 sia stata accertata, la via diretta di formazione di 3,5-T2 non è ancora nota. Studi *ex-vivo* hanno mostrato che, in seguito a somministrazione intraperitoneale di T3 ad animali eutiroidei, si riscontra un incremento dei livelli serici di 3,5-T2, fenomeno che non si riscontra quando la stessa T3 viene somministrata ad animali che presentano un'inibizione degli enzimi deiodinasi (57). Tali dati indicano quindi che T3 è precursore di 3,5-T2 e che la deiodinazione periferica di T3 è una tappa

metabolica importante per la formazione di 3,5-T2. Tuttavia, ad oggi, non è ancora chiara la sede di formazione di questa diiodotironina.

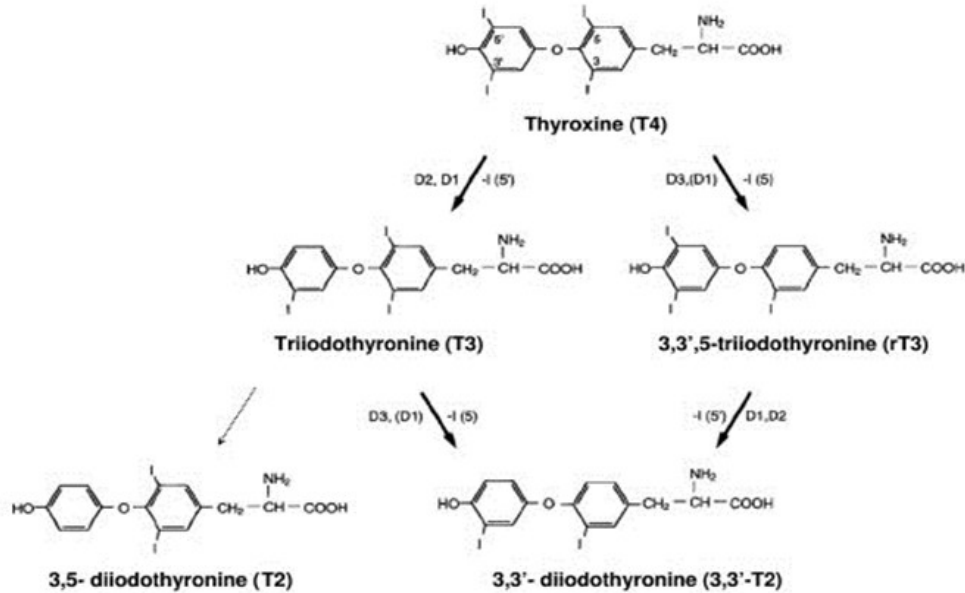


Figura 6. Struttura delle iodotironine e schematizzazione della loro deiodinazione periferica

Per molti anni 3,5-T2 è stata considerata priva di attività biologica e, nonostante gli studi compiuti negli ultimi 30 anni abbiano evidenziato che essa è in grado di esercitare azioni specifiche (58), i suoi effetti sono solo parzialmente noti. In particolare, 3,5-T2 quando somministrata a ratti ipotiroidei è in grado di incrementare la massima capacità ossidativa di tessuti metabolicamente attivi, quali muscolo scheletrico (59), fegato (60,61) e tessuto adiposo bruno (BAT) (62). Gli effetti che tale iodotironina induce si manifestano sia in seguito alla sua somministrazione cronica ma anche in tempi molto brevi e provocano cambiamenti significativi del metabolismo energetico dell'animale *in toto* (57). 3,5-T2 influenza rapidamente la funzionalità mitocondriale, inducendo un rapido aumento del consumo di ossigeno (63). I meccanismi molecolari che sottendono tali effetti sono indipendenti dalla trascrizione genica e della sintesi

proteica *de novo*, e sembrano essere il risultato dell'interazione diretta della diiodotironina con i mitocondri, in cui appunto sono stati identificati siti di legame specifici per 3,5-T₂ (64). Sempre a livello mitocondriale, 3,5-T₂ incrementa l'attività delle reazioni coinvolte nell'ossidazione dei substrati e nella produzione della forza elettromotrice protonica che si instaura ai capi della membrana mitocondriale interna (60,65). In particolare la diiodotironina agisce su due blocchi di reazioni: l'insieme delle reazioni coinvolte nella riduzione del citocromo C e quelle coinvolte nella sua ossidazione (cioè il complesso IV, o complesso della citocromo C ossidasi (COX)) (60,65); legando specificamente la subunità Va del complesso della COX, 3,5 T₂, permette la rimozione dell'inibizione allosterica esercitata dall'ATP sul complesso stesso ed il conseguente aumento dell'attività (66).

Alcuni studi indicano che parte degli effetti indotti da 3,5-T₂ sull'ossidazione mitocondriale dei substrati sono mediati da un incremento dell'uptake mitocondriale di calcio (67). Infatti, aumentati livelli intramitocondriali di Ca²⁺ attivano le deidrogenasi mitocondriali, da cui consegue un incremento della quantità di substrati ridotti disponibili per la catena respiratoria (67).

3,5-T₂ promuove processi che facilitano l'utilizzo di acidi grassi come substrati per le ossidazioni mitocondriali; nei miociti, infatti, stimolando la traslocazione di FAT/CD36 (una proteina che lega gli acidi grassi liberi) dal compartimento endosomale verso il sarcolemma e verso i mitocondri, aumenta l'ingresso degli acidi grassi nella cellula, ne facilita l'avvicinamento ai mitocondri, e aumenta la loro disponibilità per le ossidazioni mitocondriali (59). La stessa 3,5-T₂ promuove anche l'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi ed allo stesso tempo rende tale processo inefficiente. Infatti con un meccanismo molto rapido, evidente dopo una sola ora dalla sua somministrazione in vivo nel ratto, la diiodotironina attiva la via di segnalazione AMPK-acetilCoA carbossilasi-malonilCoA, nota dirigere la partizione lipidica verso l'ossidazione (68). Allo stesso tempo, sempre nel muscolo scheletrico 3,5-T₂ attiva il processo della

“proton-leak”, ossia il rientro di protoni, accumulatosi nello spazio intermembrana, grazie all’attività della catena di trasporto elettronica ed all’ossidazione dei substrati, verso la matrice; la proton-leak disperde l’energia accumulata nella forza elettromotrice protonica, importante per la sintesi di ATP, sotto forma di calore (61,68).

In Figura7 sono rappresentate le vie metaboliche attivate da 3,5-T2 che portano ad un incremento dell'ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale e ad un incrementata respirazione mitocondriale.

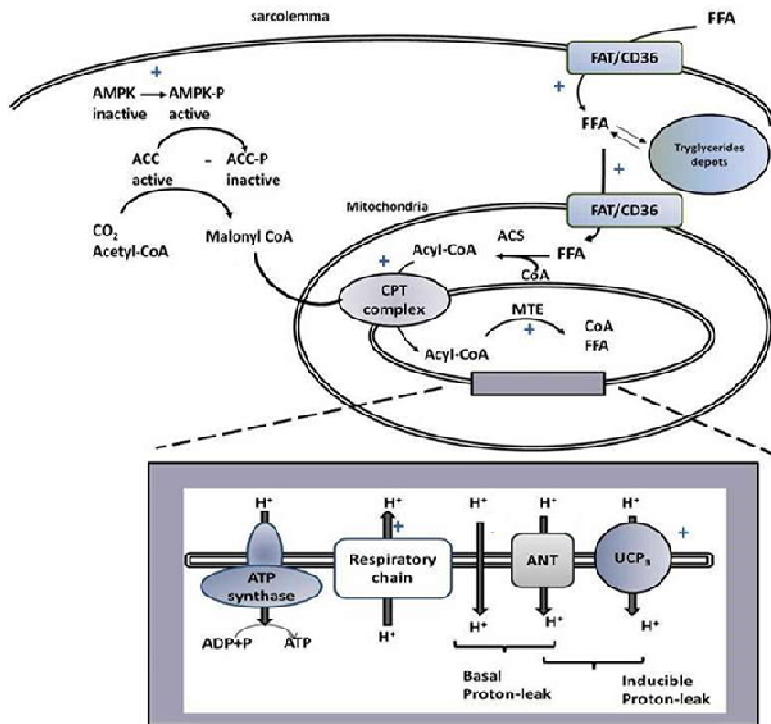


Figura 7. Vie metaboliche attivate da 3,5-T2 che portano ad un rapido incremento dell'ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale e ad un incrementata respirazione mitocondriale. Con il segno “+” sono contrassegnate le reazioni o le vie che vengono attivate da 3,5-T2, e con il segno “-” quelle che vengono inibite.

È stato evidenziato che la 3,5-T2, somministrata in vivo a ratti ipotiroidei, è in grado di influenzare i processi lipogenici a livello epatico, sia

aumentando la disponibilità di NADPH, cofattore chiave per la biosintesi degli acidi grassi, sia attivando la trascrizione di geni codificanti per enzimi coinvolti nella lipogenesi de novo. Per quanto riguarda il primo aspetto 3,5-T2 incrementa l'attività dell'enzima malico e della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (69). Mentre per quanto concerne la regolazione della trascrizione, 3,5-T2 sembra agire attraverso i fattori trascrizionali SREBP-1 and ChREBP, coinvolti nella trascrizione di geni codificanti per enzimi della lipogenesi de novo epatica (70). Inoltre, studi *in vitro* su linee primarie di epatociti umani hanno evidenziato che l'effetto esercitato da 3,5-T2 sulla lipogenesi è il risultato dell'attivazione della via di segnalazione mTORC2/Rictor, a sua volta innescato dalla chinasi AMPK (71).

La capacità di 3,5-T2 di attivare nell'epatocita i processi lipogenici ed, allo stesso tempo, di promuovere l'ossidazione degli acidi grassi genera un ciclo futile che comporta l'incremento della spesa energetica cellulare.

Un aspetto importante da considerare è che gli effetti di 3,5-T2 sui processi lipogenici sono influenzati dal tipo di alimentazione dell'animale; questo aspetto verrà descritto nel paragrafo successivo.

2.2 Effetti di 3,5-T2 sulla velocità metabolica di ratto e sulla prevenzione dell'insorgenza dell' obesità e delle patologie dismetaboliche ad essa correlate

Le azioni rapide e dirette di 3,5-T2 a livello mitocondriale, descritte nel paragrafo precedente, si riflettono in un aumento della velocità metabolica a riposo (RMR) dell'animale. Gli effetti di 3,5-T2 sull' RMR sono distinti da quelli notoriamente indotti da T3, che, al contrario dei primi, sono più lenti ed

aboliti da un inibitore della trascrizione genica, quale l'actinomicina D (72) (Figura 8).

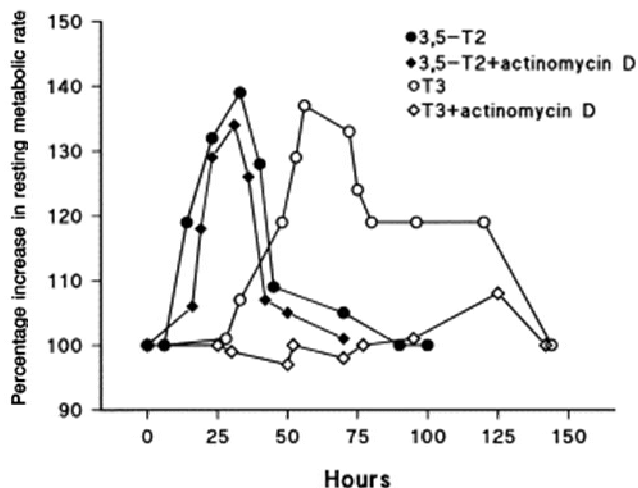


Figura 8. Variazioni della velocità metabolica a riposo di ratti ipotiroidei, che si verificano in seguito ad una singola somministrazione di T2 o T3 alla dose di 25 µg/100 g peso corporeo (pc) ed osservate in assenza ed in presenza di actinomicina D (8 µg/100 g pc). Gli effetti sull' RMR esercitati da T2 sono rilevabili già dopo poche ore dalla sua somministrazione e non vengono aboliti dall'inibizione della trascrizione (attuata dall'actomicina D); Le variazioni dell' RMR indotte da T3, invece, sono osservabili dopo circa 24 ore dalla sua somministrazione e l'inibizione della trascrizione genica abolisce quasi totalmente gli effetti dell'ormone.

L'incremento dell'utilizzo di acidi grassi come substrati metabolici mitocondriali è alla base dell'effetto ipolipidemizzante di tale iodotironina; quest'ultimo è stato messo in luce grazie a studi *in vitro* ed *in vivo* (73-75). Gli studi *in vivo* sono stati condotti utilizzando ratti e topi come modello animale (76-78) ed uno studio è stato anche effettuato sull'uomo (79). Gli esperimenti effettuati sul ratto hanno evidenziato che la somministrazione di 3,5-T2 ad animali sottoposti ad una dieta ricca di grassi (HFD) è in grado di prevenire e ridurre l'accumulo di grasso viscerale, così come l'epatosteatosi, i livelli serici di trigliceridi e colesterolo, e l'insorgenza di insulino-resistenza (77,80-83) senza indurre tireotossicosi. Infatti, 3,5-T2 riduce significativamente la quantità di grasso viscerale, e ciò si riflette su una riduzione del peso corporeo

dell'animale, senza però influenzare la massa muscolare ed il guadagno proteico degli stessi animali. In tali studi non sono state riscontrate variazioni nei livelli serici di T3 e T4 ed effetti di 3,5-T2 sull'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide. L'effetto anti-steatosico, esercitato da 3,5-T2 nel fegato di ratti alimentati con HFD, dipende da eventi biochimici in grado di bloccare l'accumulo di grassi assunti con la dieta. In particolare tali effetti sembrano essere mediati dalla sirtuina epatica (SIRT-1), che promuove la deacetilazione di proteine bersaglio quali PGC-1 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 α) e SREBP-1c (Sterol Regulator Element-binding Protein-1c), da cui consegue un incremento dell'espressione dei geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale e nell'ossidazione degli acidi grassi e la riduzione dell'espressione dei geni coinvolti nella gluconeogenesi e nella lipogenesi (81,84).

3,5-T2, quando somministrata a ratti sottoposti a dieta iperlipidica, attiva anche processi che rendono inefficiente la fosforilazione ossidativa mitocondriale. Infatti 3,5-T2, nel fegato, determina la dispersione dell'energia che si accumula nella forza protonmotrice presente ai capi della membrana mitocondriale interna, generata dall'ossidazione dei substrati, sotto forma di calore, a scapito della sintesi di ATP (77,82). Studi di proteomica differenziale hanno anche mostrato che l'effetto anti-steatosico di 3,5-T2 è associato a variazione di livelli proteici di enzimi coinvolti nelle vie principali del metabolismo epatico (85).

Anche a livello del muscolo scheletrico 3,5-T2 ha effetti significativi che permettono al tessuto di mantenere un'adeguata risposta all'insulina, che generalmente è compromessa dal regime alimentare iperlipidico prolungato. 3,5-T2, infatti, riduce l'accumulo ectopico di grassi indotto dalla dieta iperlipidica ed aumenta i) le fibre glicolitiche di tipo II, ii) i livelli del trasportatore del glucosio (GLUT4) a livello della membrana, iii) l'utilizzazione del glucosio, attraverso l'attivazione di AKT e degli enzimi glicolitici. Nel

gastrocnemio 3,5-T2 contrasta l'insorgenza di aberrazioni morfologiche mitocondriali indotte dalla dieta iperlipidica, favorendo la comparsa di organelli tubulari nelle regioni intermiofibrillari e impedisce l'up-regolazione di fattori proinfiammatori (86).

3,5-T2, quando somministrata a ratti alimentati con dieta iperlipidica, promuove la lipolisi nel tessuto adiposo viscerale, attraverso l'attivazione della lipasi ormone sensibile HSL, e previene l'aumento delle dimensioni degli adipociti, classicamente indotto da una dieta iperlipidica (87). L'aumentata lipolisi, tuttavia non è associata ad un aumento degli acidi grassi ematici né ad un loro accumulo nei tessuti magri, in quanto in questi tessuti la T2 promuove la loro ossidazione mitocondriale e, allo stesso tempo, rende inefficiente il processo (77,82). Nel tessuto adiposo sottocutaneo, 3,5-T2, promuove l'imbrunimento (browning), un processo che ha un ruolo importante nell'aumento della spesa energetica (88).

La somministrazione di 3,5-T2 riduce anche i livelli di colesterolo ematico, attraverso processi indipendenti dai recettori per le lipoproteine a bassa densità (LDLr). In particolare, Goldberg e coll (2012) hanno mostrato che le somministrazioni di dosi molto alte di 3,5-T2 o di T3 a topi privi dei LDLr limitano significativamente i livelli di colesterolo circolanti attraverso una riduzione della produzione epatica di apoB-100 (78). Sullo stesso modello animale Moreno e coll (2016), attraverso un approccio proteomico, hanno messo in evidenza che le pathways coinvolte nell'effetto ipocolesterolemizzante di 3,5-T2, in parte, si sovrappongono a quelle attivate da T3 e in parte risultano completamente indipendenti (89).

La Figura 9 che segue riassume gli effetti metabolici indotti da 3,5-T2 quando somministrata a ratti alimentati con una dieta iperlipidica (HFD).

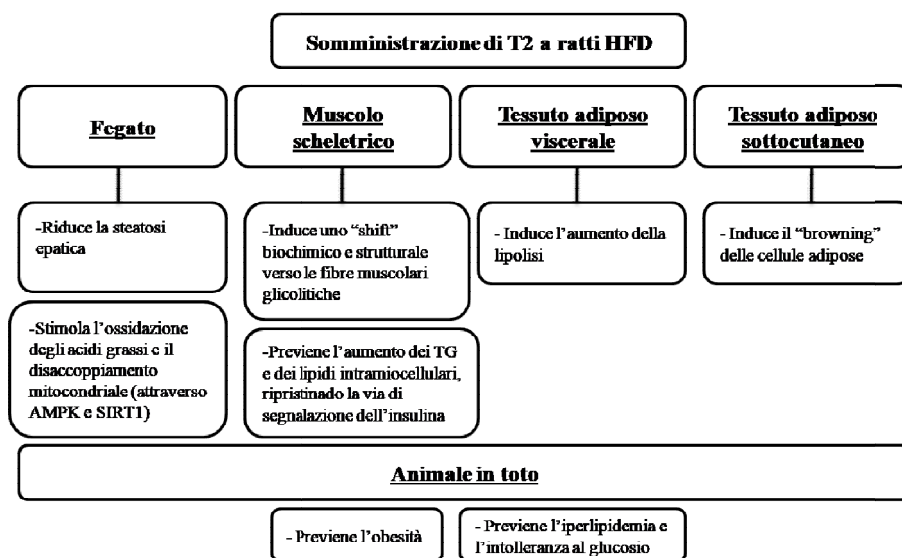


Figura 9. Rappresentazione schematica degli effetti tessuto-specifici della 3,5-T2 in ratti trattati con dieta iperlipidica (HFD).

Un dato interessante è che, nel ratto, la somministrazione cronica di 3,5-T2, alle dosi 25, 50 e 75 $\mu\text{g}/100\text{g pc}$, non induce tireotossicosi (81,83,90), infatti, gli animali che ricevono quotidianamente la iodotironina per 1 mese non presentano tachicardia né incremento della massa del cuore. Alla dose di 25 $\mu\text{g}/100\text{g pc}$, 3,5-T2 non induce alterazioni a carico dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (HPT), ma la dose di 50 $\mu\text{g}/100\text{g pc}$ ha un effetto inibitorio sull'asse HTP, pur non influenzando la frequenza e la massa cardiaca (77,81,83,90).

Gli studi relativi agli effetti esercitati dalla 3,5-T2 nel topo hanno impiegato dosi molto alte della iodotironina (250 $\mu\text{g}/100\text{g pc}$ e 2,5 $\text{mg}/100\text{g pc}$), e, pur confermando un effetto della stessa nel migliorare la steatosi epatica e l'ipercolestolemia indotta dalla dieta iperlipidica, hanno messo in evidenza un suo effetto sull'asse HTP (76,89) e nell'indurre ipertrofia cardiaca (76,91).

Nessun effetto tireotossico è stato osservato nell'uomo quando invece 3,5-T2 viene somministrata oralmente alla dose di 300 μg in termini di inibizione

dell'asse HTP e di frequenza cardiaca, nonostante tale dose fosse efficace nell'incrementare la spesa energetica e nel ridurre il peso corporeo dei soggetti (79).

In letteratura sono riportati dati molto variabili relativi ai livelli serici di 3,5-T2 nell'uomo; ciò sembra dipendere dai differenti metodi utilizzati per la sua rilevazione. Pinna e coll., utilizzando un dosaggio radio immunologico, hanno riscontrato valori serici della iodotironina di circa 15 pM negli individui eutiroidei. Studi più recenti, che si sono avvalsi di tecniche differenti, quali spettrometria di massa e dosaggio competitivo immunologico chemiluminescente (CLIA), riportano livelli serici di 3,5-T2 di circa 200 pM o più, un ordine di grandezza superiore a quello riportati da Pinna e coll. (92).

I primi studi finalizzati a valutare i livelli serici di 3,5-T2 risalgono al 1970. Questi si sono avvalsi di un dosaggio radio immunologico con anticorpi policlonali che ha permesso di valutare livelli serici di 3,5-T2 in soggetti eutiroidei di circa 100 pmol/L (93), valore confermato successivamente da Faber et al. (94). Ulteriori dosaggi RIA sono stati utilizzati successivamente, ma questi hanno dato un'alta variabilità di dati che variavano da 10 a 190 pmol/L (95). Studi più recenti, che si sono avvalsi di tecniche differenti, quali spettrometria di massa e dosaggio competitivo immunologico chemiluminescente (CLIA), riportano livelli serici di 3,5-T2 di circa 290 pM(92). I metodi basati sulla spettrometria di massa dovrebbero permettere una più specifica determinazione dei livelli di iodotironine tra cui 3,5-T2. Tuttavia, nonostante molti gruppi abbiano pubblicato metodi per la misura di 3,5-T2 basati sulla Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS) (96), l'applicazione di queste tecniche a sieri umani ha dato risultati negativi e solo recentemente è stato possibile valutare che i livelli di 3,5-T2 in soggetti eutiroidei è di circa 78 pmol/L (97).

È importante sottolineare anche che sono state ottenute prove per la presenza di proteine citosoliche che fungono da modulatori intracellulari di T3 e 3,5-T2 (98), in particolare, nel citosol di epatociti di ratto sono state identificate tre proteine in grado di legare sia 3,5-T2 sia T3. Il legame di T3, e non quello di 3,5-T2, è evidente solo in presenza di NADPH.

2.3 Siti di legame intracellulari della 3,5-T2

Gli effetti genomici degli ormoni tiroidei sono mediati dalla loro interazione con recettori nucleari (TRs). Nei mammiferi, due geni distinti codificano per i TRs, ovvero i loci TR α e TR β . Dalla loro trascrizione si ha la sintesi di almeno otto differenti mRNA, ma solo quattro di questi codificano per i recettori funzionali: dal locus TR α , viene sintetizzata l'isoforma TR α 1 che ha elevata affinità per T3; dal locus TR β , vengono sintetizzate le tre isoforme TR β 1, TR β 2, e TR β 3, che hanno un'elevata omologia di sequenza nel DNA e nei domini che legano T3, ma si differenziano per la lunghezza e la sequenza di aminoacidi nei domini amino-terminali (99).

- TR α 1 è preferenzialmente espresso nel cuore e muscolo scheletrico
- TR β 1 è la principale isoforma nel fegato, reni e tiroide
- TR β 2, invece, è prevalentemente espressa nel cervello, nel tessuto adiposo e nella ghiandola pituitaria anteriore.

Nei mammiferi, le azioni genomiche di 3,5-T2 sono state oggetto di discussione per molto tempo, sulla base del concetto che i recettori per l'ormone tiroideo TR legano 3,5-T2 con bassa affinità rispetto a T3 (100,101). In particolare, tramite saggi di mobilità elettroforetica, è stato dimostrato che l'affinità dei recettori nucleari per 3,5-T2 era di circa 1000 volte minore rispetto a T3, per

questo le dosi di 3,5-T2 utilizzate per mimare gli effetti della T3 dovevano essere molto maggiori di quelle utilizzate per la T3 (101). Negli ultimi anni, è stato dimostrato che in alcuni Teleostei 3,5-T2 e T3 hanno uguale affinità per una specifica isoforma TR β 1; mentre nell' uomo è stata confermata un'affinità significativamente inferiore di 3,5-T2 rispetto a T3 per l'isoforma TR β 1 (102). Questo ha confermato la possibilità che 3,5-T2 potrebbe esercitare alcuni dei suoi effetti in maniera TR-dipendente (76,103,104). Sulla base delle informazioni aggiornate finora disponibili, sembra ragionevole sottolineare che la specie può essere un fattore importante nella definizione degli effetti differenziali di una molecola di segnalazione come 3,5-T2, che durante l'evoluzione può aver perso o acquisito specifiche funzioni metaboliche, soprattutto in vista della comparsa dell'omeotermia.

A livello mitocondriale sono stati identificati recettori specifici per la T3, che rappresentano forme troncate del recettore nucleare TR α , p43 e p28. Sebbene il ruolo di p28 non sia stato ancora chiarito, p43 lega gli elementi di risposta presenti nel genoma mitocondriale. Il legame di T3 con p43 comporta l'attivazione della trascrizione e la successiva sintesi di proteine mitocondriali codificate appunto dal genoma mitocondriale (105). Anche nel caso della 3,5-T2 sono stati identificati siti di legame specifici a livello mitocondriale (64), tuttavia la loro identità non è ancora del tutto nota, sebbene gli studi di Arnold e coll. (1998) indicano che la subunità Va del complesso della citocromo ossidasi legghi la 3,5-T2 (66).

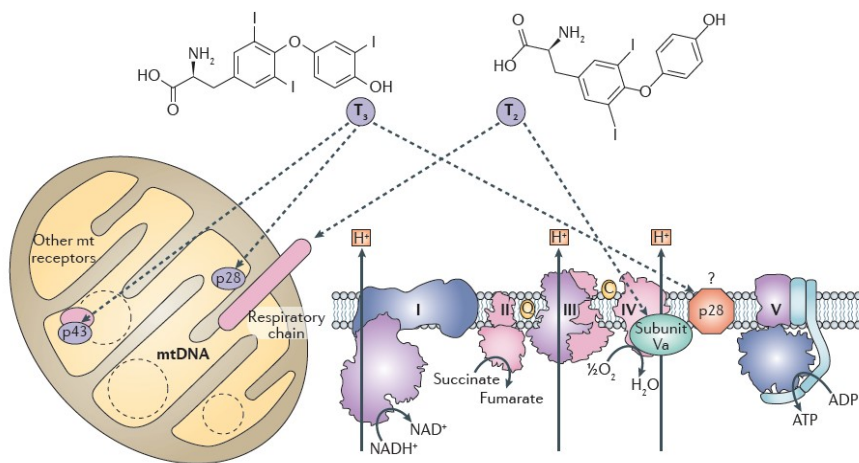


Figura 10. Siti di legame per T2 e T3 a livello mitocondriale: p43 e p28, le forme troncate del recettore TR α , legano T3, mentre per T2 è stato dimostrato il legame alla subunità Va della citocromo ossidasi, a livello della catena di trasporto elettronica (66).

3. LA PROTEINA DISACCOPPIANTE-3

3.1 Le proteine disaccoppianti (UCPs)

Le proteine disaccoppianti UCPs appartengono alla famiglia dei trasportatori anionici mitocondriali (106). La loro presenza è stata riscontrata in numerosi organismi, dai vegetali, ai funghi, ai protozoi, dagli invertebrati ai vertebrati, sia ectotermi che endotermi. Fino ad oggi nei mammiferi sono state identificate cinque proteine disaccoppianti da UCP1 a UCP5. Nel 1985 è stata scoperta la prima proteina disaccoppiante: UCP1, codificata da un gene localizzato sul cromosoma 4 (107). La proteina è espressa principalmente nel tessuto adiposo bruno (BAT), dove svolge un chiaro ruolo termogenico e per questo motivo viene detta termogenina (108). Tale proteina forma un canale, normalmente inibito dai nucleotidi quali il GDP, GTP e ATP (109), capace di mediare il passaggio passivo di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna, dissipando, sotto forma di calore, il gradiente protonico e offrendo così una via di rientro per i protoni alternativa all'ATP sintasi (108,110). Il sistema nervoso e il sistema endocrino regolano l'attività di UCP1 in seguito a stimoli fisiologici, quali la dieta o l'esposizione al freddo, inducendo il rilascio di catecolamine dalle fibre simpatiche che innervano il BAT. Il legame della noradrenalina ai recettori β adrenergici, presenti sulla membrana plasmatica degli adipociti bruni maturi, comporta l'attivazione di processi che regolano la trascrizione e la traduzione di UCP1, l'inibizione della sua degradazione lisosomiale e l'attivazione della proteina. L'attivazione della trascrizione genica di UCP1 sembra coinvolgere due chinasi: la proteina chinasi A (PKA) e la proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK) (111). Nel BAT l'attivazione della PKA comporta anche la stimolazione della lipolisi, e quindi la mobilitazione degli acidi grassi che vengono ossidati a livello mitocondriale,

con conseguente produzione di NADH e FADH₂. Gli acidi grassi stessi, rilasciati dal processo lipolitico, attivano UCP1, ma il meccanismo alla base di tale attivazione è ancora oggetto di dibattito. Attraverso lo screening di librerie di cDNA sono state identificate altre proteine disaccoppianti che presentavano omologia con UCP1 (112-116), quali UCP2, il cui mRNA è stato riscontrato in molti organi e tessuti, UCP3, principalmente espressa nel muscolo scheletrico e nel BAT, ma anche nel cuore e nel WAT (117,118). Infine UCP4 ed UCP5, sono principalmente espresse nel cervello e nel fegato rispettivamente (117).

3.2 La proteina disaccoppiante 3 (UCP3): aspetti generali e strutturali

Fino ad oggi, tra tutti i carrier mitocondriali, è stata determinata solo la struttura cristallografica 3D dell'adenina nucleotide translocasi (ANT) (119), mentre la struttura degli altri è stata modellata in base all'omologia con ANT. UCP3 è caratterizzata, nel topo, da una struttura tipica dei trasportatori, con una catena peptidica di 312 amminoacidi, disposta in sei domini transmembrana che sono collegati da tre lunghi loop disposti nella matrice e due loop più corti, localizzati nello spazio intermembrana. Le estremità N e C terminali si trovano nello spazio intermembrana (Figura 11) (120). Nell'uomo sono state scoperte due varianti di splicing di UCP3 (121). La forma lunga è formata da 312 amminoacidi ed ha un peso molecolare (MW) di 34,2 kDa. L'isoforma corta manca della sesta elica, ha una lunghezza di 275 amminoacidi e peso molecolare di 29,8 kDa. L'emivita di UCP3, come anche quella di UCP2, è di circa 30 minuti (111,122), notevolmente inferiore rispetto a quella di UCP1 che è di circa 30 ore (123); tali proteine vengono, infatti, rapidamente degradate dal proteasoma citosolico (111).

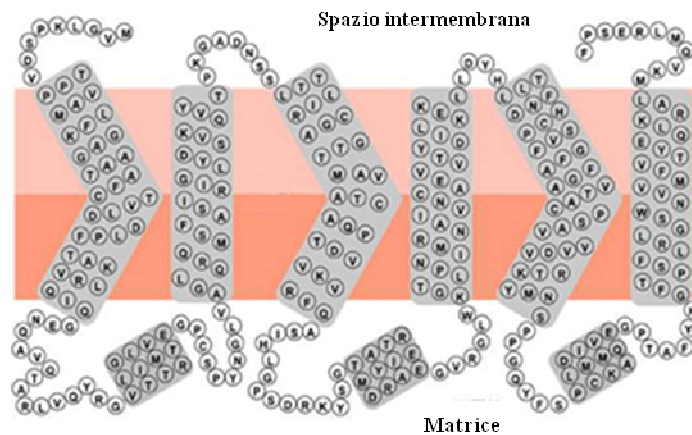


Figura 11. Rappresentazione schematica della struttura di UCP3 basata sulla sua omologia con ANT e sulla struttura cristallografica di ANT (119).

3.3 Ruoli di UCP3

Anche se UCP3 è stata scoperta e descritta nel 1997 (112), i meccanismi di attivazione e il suo ruolo fisiologico sono ancora in discussione (120,124). La sua forte omologia con UCP1 ha inizialmente suggerito che UCP3 fosse implicata nei processi termogenici (112). Tuttavia, l'attività disaccoppiante di UCP3 è stata messa in discussione a causa della discrepanza tra la sua abilità di trasportare protoni (125) e i suoi relativamente bassi livelli di espressione, non sufficienti ad attuare un disaccoppiamento consistente. Non sempre, infatti, una sovraespressione di UCP3 è associata al disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e topi *knockout* (KO) per UCP3 non mostrano né problemi di termoregolazione né sono obesi rispetto ai controlli *wild type* (WT) (126,127). Tuttavia, recentemente è stato dimostrato che sia UCP1 che UCP3 sono importanti per la termoregolazione nei mammiferi. In particolare, è stato dimostrato che l'ipertermia indotta dalla noradrenalina necessita dell'azione di UCP1, mentre la termogenesi indotta da lipopolisaccaride richiede l'azione

dell'UCP3 presente nel muscolo (128), ma tali osservazioni necessitano di ulteriori conferme.

L'assenza di un disaccoppiamento mediato da UCP3 potrebbe essere dovuto al fatto che l'attività disaccoppiante necessita della presenza di specifici cofattori, quali gli acidi grassi liberi (FA), il coenzima Q, l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) ed i prodotti della perossidazione lipidica, quali il 4-idrossi-nonenale (HNE) e gli idroperossidi lipidici (LOOH) (68,129,130). È stato mostrato direttamente sia nei mitocondri isolati (131) che nei sistemi ricostituiti (132,133), che il trasporto di protoni mediato da UCP1 è attivato solo in presenza di acidi grassi a lunga, mentre esistono prove indirette riguardanti UCP3, ottenute da esperimenti con topi KO per tale proteina (134).

L'efficienza di attivazione delle UCP da parte degli acidi grassi aumenta con l'aumentare dell'insaturazione degli acidi grassi e la lunghezza della catena, nell'ordine di acidi palmitico <oleico <eicosatrienoico<linoleico <retinoico <arachidonico, come mostrato per UCP1 e UCP2 (135,136). La maggiore attivazione di UCP3 è stata ottenuta in presenza di acido arachidonico (125). L'attività protonofora di UCP1, ma anche di UCP3 può essere inibita dai nucleotidi purinici (PN). In particolare è stato dimostrato che UCP3 viene completamente inibita da tutti i PN, ma la maggiore inibizione si ottiene con i PN-difosfato (135,137).

3.3.1 Ruolo di UCP3 nel metabolismo degli acidi grassi

Si ritiene che UCP3 possa svolgere un ruolo chiave nella regolazione dell'ossidazione degli acidi grassi e nel prevenire il danno ossidativo mitocondriale (124).

La differente entità di espressione di UCP3 nei vari tessuti (BAT>> cuore>muscolo) ha fatto pensare che la sua presenza sia correlata a un determinato tipo di metabolismo cellulare e alla capacità del tessuto di ossidare grassi. I mitocondri di BAT, in cui i livelli di UCP3 sono maggiori che in ogni

altro organo, infatti, hanno un'alta capacità di utilizzare acidi grassi a lunga catena come substrati della β -ossidazione (138). Sebbene entrambi, acidi grassi e glucosio possano essere utilizzati come fonte di energia immediatamente utilizzabile, i primi sono il substrato preferenzialmente utilizzato (139). Al contrario, il muscolo scheletrico, a riposo e durante una breve attività, utilizza glucosio e glicogeno, mentre ossida grassi ed eventualmente proteine durante l'esercizio prolungato (140); sono stati infatti osservati aumentati livelli sia dell'mRNA di UCP3 che di proteina, in risposta ad un prolungato esercizio fisico (141,142). Anche in seguito ad un aumento di lipidi nel sangue, digiuno, una dieta iperlipidica o esposizione al freddo (143-145) è possibile osservare un aumento dei livelli di UCP3, a supporto della forte correlazione tra UCP3 e il metabolismo degli acidi grassi. Altri studi, a supporto di tale correlazione, mostrano che: i) i mitocondri isolati da SkM di topi KO per UCP3 hanno una bassa capacità di ossidare gli acidi grassi rispetto ai controlli WT (146,147); ciò porterebbe all'accumulo di grassi che si osserva dopo un periodo di dieta iperlipidica (148); ii) l'espressione di UCP3 durante lo sviluppo cardiaco è correlata a quella dei *markers* della velocità dell'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi (146,149). In tale contesto, Bouillaud ha suggerito che UCP3 potrebbe coadiuvare l'estruzione del piruvato dal mitocondrio per favorire le reazioni metaboliche che utilizzano gli acidi grassi come substrato energetico, a scapito dell'utilizzo dei carboidrati (150), ma il meccanismo che sottende tale possibile funzione, non è attualmente stato chiarito.

3.3.2 Ruolo di UCP3 nello stress ossidativo

E' stato a lungo ipotizzato che i membri della famiglia delle proteine disaccoppianti fossero in grado di ridurre lo stress ossidativo inducendo un lieve disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, detto "mild uncoupling" (151-153). Questa ipotesi è basata sull'evidenza che la produzione mitocondriale di ROS è regolata dalla differenza di potenziale ai capi della

membrana mitocondriale interna (Δp) (154). UCP3, mediando la proton leak e riducendo il Δp , riduce la quantità di ROS prodotti a livello dei mitocondri. I ROS sono coinvolti nello stress e nel danno ossidativo ma regolano diversi processi cellulari tra cui la termogenesi (155). È interessante notare che i ROS stessi o i sottoprodotti dei ROS possono indurre disaccoppiamento mediato da UCP3, innescando un *feedback* negativo sulla loro stessa produzione (129). I meccanismi molecolari che sottendono il disaccoppiamento indotto dai ROS e mediato da UCP3 sembrano coinvolgere la glutationilazione della proteina: un leggero aumento nella produzione di ROS promuove la de-glutinationilazione di UCP3, che la attiva e porta ad una drastica riduzione dell'emissione dei ROS (152).

Per quanto concerne il meccanismo che sottende l'azione antiossidante di UCP3, Goglia e Skulachev (2003) hanno ipotizzato che UCP3 potesse promuovere l'estrusione di idroperossidi lipidici (LOOH), attraverso la membrana mitocondriale interna (MMI), dalla matrice verso lo spazio intermembrana, proteggendo il DNA mitocondriale ed i componenti chiave del metabolismo (gli enzimi del ciclo di Krebs ed enzimi coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi) dai danni indotti dai LOOH (156). Successivamente Lombardi e coll. (2010), effettuando studi su mitocondri isolati da topi WT e KO per UCP3, hanno confermato ed esteso l'ipotesi formulata da Goglia e Skulachev(2003) (130). Tali studi hanno messo in evidenza che UCP3 è in grado di promuovere l'estrusione di LOOH dalla matrice mitocondriale, e che sia tale processo a indurre il mild uncoupling mitocondriale. L'estrusione di LOOH in forma anionica dalla matrice allo spazio intermembrana, insieme alla diffusione di idroperossidi lipidici in forma indissociata nel verso opposto, comporta un movimento netto di protoni attraverso la MMI verso la matrice e quindi disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa.

Secondo Lombardi e coll., quindi, la funzione primaria di UCP3 sarebbe quella di mediare l'esporto di LOOH, ed il disaccoppiamento associato, sarebbe solo una conseguenza della funzione primaria della proteina (Figura 12) (130).

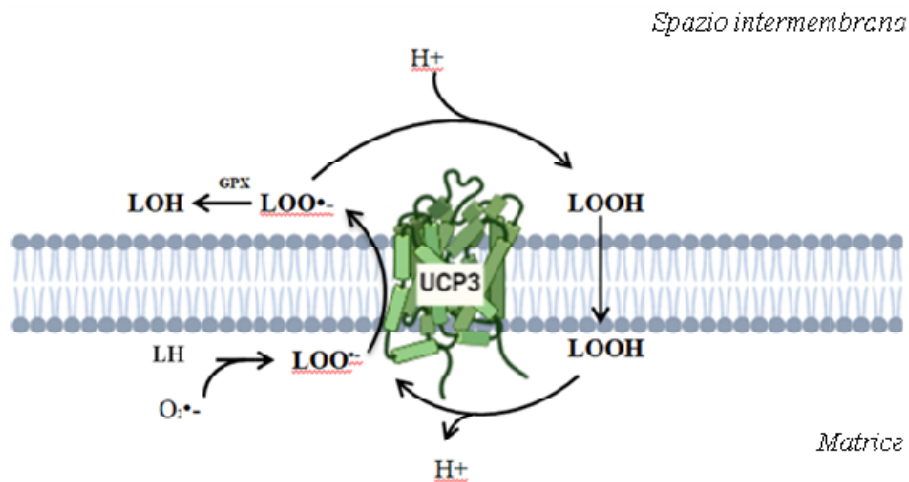


Figura 12. Rappresentazione schematica del ruolo di UCP3 nel trasporto di idroperossidi lipidici (LOOH) e conseguente disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa. Quando i mitocondri rilasciano nella matrice elevati livelli di O₂^{•-}, questi ossidano i lipidi di membrana (LH) con formazione di LOOH. UCP3 trasloca gli idroperossidi lipidici in forma anionica (LOO^{•-}) attraverso la MMI. Una volta nello spazio intermembrana, dato il pH acido presente a ridosso della MMI, LOO^{•-} si protonano e vengono in parte metabolizzati dalla glutazione perossidasi (Gpx) ed in parte tornano nella matrice attraverso un processo di flip-flop. Il processo nella sua globalità causa dissipazione della forza proton motrice (130).

3.3.3 Ruolo di UCP3 nel metabolismo energetico

Tutte le funzioni ipotizzate per UCP3 sono strettamente correlate al metabolismo cellulare e alterazioni della sua espressione si riflettono sul metabolismo energetico dell'animale.

Il ruolo di UCP3 nel mediare il *mild uncoupling*, nel proteggere i mitocondri dai ROS e/o dallo stress ossidativo indotto da LOOH, e nell'utilizzo di acidi grassi come substrati metabolici, suggeriscono un ruolo protettivo di questa proteina nell'obesità e nel T2DM. Questa possibilità è avvalorata dal fatto che UCP3 è espressa nel SkM, che rappresenta il 40% della massa metabolicamente attiva e che contribuisce in gran parte all'omeostasi energetica. Molte prove sperimentali sostengono un ruolo di UCP3 nel metabolismo energetico, tra cui:

i) topi transgenici che overesprimono UCP3 presentano un incremento del metabolismo di riposo associati a riduzione del peso corporeo, del tessuto adiposo gonadico (WATg) e dei depositi di BAT rispetto ai controlli WT. Inoltre essi presentano un'efficienza metabolica inferiore rispetto ai controlli (157), sono protetti dall'obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi (157,158), e mostrano un'aumentata sensibilità all'insulina (157);

ii) nel SkM di topi spontaneamente resistenti all'obesità sono stati osservati più alti livelli di UCP3 (associati anche ad elevati livelli di UCP1 nel BAT) rispetto ai topi tendenti all'obesità (159);

iii) una modesta sovraespressione di UCP3 nel muscolo scheletrico di topo aumenta il dispendio energetico in maniera simile all'esercizio fisico (160).

Al contrario, studi condotti su topi KO per UCP3 sembrano indicare che tale proteina non abbia un ruolo nel metabolismo energetico, poiché questi topi non presentano ridotta velocità metabolica, non sono obesi e sono in grado di rispondere adeguatamente allo stress termico (127). Tuttavia, questi studi sono stati effettuati in topi stabulati a 20-22 °C, una condizione che rappresenta nel topo uno stato cronico di stress termico (161). Pertanto, la presenza di meccanismi compensativi termogenici, nei topi KO, potrebbe aver mascherato il possibile ruolo della proteina nel metabolismo energetico. Studi su topi privi di UCP3, acclimatati alla temperatura di termoneutralità (che per il topo è di circa 30°C) permetterebbero di chiarire meglio il ruolo di UCP3 nella regolazione della velocità metabolica.

Studi finalizzati a valutare il ruolo di UCP3 nel T2DM indicano che l'overespressione della proteina ha un ruolo protettivo contro l'insorgenza di tale patologia (147,162). D'altro canto, i dati presenti in letteratura ottenuti su topi KO per UCP3 alimentati con dieta iperlipidica (nota per indurre uno stato di insulino-resistenza), sono contrastanti tra di loro in quanto la sensibilità all'insulina risulta, diminuita (146,147), inalterata (127) o aumentata (147). D'altra parte, topi eterozigoti per UCP3, che presentano una riduzione approssimativa del 50% dei livelli della proteina nel SkM rispetto ai controlli,

mostrano una significativa diminuzione nella sensibilità all'insulina (146,147). Questi ultimi dati sono in buon accordo con le osservazioni cliniche, che riportano che i) una riduzione del 50% di UCP3 nel SkM umano è correlata con l'incidenza di T2DM (163); e ii) negli esseri umani, i livelli di UCP3 sono ridotti nello stato pre-diabetico di alterata tolleranza al glucosio (164).

E' stato dimostrato inoltre che, polimorfismi nel genecodificante per UCP3 causano alterazioni nel metabolismo dei grassi e sono associati all'insorgenza di obesità e T2DM (165,166). In particolare, il polimorfismo del gene UCP3 nell'allele -55T corrisponde ad una maggiore espressione dell'mRNA di UCP3 e ad un aumentato metabolismo basale (167) e l'eterozigosi C/T è associata ad una riduzione dell'obesità e del rischio di T2DM (168-170). Questi risultati sono stati recentemente confermati attraverso una meta-analisi effettuata in una popolazione di pazienti europei, in cui si evidenzia una forte associazione tra il polimorfismo e un ridotto BMI (171) che però scompare quando l'apporto calorico aumenta (172). I soggetti eterozigoti per il polimorfismo missenso nel locus G304A, mostrano una ridotta capacità di ossidare il grasso corporeo (173) e bassi livelli di lattato nel plasma (174). Ciò può essere spiegato da un maggiore utilizzo di carboidrati come substrati energetici da parte del muscolo, causato dalla ridotta capacità di ossidare acidi grassi. Recentemente, sono state identificate quattro nuove mutazioni eterozigoti nel gene UCP3 (V56M, A111V, V192I e Q252X) (166) e bambini portatori di queste mutazioni presentano una maggiore percentuale di massa grassa ed un elevato BMI, associati a dislipidemia e ridotta sensibilità all'insulina (166).

Nelle figura che segue è riportato uno schema che riassume come UCP3, influenzando vari processi interrelati, possa prevenire l'insorgenza dell'obesità e del diabete di tipo 2 (Figura 13).

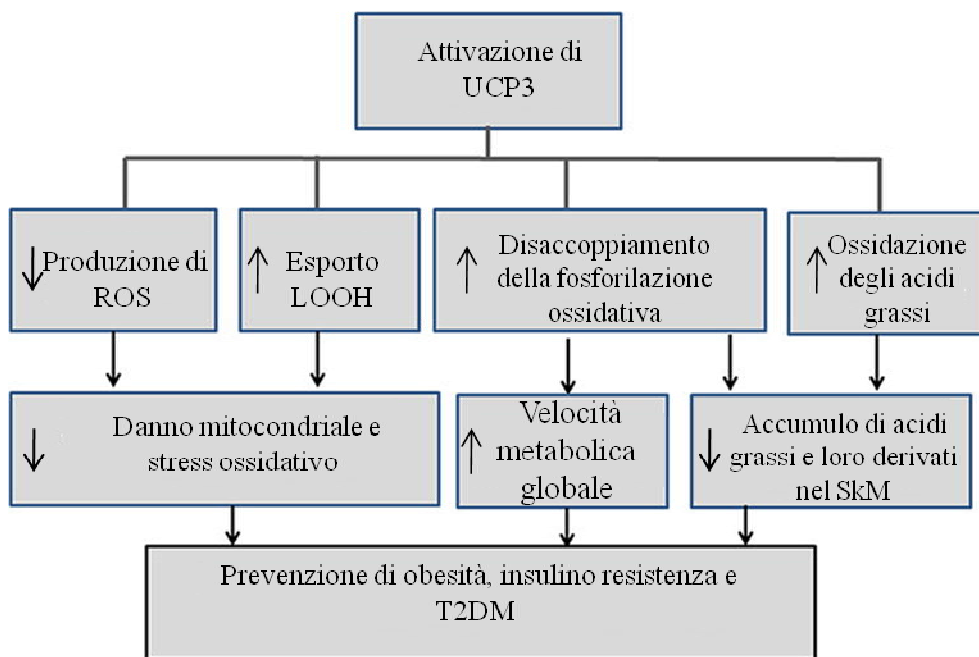


Figura 13. Diagramma riassuntivo degli effetti di UCP3 sul metabolismo energetico: Attraverso la sua azione protettiva verso il danno ossidativo mitocondriale e inducendo un aumento della velocità del metabolismo e dell'ossidazione dei grassi, svolge un ruolo di prevenzione contro l'obesità e le patologie dismetaboliche ad essa correlate.

SCOPO DEL LAVORO

I mitocondri svolgono un ruolo chiave nel controllo del metabolismo energetico e alterazioni della loro funzionalità sono frequentemente associate all'insorgenza e alla progressione di disordini metabolici tra cui obesità, steatosi epatica e insulino-resistenza. Identificare fattori in grado di attivare la funzionalità mitocondriale e comprendere il ruolo di proteine che possano regolarla è di fondamentale importanza per progettare nuovi farmaci e individuare nuovi bersagli per lo sviluppo di terapie mirate a i) ripristinare una corretta funzionalità mitocondriale e ii) migliorare l'esito di patologie caratterizzate proprio da disfunzionalità mitocondriale.

L'ormone tiroideo 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3) è uno dei principali regolatori endocrini della funzionalità mitocondriale. E' ben noto che T3 aumenta la capacità ossidativa dei tessuti, incrementando il contenuto cellulare di mitocondri (99) e stimolando i processi coinvolti nella produzione di ATP (175). Allo stesso tempo T3 attiva la termogenesi mitocondriale, permettendo che parte dell'energia liberata dall'ossidazione dei substrati non venga utilizzata per la sintesi di ATP, ma dissipata sotto forma di calore; tali effetti a livello mitocondriale si riflettono in un aumento della spesa energetica dell'animale e contribuiscono alla riduzione del peso corporeo. Per questo motivo in passato T3 è stata utilizzata come farmaco anti obesità; tuttavia, il calo ponderale osservato in seguito a somministrazione cronica di tale ormone era dovuto non solo alla riduzione della massa grassa ma anche della massa magra. La manifestazione di effetti collaterali a carico del sistema cardiovascolare, quali l'incremento della frequenza e della massa cardiaca, ha fatto poi abolire l'uso degli ormoni tiroidei come farmaci anti obesità. Negli ultimi anni è emerso che anche la diiodotironina 3,5-T2, prodotta dal metabolismo periferico di T3, è biologicamente attiva. Essa, nel ratto, è in grado di stimolare processi che contrastano l'accumulo di adiposità indotto da una dieta iperlipidica (77,81),

attraverso l'incremento dell'utilizzo degli acidi grassi come substrati metabolici (59,77,81,84) e all'aumento della spesa energetica dell'animale (57,59,63). 3,5-T2, contrasta l'insorgenza delle patologie dismetaboliche associate ad un accumulo di lipidi nei tessuti, quali insulino-resistenza (81,83) e steatosi epatica (77,81,82). Di notevole importanza dal punto di vista clinico è che 3,5-T2 non influenza la frequenza cardiaca e la massa del cuore (77,83).

Molte evidenze suggeriscono che parte degli effetti sull'incremento della velocità metabolica dell'animale e sulla prevenzione dell'accumulo di lipidi, indotto da una dieta ricca di grassi, siano il risultato della capacità di 3,5-T2 di stimolare la funzionalità dei mitocondri che ne rappresentano il principale bersaglio cellulare (59-61,63,65,76,77,81,82). Tuttavia, la comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari attraverso cui 3,5-T2 induce adattamenti energetici e metabolici richiede indagini approfondite, cruciali per considerare tale iodotironina un possibile farmaco, diretto a livello mitocondriale. In tale ambito si colloca una parte degli studi affrontati durante il dottorato di ricerca che sono stati appunto finalizzati ad individuare gli effetti della somministrazione cronica di 3,5-T2 sull'attività delle differenti vie respiratorie mitocondriali epatiche, sui singoli complessi della catena di trasporto degli elettroni (ETC), e sulla loro organizzazione in supercomplessi, in relazione alla capacità ossidativa mitocondriale. Inoltre si è ritenuto interessante comparare gli effetti di 3,5-T2 con quelli di T3.

Come modello animale si è scelto di utilizzare ratti trattati con propil-tiouracile ed acido iopanoico, in quanto l'effetto combinato delle due sostanze permette di ottenere ratti ipotiroidei che presentano l'attività degli enzimi deiodinasi inibiti (176). Pertanto, utilizzando tale modello animale è possibile attribuire gli eventuali effetti osservati alla iodotironina somministrata e non ad un suo possibile prodotto di deiodinazione (ad esempio la possibile conversione di T3 a 3,5-T2 o quella di 3,5-T2 a T1).

Per comprendere a pieno come le disfunzioni mitocondriali possano contribuire all'eziogenesi e alla progressione di patologie dismetaboliche è necessario chiarire il ruolo di proteine mitocondriali in grado di influenzare la funzionalità dell'organello e della specifica cellula, nonché l'omeostasi energetica dell'intero organismo.

Tra le proteine mitocondriali il cui ruolo non è del tutto noto si annovera UCP3.

Essa è espressa nel muscolo scheletrico, nel cuore e nei tessuti adiposi bianco e bruno. Gli studi presenti in letteratura relativi a UCP3 indicano che tale proteina è coinvolta i) nella termogenesi mitocondriale, ii) nella prevenzione dai danni ossidativi indotti dai ROS e dagli idroperossidi lipidici a livello mitocondriale, ii) nell'utilizzo degli acidi grassi come substrati metabolici (68,124,149). La distribuzione tissutale e i ruoli proposti per UCP3 suggeriscono che è potenzialmente in grado di influenzare l'omeostasi energetica e, per questo, potrebbe rappresentare un potenziale target terapeutico per contrastare obesità e le alterazioni metaboliche ad essa associate. Tuttavia, i risultati relativi al coinvolgimento di UCP3 nella regolazione del metabolismo energetico, presenti in letteratura, sono contrastanti e ancora oggetto di discussione (120). Infatti, i topi che overesprimono UCP3 sono iperfagici, magri (157) e sono protetti dall'obesità indotta dalla dieta iperlipidica, mentre quelli privi di UCP3 non sono obesi e non presentano una riduzione della velocità metabolica a riposo (127,157). Un aspetto da non sottovalutare negli studi metabolici, che può aver contribuito ai risultati discordanti riguardo a UCP3, è la temperatura standard di stabulazione degli animali, che generalmente è di 20-24°C. Infatti, è da considerare che per i topi, la temperatura di termoneutralità (temperatura alla quale il calore prodotto dal metabolismo basale dell'animale è sufficiente a mantenere costante la sua temperatura corporea) è di circa 30°C; pertanto, la loro stabulazione a temperatura standard rappresenta una costante esposizione al freddo, seppur moderata (177). A questa temperatura, infatti, i topi devono necessariamente incrementare la velocità metabolica (di circa il 50%) per

mantenere la loro temperatura corporea (178)e,plausibilmente,quelli privi di una proteina coinvolta nel metabolismo energetico, devono mettere in atto meccanismi compensatori per poterlo fare. Tali meccanismi, possono aver mascherato il ruolo svolto da UCP3 nel metabolismo energetico, dato che gli studi metabolici si sono avvalsi di topi privi di UCP3 stabulati alla temperatura standard come modello animale. Tale possibilità è stata già valutata in passato per un'altra proteina disaccoppiante quale UCP1 (179), il cui ruolo termogenico è noto da molti anni ed ampiamente accettato dalla comunità scientifica (180); infatti i topi privi di UCP1 diventano obesi solo quando stabulati a termoneutralità (179).

Inoltre, le conseguenze dell'over-espressione o della down-regolazione della proteina sono state esaminate principalmente su muscolo e cuore (130,181-184). Ricerche rivolte ad identificare l'importanza di UCP3 nella fisiologia del WAT e del BAT, due tessuti, la cui funzionalità contribuisce significativamente all'omeostasi energetica sistemica, sono praticamente assenti.

In tale contesto si inserisce una seconda parte degli studi svolti durante il dottorato di ricerca mirati ad identificare il coinvolgimento di UCP3 nell'omeostasi energetica. In linea con quanto sopra detto, ci si è avvalsi di topi WT e KO per UCP3, stabulati alla temperatura di termoneutralità, e su tale modello animale sono stati valutati i vari aspetti della funzionalità mitocondriale di tessuti che svolgono ruoli diversi e complementari nell'omeostasi energetica, quali muscolo, BAT e WAT.

Nella loro globalità le ricerche svolte durante il dottorato sono state incentrate su due aspetti differenti:

- Effetti esercitati dalla somministrazione cronica di 3,5-T2 sui mitocondri epatici

- Coinvolgimento della proteina mitocondriale UCP3 nell'omeostasi energetica

Il primo ha permesso di ampliare la conoscenza dei meccanismi cellulari e molecolari attraverso cui 3,5-T₂ induce adattamenti energetici e metabolici, indispensabile per considerare tale iodotironina un possibile farmaco, diretto a livello mitocondriale. Il secondo aspetto ha permesso di chiarire il ruolo di UCP3 nell'omeostasi energetica, fondamentale per poter considerare tale proteina un target terapeutico per contrastare le patologie dismetaboliche.

PARTE SPERIMENTALE

4. PRIMO DISEGNO SPERIMENTALE

4.1 Trattamento degli animali:

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando ratti Wistar maschi di peso corporeo compreso tra i 250 ed i 300 gr forniti dalla ditta Envigo. Gli animali sono stati alimentati con mangime commerciale ed acqua ad libitum e stabulati a 28°C con un ciclo di luce artificiale di 12 ore (12 ore di luce e 12 ore di buio).

Per gli esperimenti, i ratti utilizzati sono stati suddivisi in 4 gruppi di 6 animali ciascuno:

Gruppo Eu, costituito da ratti eutiroidei che ricevono somministrazione di veicolo ;

Gruppo Ipo, costituito da ratti resi ipotiroidei mediante la somministrazione intraperitoneale (i.p.) giornaliera di propiltiouracile (PTU) (1 mg/100 g p.c.), un composto in grado di inibire la produzione degli ormoni tiroidei (OT) e l'attività della deiodinasi di tipo I, e mediante un'iniezione settimanale di acido iopanoico (IOPA) (6 mg/100 g p.c.), un composto che inibisce la deiodinazione periferica degli OT. Il trattamento degli animali durava 4 settimane;

Gruppo Ipo+T2, costituito da ratti resi ipotiroidei, come descritto per il gruppo Ipo, ai quali è stata somministrata, giornalmente, per via i. p., 3,5-T2 alla dose di 25 µg/100 g p.c. durante l'ultima settimana di trattamento.

Gruppo Ipo+T3 costituito da ratti resi ipotiroidei, come descritto per il gruppo Ipo, ai quali è stata somministrata, giornalmente, per via i. p., T3 alla dose di 15 µg/100 g p.c. durante l'ultima settimana di trattamento.

Al momento del sacrificio, i ratti sono stati anestetizzati con una somministrazione intraperitoneale con Zoletil (20 mg/100 g p.c.), e quindi sacrificati per decapitazione.

Il fegato è stato prelevato dall'animale, pesato rapidamente e processato per

l'isolamento dei mitocondri o congelato in azoto liquido per le successive analisi molecolari.

Tutte le procedure sperimentali sugli animali sono state approvate dal comitato etico di Ateneo dell'Università Federico II e dal Ministero della Salute.

4.2 Isolamento dei mitocondri di fegato di ratto

Subito dopo il sacrificio, per isolare i mitocondri dal fegato di ratto, il tessuto è stato tagliuzzato in una soluzione isotonica (Soluzione 1) costituita da Mannitolo 220 mM, Saccarosio 70 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4 (BSA 0.1% w/v) ed è stato poi omogeneizzato nella stessa soluzione con un omogeneizzatore Potter-Elvehjem. L'omogenato è stato poi centrifugato a 500 x g per 10 minuti a 4° per allontanare i nuclei e le cellule intatte. Dopo tale centrifugazione, il supernatante, contenente i mitocondri intatti, è stato recuperato. Per ottenere i mitocondri di fegato, il supernatante è stato centrifugato a 3000 x g per 10 minuti a 4°C. Il pellet ottenuto, contenente i mitocondri, è stato lavato due volte a 3000 x g sempre per 10 minuti in Soluzione 2 (costituita da Mannitolo 220 mM, Saccarosio 70 mM, Tris-HCl 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4) e risospeso nel minimo volume.

Sui pellet mitocondriali di fegato è stato poi effettuato un dosaggio proteico.

4.3 Dosaggio proteico

La concentrazione proteica del campione è stata determinata tramite una tecnica spettrofotometrica secondo il metodo di Biorad che si avvale dell'uso di un colorante, il Dye.

Tale metodo colorimetrico, basato su quello di Bradford, prevede l'uso di un colorante che ha una particolare affinità per i residui amminiacidici basici e aromatici delle proteine, come ad esempio l'arginina. Il legame a questi

amminoacidi, provoca un viraggio del colore della soluzione di dosaggio dal rosso al blu, la cui intensità varia in base alla concentrazione delle proteine in essa contenuta.

I campioni sono stati opportunamente diluiti in acqua distillata (dH₂O) e 10 µl di tale diluizione sono stati aggiunti a 390 µl di dH₂O. Infine si aggiungono 100 µl di *Dye Reagent* e si procede alla lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 595 nm.

La concentrazione dei campioni è stata valutata in base alla retta di calibrazione ottenuta con concentrazioni note e crescenti di albumina di siero bovino (BSA).

4.4 Valutazione della respirazione mitocondriale in mitocondri di fegato di ratto

La respirazione mitocondriale è stata determinata polarograficamente usando l'elettrodo di Clark (Rank Brothers, Cambridge, UK).

In particolare, 150 µg di proteine mitocondriali sono stati incubati in 500 µl di un mezzo di respirazione costituito da 80 mM KCl, 50 mM HEPES (pH 7.0), 1 mM EGTA, 5 mM K₂HPO₄, 0.1% BSA (w/v) a 37°C, per circa 2-3 minuti; successivamente la respirazione è stata avviata aggiungendo i seguenti substrati: succinato (5 mM) in presenza di rotenone (4 µM) o glutammato (5 mM) + malato (2.5 mM). Dopo circa 4 minuti, nel mezzo di incubazione è stato aggiunto ADP (300 µM) in modo tale da indurre lo Stato 3 della respirazione (cioè la respirazione in cui la fosforilazione di ADP procede alla massima velocità). Dopo che tutto l'ADP è esaurito, si raggiunge lo Stato 4 della respirazione, stato in cui i mitocondri respirano principalmente per bilanciare la proton-leak.

4.5 Determinazione della cinetica della proton leak nei mitocondri di fegato

L'applicazione del metodo descritto da Brand e collaboratori (1990) permette di valutare la proton-leak basale dei mitocondri isolati da fegato di ratto. Questa metodica consiste nel titolare la respirazione di mitocondri che utilizzano il succinato come substrato, ed in cui la fosforilazione di ADP ad ATP è inibita dalla presenza di oligomicina, con quantità crescenti di malonato, un inibitore competitivo con il succinato per il Complesso II della catena respiratoria, la Succinico Deidrogenasi (185). E' da considerare che, in presenza di oligomicina nel mezzo, i mitocondri respirano unicamente per bilanciare il rientro di protoni verso la matrice non associata a sintesi di ATP, ossia per contrastare il processo di proton-leak. In questo caso la relazione tra Δp e consumo di ossigeno rappresenta la cinetica della proton-leak e le curve di titolazione ottenute sono una misura indiretta della conduttanza protonica.

In effetti il Δp è costituito da due componenti:

- la differenza di potenziale elettrico ai capi della membrana mitocondriale ($\Delta\Psi$);
- la differenza di potenziale chimico protonico (ΔpH).

Sperimentalmente è possibile abolire il ΔpH facendo in modo tale che il Δp possa essere rappresentato esclusivamente da $\Delta\Psi$. A tale scopo è stata utilizzata la nigericina, uno scambiatore H^+/K^+ , in grado di annullare la differenza di pH a livello della membrana mitocondriale interna. Pertanto la nigericina abolisce la differenza di potenziale chimico, trasformandola in differenza di potenziale elettrico.

In base a quanto sopra descritto, la cinetica della proton leak è stata determinata valutando simultaneamente il consumo di ossigeno, avvalendosi dell'elettrodo di Clark, ed il $\Delta\Psi$, attraverso un elettrodo sensibile al trifenilmetilfosfonio (Tpmp) (186). Per queste misure, 500 μg di proteine mitocondriali di fegato sono state poste in 1 ml di mezzo di respirazione

costituito da 80 mM KCl, 50 mM HEPES (pH 7.0), 1 mM EGTA, 5 mM K_2HPO_4 , 0.1% BSA (w/v) oligomicina (1 μ g/ml) e nigericina (80 ng/ml). I mitocondri sono stati energizzati utilizzando succinato come substrato (5mM) e la respirazione è stata titolata con dosi crescenti di malonato fino ad una concentrazione massima di 2 mM.

4.6 Determinazione delle vie respiratorie mitocondriali associate ai complessi I, II, IV e a glicerolo fosfato deidrogenasi

Le attività delle varie vie respiratorie mitocondriali sono state determinate in mitocondri congelati, poi scongelati trattati con digitonina. Questo detergente agisce esclusivamente sulla membrana mitocondriale esterna senza influenzare l'assemblaggio dei complessi respiratori mitocondriali in supercomplessi nella membrana mitocondriale interna. 2 mg di proteine mitocondriali sono stati posti nel mezzo di isolamento mitocondriale (Soluzione 1) e trattati con digitonina (4 g/g proteine). Dopodichè sono stati lasciati in ghiaccio per 15 minuti. I mitocondri sono stati poi centrifugati a 10000 x g per 10 min a 4°C e i pellet sono stati sospesi nel volume minimo di Soluzione 2. Parte del pellet è stato usato per la quantificazione delle proteine.

Per determinare le vie respiratorie associate al complesso I è stato misurato il consumo di ossigeno in presenza di NADH (donatore di elettroni al complesso I), in assenza ed in presenza di un inibitore del complesso I quale il rotenone. A tale scopo i mitocondri trattati con digitonina sono stati incubati in 500 μ l di mezzo di respirazione (80 mM KCl, 50 mM HEPES, 1 mM EGTA, 5 mM K_2HPO_4 , 0.1% BSA (w/v), citocromo c 20 μ M; pH 7.0). La respirazione è stata avviata mediante l'aggiunta di NADH (1 mM) e dopo circa 4 minuti è stato aggiunto rotenone (40 μ M). Il consumo di ossigeno sensibile al rotenone è indice dell'attività delle vie respiratorie associate al complesso I.

Per valutare le vie respiratorie associate al complesso II al mezzo di respirazione è stato aggiunto rotenone (40 μ M), per inibire il complesso I, ed il

consumo di ossigeno mitocondriale è stato misurato in presenza di Succinato (5 mM) come substrato.

Per valutare le vie respiratorie associate al complesso IV al mezzo di respirazione è stato aggiunto rotenone (40 μ M) per inibire il complesso I, antimicina (per inibire il complesso III) ed il consumo di ossigeno mitocondriale è stato misurato in presenza di N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiammina (TMPD) (0.3 mM) e Ascorbato di Sodio (4 mM).

Per valutare le vie respiratorie mitocondriali associate alla Glicerolo-3-fosfato Deidrogenasi (G3PDH), al mezzo di respirazione è stato aggiunto rotenone (40 μ M) ed il consumo di ossigeno misurato in presenza di Glicerolo-3-fosfato (G3P) (10 mM) come substrato.

4.7 Separazione dei complessi respiratori e supercomplessi attraverso (BN-PAGE) e colorazione istochimica per l'attività in gel di mitocondri di fegato di ratto

La solubilizzazione delle membrane mitocondriali con detergenti, l'elettroforesi nativa (BN-PAGE), la colorazione e la quantizzazione densitometrica dei complessi della fosforilazione ossidativa sono stati effettuati come descritto da Scaggere coll. (1995) and Lombardi e coll. (2009), apportando alcune modifiche (187,188).

In breve, i pellet mitocondriali sono stati risospesi in un buffer a bassa concentrazione salina (50 mM NaCl, 50 mM imidazolo, pH 7.0) e solubilizzati con dodecil-maltoside (per la solubilizzazione dei singoli complessi della catena) o con digitonina (4g/g, per la solubilizzazione dei supercomplessi). Dopo una centrifugazione di 15 minuti a 20000 x g, il surnatante è stato prelevato e dosato. Dopo l'aggiunta del colorante, Coomassie-G250 in acido amminoesanoico, i campioni sono stati caricati all'interno di un gel di

acrilammide in gradiente 4-13% per la corsa elettroforetica (apparato mini protean, BioRad).

Immediatamente dopo la corsa elettroforetica, le reazioni enzimatiche colorimetriche sono state effettuate come riportato in letteratura (35,189).

L'attività del Complesso I è stata determinata incubando il gel con 2mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1mg/ml NADH, e 2.5 mg/ml NTB per 5-15 minuti a temperatura ambiente. L'attività del complesso II è stata valutata in seguito all'incubazione del gel a temperatura ambiente in un buffer 100 mM Tris/glicina a pH 7.4 contenente 1 mg/mL NTB e 1 mM sodio succinato. L'attività del Complesso IV, infine, è stata valutata incubando i gel con 5 mg di 3,3'-diaminobenzidinatetraidrocloreto (DAB) sciolto in 9 mL di buffer fosfato (0.05 M, pH 7.4), 1 mL di catalasi (20 µg/mL), 10 mg citocromo c, e 750 mg di saccarosio per 10-30 minuti a temperatura ambiente. Il colore originario generato dalle reazioni delle bande corrispondenti ai complessi è stato preservato denaturando i gel in metanolo 50% / acido acetico 10% per 15 minuti e fissandoli in acido acetico 10%.

In parallelo, è stata effettuata un'altra corsa elettroforetica per colorare i gel con Comassie Blue G e ottenere il pattern globale delle bande corrispondenti ai supercomplessi respiratori. Le immagini digitali dei gel sono state acquisite come medie da un densitometro calibrato (GS-800; BioRad) e analizzate utilizzando il software Quantity One (Bio-Rad). Le aree delle bande sono state espresse come unità arbitrarie.

4.8 SDS-PAGE e Western Blot

Per ottenere i lisati mitocondriali, i mitocondri sono stati isolati come sopra descritto con la differenza che i mezzi di isolamento contenevano un cocktail di anti proteasi (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich). Il pellet mitocondriale è stato risospeso in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% sodio deossicolato, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, inibitori di

proteasi) ed è stato lasciato in ghiaccio per 1 ora al termine della quale è stato centrifugato a 17000 x g per 30 minuti a 4°C. Il supernatante ottenuto è stato utilizzato per la corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). Su tali lisati è stata determinata l'abbondanza di subunità mitocondriali specifiche per i 5 complessi respiratori, i livelli proteici di mG3PDH e i livelli proteici dell'adenina nucleotide translocasi (ANT). Gli anticorpi primari utilizzati sono stati i seguenti: AntiTotal OXPHOS Coctkail (ab110413), un cocktail di anticorpi che ha permesso di determinare le subunità CI-NDUF88, CII-SDHB, CIII-UQCRC2, CIV-MTCO1 e CV-ATP VA, anti-mG3PDH (ab 188585), anti-ANT (ab 110322) .

La colorazione della membrana con rosso Ponceau è stata utilizzata per valutare il caricamento dei pozzetti.

Il segnale è stato infine rivelato con una reazione di chemiluminescenza utilizzando il kit ECL Millipore costituito dai substrati della HRP, *Luminol Reagent* e *Peroxide* . La membrana è stata immersa nella suddetta soluzione per 2/3 minuti ed è stata rivelata la chemiluminescenza mediante l'utilizzo di un sistema di analisi di immagini, ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

Per la quantizzazione delle bande ottenute è stato utilizzato il programma informatico di elaborazione digitale delle immagini, ImageJ.

4.9 Analisi statistica

I dati riportati rappresentano la media \pm ES e sono stati analizzati attraverso l'analisi ANOVA ad una via seguita da Student-Newman-Keuls post-hoc test. Le analisi sono state effettuate attraverso il software GraphpadPrism 5 software e le differenze tra i gruppi sono state considerate statisticamente significative quando $P < 0,05$.

5. SECONDO DISEGNO SPERIMENTALE

5.1 Modello animale: Topi WT e KO per UCP3 stabulati alla temperatura di termoneutralità

Topi privi di UCP3 (background Swiss Black) , originari del laboratorio del dr. Reitman (126) e Swiss Black WT (Taconic) sono stati utilizzati.

I topi di entrambi i genotipi (WT e KO per UCP3) sono stati stabulati alla temperatura di $30 \pm 1^\circ \text{C}$ (termoneutralità) con un ciclo luce-buio di 12/12 ore e libero accesso a cibo e acqua. Per valutare i parametri metabolici quali la velocità del metabolismo a riposo (RMR), il quoziente respiratorio (RQ), la spesa energetica (EE) e l'intake energetico, sono stati utilizzati topi di circa 4 mesi di età acclimatati alla temperatura di termoneutralità per 2-3 settimane.

Per le altre analisi gli animali sono stati acclimatati per almeno 4 settimane a termoneutralità.

Il giorno del sacrificio gli animali sono stati anestetizzati con Zoletil (40mg/100g pc) e sacrificati mediante decapitazione. Il sangue e i tessuti sono stati immediatamente raccolti e trattati o congelati in azoto liquido per successive elaborazioni. Tutte le procedure sperimentali sugli animali sono state approvate dal comitato etico di Ateneo dell'Univeristà Federico II e dal Ministero della Salute.

5.2 Valutazione della spesa energetica a riposo

La spesa energetica a riposo è stata determinata attraverso calorimetria indiretta con un metabolimetro della Columbus Instruments International (USA).

Prima di effettuare le misure, i topi sono stati alloggiati nelle camere metaboliche e solo dopo circa 2 ore i parametri sono stati determinati, esclusivamente quando l'animale era a riposo da almeno 10 minuti. Il consumo di O₂ e la produzione di CO₂ sono stati determinati alla temperatura di 30 °C tra le ore 12.00 e le ore 16.00 (dato che in questo intervallo di orario la spesa energetica da parte degli animali è minima). La velocità del flusso del sistema è stato impostato a 0.5 L/min., il tempo di "purge" a 2 minuti, e il tempo di misurazione a 30 secondi ogni 12 minuti. I topi sono stati posti in camere metaboliche separate da 2.5 L con libero accesso all'acqua. I valori di VO₂ e VCO₂ sono stati ottenuti come le medie di 3 differenti misurazioni consecutive durante le quali gli animali non erano in movimento. Questi dati sono stati usati per calcolare il quoziente respiratorio (QR; VCO₂/VO₂) e la spesa energetica a riposo (REE) ([3.815 + 1.232 QR] VO₂). Il contributo dell'ossidazione degli acidi grassi alla spesa energetica a riposo è stata calcolata, come descritto in letteratura, utilizzando la seguente equazione(190):

$$[468.6 (1 - QR)]/[5.047 (QR - 0.707) + 4.686 (1 - QR)]$$

5.3 Saggio immunoenzimatico per il rilevamento dei livelli serici di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG)

Il siero è stato preparato lasciando il sangue a temperatura ambiente per circa 2h, in modo da consentirne la coagulazione. In seguito a centrifugazione a 2000 x g per 20 minuti, si separa la fase liquida del sangue dalla parte corpuscolare e si ottiene dunque il siero.

I livelli di 8-OHdG, indicatore del danno ossidativo al DNA, sono stati rilevati attraverso l'utilizzo di un kit ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA), in accordo con le istruzioni relative a tale kit.

Brevemente, il kit ha fornito piastre multipozzetto da 96w, *pre-coated* con anticorpo secondario (Goat Anti Mouse IgG) a cui è stata aggiunta una mix contenente il siero dei campioni in esame, un *tracer* (composto da Acetilcolinesterasi coniugata ad 8-OHdG) e l'anticorpo specifico per l'8-OHdG (Anti 8-OHdG).

Il dosaggio è basato sulla competizione tra l'8-OHdG e il *tracer* per l'anticorpo monoclonale Anti 8-OHdG. Il complesso Anticorpo-8-OHdG si lega all'anticorpo secondario coniugato alla base del pozzetto e, successivamente, viene aggiunto l'Ellman's Reagent, composto da Acetilcolina e 5-5'-Dithio-Bis- (2- Acido Nitrobenzoico). Dalla reazione enzimatica catalizzata dall'acetilcolinesterasi, si forma Tiocolina che reagisce con il 5-5'-Dithio-Bis- (2- Acido Nitrobenzoico) formando 5-thio-2-Acido Nitrobenzoico. Tale composto assorbe ad una lunghezza d'onda di 412 nm, pertanto l'intensità del colore, determinata spettrofotometricamente, è direttamente proporzionale alla quantità di *tracer* presente nel pozzetto che è inversamente proporzionale alla quantità di 8-OHdG libero presente all'interno del campione.

I campioni di siero sono stati analizzati in duplicato e gli standard di 8-OHdG sono stati esaminati alle concentrazioni comprese tra 10.3 e 3000 pg/mL.

5.4 Analisi istologiche e microscopia elettronica

Il giorno del sacrificio il tessuto adiposo bianco gonadico (gWAT), il muscolo scheletrico, il fegato e il tessuto adiposo bruno, sono stati prelevati e fissati in una soluzione composta dal 4% di formaldeide in buffer fosfato (PB) 0.1M, tutta la notte a 4°C. Quindi i campioni sono stati disidratati in etanolo e incorporati in blocchi di paraffina. I tessuti sono stati tagliati in sezioni seriali di 6 µm di spessore e colorati con ematossilina-eosina per le indagini morfologiche. Le analisi morfometriche, finalizzate a quantizzare l'area adipocitaria, sono state effettuate su 3 differenti vetrini di WATg trattato con

ematossilina-eosina per ogni animale e sono stati analizzati almeno 400 adipociti per ciascun animale.

Le sezioni di tessuto sono state osservate con un microscopio ottico Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments, Italia) ad ingrandimento 20X; le immagini sono state ottenute con una fotocamera Sony DS-5M e analizzate con il software ACT-2U.

Per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM), il tessuto adiposo bruno è stato dissezionato e piccoli pezzettini di circa 1mm^3 sono stati fissati in 2% glutaraldeide, 2% formaledeide in PB 0.1 M a pH 7.4, tutta la notte a 4°C. I campioni sono stati lavati con PB e fissati in 1% tetrossido di osmio per 60 minuti a 4°C; sono stati poi disidratati in acetone e inclusi in una miscela di Araldite. Sezioni semi-sottili di $2\mu\text{m}$ sono state colorate con blu di toluidina. Le sezioni sottili sono state ottenute con un ultra microtomo MTX (RMC, Tucson, AZ, USA), colorate con citrato di piombo e esaminate al microscopio elettronico a trasmissione Philips CM10 (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

5.5 Isolamento dei mitocondri dal muscolo scheletrico (SkM)

Dagli arti è stato prelevato il muscolo scheletrico, è stato rimosso il tessuto connettivo circostante, e posto in soluzione Chappel-Perry (1 mM ATP, 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5mM EGTA, pH 7.4).

Il tessuto è stato posto in soluzione 1, costituita da 220 mM mannitolo, 70 mM saccarosio, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.5% BSA fatty acid free ad un pH di 7.4 ed è stato omogeneizzato nella stessa soluzione in rapporto 1:10 (peso/volume), utilizzando un Potter-Elvehjem.

Per ottenere i mitocondri totali, ossia la popolazione subsarcolemmale e intermiofibrillare, è stata aggiunta all'omogenato proteasi Nagarse, 1mg per

grammo di tessuto. Dopo 4 minuti la stessa è stata allontanata centrifugando l'omogenato a 10000 x g per 10 minuti ad una temperatura di 4 °C.

I pellet ottenuti sono stati risospesi nel volume iniziale e centrifugati a 500 x g per 10 minuti a 4 °C. Il supernatante risultante è stato recuperato e centrifugato a 4000 x g per 10 minuti a 4°C. I pellet ottenuti, contenenti i mitocondri, hanno subito due successivi lavaggi ed infine sono stati risospesi in un volume minimo di una soluzione isotonica (Soluzione 2) costituita da 220 mM mannitolo, 70 mM saccarosio, 20 mM Tris-HCl e 1 mM EGTA ad un pH 7.4, e posti in ghiaccio fino al momento del loro utilizzo.

5.6 Determinazione della proton leak nei mitocondri isolati da SkM

La cinetica della proton leak dei mitocondri di muscolo scheletrico è stata determinata come riportato nella sezione 4.5 con qualche modifica come di seguito riportato.

In breve, 500 µg di proteine mitocondriali di muscolo sono state aggiunte ad 1 ml di soluzione, costituita da 80 mM KCl, 50 mM HEPES, 1 mM EGTA, 5 mM K_2HPO_4 , 5 mM $MgCl_2$, 1µg/ml di oligomicina, 80 ng/ml di nigericina, 10 µM di carbossiatractiloside (CAT), e BSA 0.5% (pH 7). La respirazione è stata avviata aggiungendo succinato al mezzo di incubazione ed è poi stata titolata con quantità crescenti di malonato (fino ad una concentrazione di 2mM).

Per ottenere la cinetica della proton leak indotta dagli acidi grassi, le misure sono state ripetute aggiungendo al mezzo di incubazione acido arachidonico (240 µM) che, tra gli acidi grassi a lunga catena, è il più potente attivatore di UCP3 (136).

5.7 Isolamento dei mitocondri dal BAT

Dal BAT interscapolare sono stati allontanati residui di tessuto adiposo bianco e di connettivo circostante, dopodiché il tessuto è stato immerso in soluzione 1 costituita da: 220 mM mannitolo, 70 mM saccarosio, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% BSA *fatty acid free* (pH 7.4), e tagliuzzato finemente.

Il tessuto è stato poi omogenizzato in rapporto 1:10 (peso/volume) nella stessa soluzione, con un Potter-Elvehjem. In seguito ad una centrifugazione 10000 x g per 10 minuti a 4°C, è stato rimosso il tappo di grasso presente nel supernatante, ed il pellet è stato risospeso nel volume iniziale. Dopo una successiva centrifugazione a 500 x g per 10 minuti a 4°C, il supernatante ottenuto è stato centrifugato a 8000 x g per 10 minuti a 4°C. A questo punto i pellet mitocondriali ottenuti sono stati lavati due volte e risospesi in un volume minimo di soluzione isotonica (Soluzione 2) costituita da 220 mM mannitolo, 70 mM saccarosio, 20 mM Tris-HCl e 1 mM EGTA ad un pH 7.4, e posti in ghiaccio fino al momento del loro utilizzo.

5.8 Dosaggio proteico

La concentrazione proteica del campione è stata determinata tramite una tecnica spettrofotometrica secondo il metodo di Biorad che si avvale dell'uso di un colorante, il Dye, come descritto precedentemente nel paragrafo 4.3.

5.9 Determinazione della respirazione mitocondriale in mitocondri isolati dal BAT

La respirazione mitocondriale è stata valutata polarograficamente attraverso l'elettrodo di Clark (come riportato nel paragrafo 4.4).

In breve, 100 µg di proteine mitocondriali di BAT sono stati posti nella camera di incubazione dell'elettrodo di Clark, in un volume finale di 0,5 mL di una

soluzione di respirazione costituita da 80mM KCl, 50mM Hepes, 1mM EGTA, 5mM K₂HPO₄, 5mM MgCl₂, 0.5 % BSA, a pH 7.

Nei primi tre minuti in cui i mitocondri sono immersi nella soluzione di respirazione si assiste ad un decremento di ossigeno dovuto al consumo dei substrati endogeni; successivamente si procede all'aggiunta dei diversi substrati della respirazione mitocondriale: Glicerolo-3-fosfato (G3P) 6mM , Piruvato 10 mM (+ Malato 2 mM) o Palmitoil-Carnitina 40 μM (+ Malato 2 mM).

In seguito all'aggiunta del substrato, la respirazione viene valutata anche in presenza di GDP 5mM al mezzo di incubazione. In questo modo, si verifica un'inibizione della respirazione mitocondriale dovuta all' effetto inibitorio del GDP sulle proteine disaccoppianti.

Infine è stato aggiunto il disaccoppiante carbonilcianuro-p trifluoro-metossi-fenil-idrazone (FCCP) 2 μM, un composto aromatico debolmente acido che, in quanto liposolubile, attraversa liberamente il bilayer lipidico della membrana mitocondriale interna e disaccoppia completamente la fosforilazione ossidativa, consentendo di valutare la massima capacità respiratoria mitocondriale. Il consumo di ossigeno viene espresso come nmoli di ossigeno consumate al minuto per milligrammo di proteine mitocondriali.

5.10 Valutazione della differenza di potenziale ai capi della membrana mitocondriale interna di mitocondri di BAT

Per avere indicazioni sul gradiente elettrochimico protonico mitocondriale è stata utilizzata la misura del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi$), ricavato attraverso il metodo della Safranina (191).

Nelle piastre multipozzetto (96 wells) sono stati inseriti i mitocondri isolati da BAT (70 μg di proteine mitocondriali in ciascun pozzetto) immersi nella soluzione di respirazione addizionata con Safranina 5 mM, un composto che in

virtù della sua carica elettrica si accumula nel mitocondrio in maniera proporzionale al potenziale di membrana. La misura è stata effettuata in parallelo nei 96 pozzetti, alla temperatura di 37°C, usando un lettore di piastra a fluorescenza (Infinite 200 Tecan), impostando l'intervallo di rilevazione della fluorescenza a 25 secondi.

Il segnale della safranina è stato misurato alla lunghezza di eccitazione ed emissione rispettivamente di 540±10 nm e 590± 10 nm sui mitocondri in soluzione (che non presentano potenziale di membrana a causa dell'assenza dei substrati respiratori) e su mitocondri energizzati con G3P (6mM).

La determinazione è stata anche effettuata in presenza di G3P 6mM e GDP 5mM. Successivamente sono state effettuate incubazioni simultanee in presenza di G3P e FCCP 2 µM al fine di dissipare completamente il potenziale di membrana. Quando i mitocondri vengono energizzati col substrato, si osserva una diminuzione della fluorescenza che è direttamente proporzionale al potenziale di membrana.

I risultati sono riportati come variazione assoluta tra il valore della fluorescenza misurata in presenza dei soli mitocondri e quella misurata in presenza di mitocondri e substrato. Una maggiore differenza tra questi due valori, espressi in unità relative di fluorescenza (RFU), indica un potenziale di membrana maggiore.

5.11 Valutazione del rilascio di H₂O₂ mitocondriale nel BAT

Il rilascio mitocondriale di H₂O₂ è stato valutato attraverso l'utilizzo di una sonda quale l'Amplex Red (Sigma-Aldrich). Essa è incapace di permeare i mitocondri, e, in presenza dell'enzima perossidasi (HRP) e di H₂O₂, viene ossidata e forma un composto fluorescente, quale la resorufina.

Le misurazioni sono state effettuate in piastre da 96 pozzetti, utilizzando il lettore di piastre a fluorescenza (Infinite 200 Tecan), impostando l'intervallo di misurazione a 30 secondi.

Nello specifico, 25µg di proteine mitocondriali di BAT sono stati incubati a 30°C in un volume finale di 250µl di soluzione di respirazione addizionata con Amplex Red (80µM), Catalasi (CAT) 4 unità/ml, Perossidasi Rafano (HRP) 4unità/ml, Superossido dismutasi (SOD) 56 unità/mL. L'inizio della reazione è avvenuto con l'aggiunta di diversi substrati parallelamente: Piruvato 10mM (+ malato 2mM), Palmitoil-carnitina 40µM (+ malato 2mM) o G3P (6mM) . La perossidasi HRP catalizza la reazione tra Amplex e H₂O₂, in presenza di SOD aggiunta esogenamente, che porta alla produzione di resorufina. Tale composto fluorescente viene rilevato a lunghezze d'onda di eccitazione/emissione di 540 ± 25 nm e 590 ± 25 nm, rispettivamente. Dall' intensità della fluorescenza prodotta dalla resorufina è stato possibile risalire alla quantità di H₂O₂ rilasciata dai mitocondri, grazie all'allestimento di una curva standard di H₂O₂. In ogni esperimento, alla fluorescenza ottenuta in presenza di substrato è stato sottratto il *background*, considerato come la fluorescenza ottenuta in assenza di substrato e la velocità di produzione di perossido di idrogeno, infine, è stata espressa come nmol H₂O₂/min/mg proteine mitocondriali.

5.12 Determinazione dell'electron leak mitocondriale del BAT

L'electron leak, definita come la percentuale di elettroni che sfuggono alla catena per ridurre direttamente l'O₂ ad O₂⁻ , è stata determinata calcolando il rapporto tra la produzione mitocondriale di H₂O₂ e il consumo di ossigeno valutato in presenza di G3P, determinati come descritto precedentemente (paragrafi 5.11 e 5.9 rispettivamente).

5.13 Misura degli idroperossidi lipidici in mitocondri di BAT

Per valutare la concentrazione di idroperossidi lipidici presenti a livello mitocondriale è stato utilizzato un metodo spettrofotometrico che permette di rilevare gli idroperossidi lipidici (LOOH) attraverso l'utilizzo di due reazioni accoppiate.

L'enzima glutatione perossidasi (GPX) catalizza la prima reazione:



dove LOH è l'alcol corrispondente dell'idroperossido lipidico.

Nella seconda reazione l'enzima glutatione reduttasi (GR) catalizza la seguente reazione:



Dalla riduzione dell'assorbanza a 340 nm, è possibile dedurre i livelli di LOOH.

Nello specifico, 40 µg di proteine mitocondriali sono stati incubati in una soluzione di TRIS HCl 124 mM, EDTA 0.2 mM a pH 7.6, alla quale è stata aggiunta Catalasi (17500 unità/ml), lasciata agire per 5 minuti circa a temperatura ambiente.

La catalasi rimuove l'H₂O₂ presente nel mezzo, in quanto anche questa è substrato della glutatione perossidasi, in modo tale che vengano ridotti dall'enzima unicamente i lipidi idroperossidi.

In seguito, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti NADPH (2mM), GPX (2500 nmoli) e GSH (4.25 mM). Tale aggiunta determina l'inizio della reazione che è stata fatta proseguire per non meno di 10 minuti a 30°C al termine dei quali è stato misurato il valore dell'assorbanza a 340 nm.

In seguito, in ogni pozzetto è stato aggiunto l'enzima GR (100unità/ml) e dopo ulteriori 10 minuti di incubazione a 30°C, è stato misurato il valore di assorbanza a 340 nm per determinare la quantità di NADPH ossidato.

5.14 Preparazione dei campioni per l'analisi dei campioni mediante SDS-PAGE

Al fine di estrarre le proteine dai campioni da analizzare per la successiva elettroforesi su gel di poliacrilammide, i tessuti da processare (BAT e WATg) sono stati dapprima pesati e successivamente posti in una soluzione, il RIPA Buffer, costituito da: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,5% Sodio desossicolato, 0,1% SDS e 1% Triton X-100 ad un pH 8, con aggiunta di inibitore di proteasi (*ProteaseInhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich) e 1 mM Na₃VO₄ (inibitore delle fosfatasi). In particolare, circa 100 mg di ciascun tessuto sono stati posti in rapporto 1:10 (w/v) in tale buffer.

Il tessuto è stato poi tagliuzzato finemente e successivamente omogenizzato mediante l'uso del polytron (IKA ULTRA-TURRAX Homogenizer T-18) per circa 15 secondi a velocità 4. I campioni omogenizzati sono stati lasciati per circa 1 ora in ghiaccio per consentire al RIPA buffer di agire dopodichè sono stati centrifugati per 20 minuti a 17000 x g. Eliminato il tappo di grasso, l'infranatante è stato aliquotato e congelato per le successive analisi di SDS-PAGE e Western Blot, come descritto nel paragrafo 4.8.

Per le analisi biochimiche di Western Blot sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: Anti-UCP3 (Abcam, Ab 3477), Anti-UCP1 (Millipore, Ab1426), Anti- PGC1- α (Millipore, Ab 3242), Anti- G3PDH (Abcam, Ab188585), Anti-SOD2 (Abcam, Ab118340), Anti-Catalasi (Abcam; Ab50434), Anti- GPX-4 (Abcam Ab125066), Anti Total OXPHOS Coctkail (Ab 110413).

Inoltre, per la normalizzazione delle bande ottenute, ciascuna membrana è stata poi incubata per un normalizzatore, in particolare è stato utilizzato un anticorpo primario anti VDAC (Genetex, GTX114187) e anticorpo secondario anti rabbit (KPL074-1506) per i lisati mitocondriali.

Per i lisati totali di tessuto sono stati utilizzati come normalizzatori l' α -Tubulina e la β -Actina, e quindi l'Anti- α -Tubulina (Abcam Ab4074) e l'Anti- β -Actina (Sigma-Aldrich, A2228) come anticorpi primari e anti rabbit (KPL074-1506) e anti mouse (Abcam, Ab6728) come anticorpi secondari, rispettivamente.

5.15 Separazione dei complessi respiratori e supercomplessi attraverso (BN-PAGE) e colorazione istochimica per l'attività in gel dei complessi mitocondriali e della mG3PDH in mitocondri di BAT

L'attività in gel dei complessi I e IV della catena respiratoria mitocondriale e della mG3PDH è stata determinata come descritto in letteratura da Scagger (1995) e Lombardi (2009), apportando modifiche come riportato nel paragrafo 4.7 (187,188).

In particolare l'attività in gel della mG3PDH è stata determinata incubando il gel derivante dalla BN-PAGE, con 5 mM Tris HCl (pH 7.4), 3 mM MgCl₂, 0.88 mM menadione, 1.2 mM Nitro Blue Tetrazolium (NTB), 1.5 μ M rotenone, 2 μ M KCN e 10 mM G3P per 30 minuti - 1 h a temperatura ambiente.

L'attività del Complesso I è stata determinata incubando il gel con 2mM TrisHCl (pH 7.4), 0.1 mg/ml NADH, e 2.5 mg/ml NTB per 5-15 minuti a temperatura ambiente. L'attività del Complesso IV, infine, è stata valutata incubando il gel con 5 mg di 3,3'-diamino-benzidina-tetraidrocloreto (DAB) sciolto in 9 mL di buffer fosfato (0.05 M, pH 7.4), 1 mL di catalasi (20 μ g/mL), 10 mg citocromo c, e 750 mg di saccarosio per 10-30 minuti a temperatura ambiente. Il colore generato dalle reazioni delle bande

corrispondenti ai complessi è stato preservato denaturando il gel in metanolo 50% / acido acetico 10% per 15 minuti e fissandolo in acido acetico 10%.

In parallelo, è stata effettuata un' altra corsa elettroforetica per colorare i gel con Comassie Blue G e ottenere il pattern globale delle bande corrispondenti ai supercomplessi respiratori. Le immagini digitali dei gel sono state acquisite come medie da un densitometro calibrato (GS-800; BioRad) e analizzate utilizzando il software Quantity One (Bio-Rad). Le aree delle bande sono state espresse come unità arbitrarie.

5.16 BN-SDS-PAGE bidimensionale (2D) e identificazione delle proteine attraverso l'analisi di spettrometria di massa (MS)

In seguito alla corsa elettroforetica in condizioni native (BN-PAGE), monodimensionale, le bande native sono state ritagliate dal gel, equilibrate in SDS 1% e poste orizzontalmente in un'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (2D-SDS-PAGE) al 16% per una separazione in seconda dimensione (192). Gli spot proteici ottenuti sono stati visualizzati in seguito a colorazione con nitrato d'argento. In seguito, gli spot sono stati a loro volta escissi dal gel in seconda dimensione (il gel è stato alchilato con iodoacetamide), e digeriti con tripsina come precedentemente riportato (193). Le miscele di peptidi sono state dissalate mediante puntali μ ZipTipC18 (Millipore) prima della cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa mediante ionizzazione electrospray (nLC-ESI-LIT-MS / MS), eseguita su uno spettrometro di massa LTQ XL equipaggiato con nano sistema HPLC RSLC UltiMate 3000 (*Thermo Fischer Scientific*, USA). I peptidi sono stati separati su una colonna Easy C18 (100 \times 0,075 mm, 3 μ m) a una portata di 300 nL / min usando un'eluizione a gradiente con acqua e acetonitrile in acido formico allo 0,1% come già riportato (194).

Gli spettri di massa sono stati acquisiti nell'intervallo di valori m/z di 400-1400 e l'acquisizione MS/MS automatica dipendente dai dati è stata applicata ai tre ioni più abbondanti (Top 3), consentendo l'esclusione dinamica con conteggio ripetuto 1 e durata dell'esclusione 60s. La finestra di isolamento di massa e l'energia di collisione per le frammentazioni di peptidi sono state impostate su m/z 3 e 35%, rispettivamente. I dati grezzi dell'analisi nLC-ESI-LIT-MS / MS sono stati cercati da MASCOT v2.6.1, (Matrix Science, Regno Unito) su un database UniProt con filtro *Mus musculus taxonomy* (17147 sequenze, 10/2017). I seguenti parametri sono stati usati per l'identificazione delle proteine: valore di tolleranza della massa di 1.8 Da e 0.8 Da per i precursori e i frammenti ionici rispettivamente; la tripsina come enzima proteolitico con un numero massimo di siti di taglio mancanti di 2; Carbamidometilazione della cisteina come modifica fissa, ossidazione della metionina e formazione di Gln->piroglu come modifiche variabili. I candidati alle proteine con almeno 2 sequenze peptidiche significativamente abbinate (valore di aspettativa <0,05) con punteggio ionico > 30 sono stati ulteriormente considerati per l'assegnazione proteica definitiva dopo la visualizzazione e la verifica manuale degli spettri.

5.17 Preparazione dei lisati tissutali di WATg di topi WT e KO per UCP3 per la valutazione dell'attività della citocromo c ossidasi (COX) e della Fosfoftuttochinasi (PFK)

Per la misura dell'attività degli enzimi COX e PFK sono stati preparati i lisati tissutali di WATg. In particolare, 1 grammo di tessuto è stato omogenizzato, mediante l'uso del polytron (IKA ULTRA TURRAX Homogenizer T-18), in 2,5 mL di soluzione 1 costituita da Mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4, addizionata con inibitori di proteasi.

I campioni sono stati lasciati in ghiaccio per 30 minuti per consentire allo strato di grasso di aggregarsi in superficie ed essere rimosso. L'omogenato è stato poi centrifugato a 17000 x g e l'infranatante ricavato è stato recuperato e utilizzato per le successive analisi.

5.18 Misurazione dell'attività dell'enzima Citocromo c ossidasi (COX) nel WATg

Al fine di valutare la massima capacità ossidativa del WATg isolato da topi WT e KO per UCP3, in tale tessuto si è determinata l'attività della citocromo c ossidasi (complesso IV della catena respiratoria) per via polarografica grazie all'utilizzo dell'ossigrafo ad alta risoluzione, Oxygraph 2-k, (OROBOROS instruments); tale strumento, come l'elettrodo di Clark, precedentemente descritto nel paragrafo 4.4, consente di rilevare le variazioni del consumo di ossigeno all'interno del campione di interesse, ma si distingue dagli approcci convenzionali per la sua alta risoluzione.

Per valutare l'attività dell'enzima citocromo c ossidasi, i lisati di WATg sono stati solubilizzati in Lubrol (in rapporto 1:1), un detergente blando che permette di smascherare il complesso IV localizzato nella membrana mitocondriale interna. Al termine dell'incubazione, effettuata per 30 minuti in ghiaccio, 15 μ L di tale diluizione sono stati inseriti nella soluzione di respirazione presente nella camera dell'ossigrafo composta da Citocromo c (30 μ M), rotenone 4 μ M, dinitrofenolo 500 μ M, malonato 10 mM, Hepes 75 mM, pH 7.4. Si è lasciato stabilizzare il sistema per circa 15 minuti e poi è stato aggiunto il substrato della reazione che ha permesso di determinare il consumo di ossigeno.

La presenza del rotenone nel mezzo ha permesso di inibire il complesso I della catena di trasporto degli elettroni, il malonato ha consentito l'inibizione del

complesso II. Il Dinitrofenolo, un disaccoppiante, ha permesso di abolire il Δp , il citocromo c è, invece, il substrato della COX ma in soluzione si trova in forma ossidata, pertanto in assenza di un sistema che ne comporta la riduzione non è in grado di trasferire gli elettroni al complesso. Affinché il citocromo c sia in forma ridotta, nel mezzo di respirazione sono stati aggiunti TMPD (150 μM) ed Ascorbato (500 μM) che hanno avviato il consumo di ossigeno. Il primo è un donatore artificiale di elettroni che riduce il Citocromo c, e il secondo, grazie alla sua attività antiossidante, rigenera il sistema, riducendo il TMPD.

Per tenere conto dell'autossidazione dell'ascorbato, non attribuibile all'attività enzimatica della COX, le misure sono state effettuate sia in presenza del lisato di WATg, che in sua assenza. Il valore dell'attività enzimatica è stato ottenuto sottraendo dal consumo di ossigeno determinato in presenza di omogenato, quello ottenuto in sua assenza.

5.19 Misurazione dell'attività dell'enzima Fosfofruttochinasi (PFK) in lisati tissutali di WATg

Per la valutazione dell'attività della Fosfofruttochinasi (PFK), è stato utilizzato un metodo spettrofotometrico che consente di valutare l'ossidazione di NADH a NAD^+ seguendo la riduzione di assorbanza a 340 nm, e quindi, indirettamente, l'attività dell'enzima all'interno del campione analizzato. Il mezzo di incubazione è costituito da Tris-HCl 50 mM, MgCl 6 mM, KCl 250 mM, ATP 1 mM, AMP 2 mM, KCN 1 mM, pH 8.2. Il KCN è necessario per escludere l'ossidazione aspecifica del NADH. Per ogni campione, inoltre, sono stati aggiunti gli enzimi coinvolti nel processo glicolitico quali alfa glicerolo 3 fosfato deidrogenasi (G3PDH) 0.16 U/ml, aldolasi 0.9 U/ml, triosofosfato isomerasi (TPI) 9.6 U/ml ed, infine NADH 0.17 mM e Fruttosio-6-P 1.5 mM. Parallelamente in alcuni pozzetti non è stato inserito il Fruttosio-6-P e tali pozzetti sono stati considerati come controlli. Le letture dell'assorbanza a 340 nm sono state effettuate con il lettore di piastre multipozzetto (Infinite 200

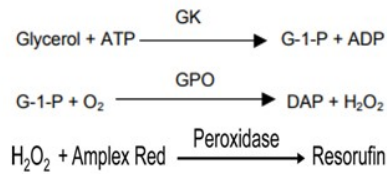
Tecan), alla temperatura fissa di 37°C per 5 minuti ad intervalli di lettura di 60 secondi. I dati sono stati espressi come pmoli di NADH prodotte al minuto per milligrammo di proteine.

5.20 Determinazione del rilascio di glicerolo da parte del tessuto adiposo bianco gonadico (WATg)

Per valutare l'entità del processo lipolitico nel tessuto adiposo bianco gonadico (WATg), è stata determinata la quantità di glicerolo, prodotto dall'idrolisi dei trigliceridi, da parte del tessuto sia in condizioni basali che sotto lo stimolo dell'Isoproterenolo, farmaco simpatico-mimetico attivo sui recettori β -adrenergici, capace quindi di stimolare la lipolisi negli adipociti. 100 mg di tessuto sono stati posti in 1 ml di mezzo di coltura cellulare DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) a cui è stata aggiunta albumina di siero bovino (BSA) al 2% (w/v), sia in presenza che in assenza di Isoproterenolo (100 nM). I campioni sono stati rapidamente ossigenati e incubati a 37°C sotto agitazione per un'ora. Terminata l'incubazione è stato prelevato il mezzo di incubazione privo di tessuto e utilizzato per le successive analisi. 10 μ L di ciascun campione sono stati addizionati al *Free Glycerol Assay Reagent* (SigmaAldrich) insieme ad Amplex red (100 μ M) e la concentrazione del glicerolo è stata determinata tramite confronto con la curva standard.

Tale metodica prevede la successione delle seguenti reazioni enzimatiche accoppiate: il glicerolo è fosforilato dall'adenosina-5'-trifosfato (ATP) formando glicerolo-1-fosfato (G1P) ed adenosina-5'-difosfato (ADP), in una reazione catalizzata dalla glicerolochinasi (GK). Il G1P è poi ossidato dall'enzima glicerolo fosfato ossidasi (GPO) a di-idrossi-acetone-fosfato (DAP) e perossido di idrogeno (H_2O_2). La riduzione del H_2O_2 ad H_2O da parte dell'HRP, ossida il reagente Amplex Red che produce un composto fluorescente, la resorufina, rilevata con una lunghezza d'onda di eccitazione 545 nm e

lunghezza d'onda di emissione 590 nm attraverso un lettore di piastra a fluorescenza (Infinite 200 Tecan).



La fluorescenza del campione è direttamente proporzionale alla concentrazione di glicerolo in esso presente, indice del processo glicolitico.

5.21 Determinazione dello stress ossidativo attraverso il metodo fluorimetrico della 2',7'-di-idro-clorofluorescina-diacetato (DCFH-DA) all'interno di lisati tissutali di WATg

Al fine di valutare il grado di stress ossidativo all'interno di lisati tissutali di WAT gonadico di topi WT e KO per UCP3, è stato utilizzato il metodo fluorimetrico della 2',7'-di-idro-clorofluoresceina diacetato (DCFH-DA). Tale composto entra all'interno delle cellule dove, ad opera delle esterasi citosoliche, viene deacetilato generando un composto non fluorescente, la DCFH, che, reagendo con le specie reattive dell'ossigeno, si ossida e forma un composto altamente fluorescente, il DCF; il DCF prodotto è quindi indice dei livelli di ROS presenti nel campione di interesse.

I campioni sono stati omogenizzati all'interno del Locke's buffer costituito da: NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, NaHCO₃ 3.6 mM, CaCl₂ 2mM, D-Glucosio 10mM, HEPES 5 mM a pH 7.4 e 225 µl di omogenato sono stati aggiunti in ciascun pozzetto di piastre da 96 pozzetti.

La DCFH-DA è stata aggiunta ai campioni alla concentrazione di 10µM e la reazione ha avuto inizio con l'aggiunta di solfato ferroso ammonico esaidrato Fe(NH₄)₂ (SO₄)₂. Il segnale del DCF è stato rilevato mediante spettroscopia a

fluorescenza, alla lunghezza d'onda di eccitazione/ emissione di 485nm/530 nm, e le letture sono state effettuate per 3 cicli cinetici ad intervalli di 10 minuti per un totale di 30 minuti. E' stata allestita una curva standard di DCF, grazie alla quale è stato possibile estrapolare i valori di concentrazione di DCF nei campioni, indice dei livelli ROS.

RISULTATI

6. RISULTATI DEL PRIMO DISEGNO SPERIMENTALE

6.1 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidei sull'assunzione di cibo e sul guadagno di peso corporeo

L'ipotiroidismo ha indotto una significativa riduzione dell'assunzione di cibo e del guadagno di peso corporeo dei ratti (-27% e -52% vs. controlli eutiroidei, rispettivamente) (Tabella 1). La somministrazione di T3 durante l'ultima settimana di trattamento non ha comportato una riduzione del peso corporeo dell'animale mentre quella di 3,5-T2 ha indotto un aumento significativo di quest'ultimo. Per quanto concerne l'assunzione di cibo, nonostante si sia riscontrata una tendenza all'aumento di food intake, le variazioni non risultano essere significative.

Tabella 1: Effetto della somministrazione di iodotironine a ratti ipotiroidei sul guadagno di peso corporeo e sull'assunzione di cibo.

	Eu	Ipo	Ipo+T2	Ipo+T3
Guadagno di peso corporeo durante l'intero periodo di trattamento (g)	100 ± 3 a	48 ± 4 b	53 ± 4 b	46 ± 3 b
Guadagno di peso corporeo durante l'ultima settimana di trattamento(g)	18 ± 2 a	1 ± 0.2 b	9 ± 2 c	-5 ± 3 b
Assunzione di cibo durante l'intero periodo di trattamento (g)	498 ± 12 a	360 ± 10 b	395 ± 18 b	400 ± 15 b

Assunzione di cibo durante l'ultima settimana di trattamento (g)	110 ± 7 a	68 ± 3 b	82 ± 3 b	80 ± 3 b
--	-----------	----------	----------	----------

I valori rappresentano la media ± ES di 6 differenti esperimenti. Lettere diverse indicano che le differenze tra i gruppi sono statisticamente significative (P<0,05)

6.2 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidei sui parametri respiratori mitocondriali e sulla cinetica della proton-leak determinata in mitocondri isolati da fegato

La funzionalità dei mitocondri di fegato, provenienti dai quattro gruppi di animali presi in esame, è stata determinata utilizzando due diversi substrati respiratori quali il Succinato (in presenza di rotenone) e il Glutammato (in presenza di malato) sia in condizioni sperimentali in cui i mitocondri non effettuano sintesi di ATP (stato 4) che condizioni in cui tale processo procede alla massima velocità (stato 3). Inoltre è stato calcolato il controllo respiratorio, ottenuto dal rapporto tra stato 3 e stato 4, indice dell'efficienza della fosforilazione ossidativa.

In presenza di Succinato (+rotenone) come substrato, nei ratti ipotiroidei si è riscontrata una significativa riduzione sia dello stato 3 che dello stato 4 rispetto ai controlli eutiroidi (-25% e -30%, rispettivamente) (Tabella 2). La somministrazione di 3,5-T2 o di T3 ai ratti ipotiroidei ha indotto un incremento dei suddetti parametri, ma tra le due iodotironine la T3 mostra un effetto maggiore. Non sono state riscontrate differenze nel rapporto del controllo respiratorio tra i gruppi analizzati.

In presenza di Glutammato (+malato) come substrato, nei ratti ipotiroidei è stata osservata una significativa riduzione sia di stato 3 sia di stato 4 rispetto ai controlli eutiroidi. Solo la somministrazione di T3 a ratti ipotiroidei è risultata efficace nello stimolare respirazione mitocondriale (Tabella 2).

Tabella 2: Effetto della somministrazione di iodotironine a ratti ipotiroidei sulla velocità di respirazione mitocondriale

	Eu	Ipo	Ipo+T2	Ipo+T3
Succinato + rotenone				
Stato 4 (ngAtomi O/min mg prot)	36 ± 3 a	27 ± 2 b	38 ± 2 a	45 ± 2 c
Stato 3 (ngAtomi O/min mg prot)	270 ± 15 a	190 ± 12 b	258 ± 9 a	300 ± 12 a
RCR	7.5 ± 0.8	7.1 ± 0.8	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
Glutammato + malato				
Stato 4 (ngAtomi O/min mg prot)	13.1 ± 0.8 a	10.1 ± 0.8 b	11.0 ± 0.9 b	15.0 ± 0.7c
Stato 3 (ngAtomi O/min mg prot)	75.7 ± 3.6 a,c	54.7 ± 3.3 b	62.7 ± 6.8 a,b	84.8 ± 6.4 c
RCR	5.8 ± 0.2	5.6 ± 0.5	5.7 ± 0.5	5.7 ± 0.5

I valori riportati rappresentano la media ± ES di 6 differenti esperimenti. Lettere differenti indicano che le variazioni tra i gruppi sono statisticamente significative ($P < 0,05$).

Nei mitocondri isolati da fegato di ratti ipotiroidei è stata riscontrata una significativa inibizione della cinetica della proton-leak rispetto ai controlli eutiroidei. Infatti, in condizioni sperimentali in cui non si verifica la fosforilazione di ADP ad ATP e i mitocondri respirano per bilanciare la proton leak, i mitocondri isolati da ratti ipotiroidei respirano meno rispetto a quelli isolati da ratti eutiroidei per mantenere lo stesso valore del potenziale di membrana ($\Delta\Psi$) (Figura 14A). La somministrazione di 3,5-T2 a ratti ipotiroidei non ha comportato variazioni della cinetica della proton-leak, in quanto le curve ottenute da mitocondri isolati da ratti ipotiroidei si sovrappongono con quelle ottenute da ratti trattati con 3,5-T2. Un dato importante da considerare è che la curva relativa a questi ultimi, però, si estende verso valori più alti di

respirazione e di $\Delta\Psi$, indicando una incrementata attività delle reazioni coinvolte nell'ossidazione dei substrati. Al contrario di 3,5-T2, la somministrazione di T3 a ratti ipotiroidei ha prodotto una stimolazione della cinetica della proton leak (Figura 14A); infatti, per mantenere lo stesso valore di $\Delta\Psi$, i mitocondri provenienti dai ratti trattati con T3 respirano di più rispetto a quelli provenienti da ratti ipotiroidei ed eutiroidei. Per quantificare le differenze osservate nella conduttanza protonica mitocondriale tra i quattro gruppi di animali, sono stati considerati i valori della respirazione corrispondenti al più alto valore di potenziale comune a tutte le cinetiche (nel caso specifico 185 mV (linea tratteggiata di Figura 14A)). L'ipotiroidismo ha comportato una riduzione della proton leak del 61% rispetto ai ratti eutiroidei, mentre, in seguito a somministrazione di T3 tale parametro è incrementato di circa il 450% rispetto ai ratti ipotiroidei e di circa il 120% rispetto ai controlli eutiroidei. Per valutare se ANT potesse sottendere gli effetti dell'ipotiroidismo e della T3 sulla proton leak, ne sono stati valutati i livelli proteici mitocondriali. Come è possibile osservare in figura 14B, il contenuto mitocondriale di ANT è significativamente ridotto nello stato ipotiroideo (-35% vs. Eu). La somministrazione di T3 ai ratti ipotiroidei ha comportato un significativo aumento dei livelli di ANT (+ 90% vs. Ipo) ed il ripristino dei valori osservati nei mitocondri isolati dai ratti eutiroidei (Figura 14B). Tali dati suggeriscono che ANT può mediare gli effetti indotti da T3 sulla proton leak.

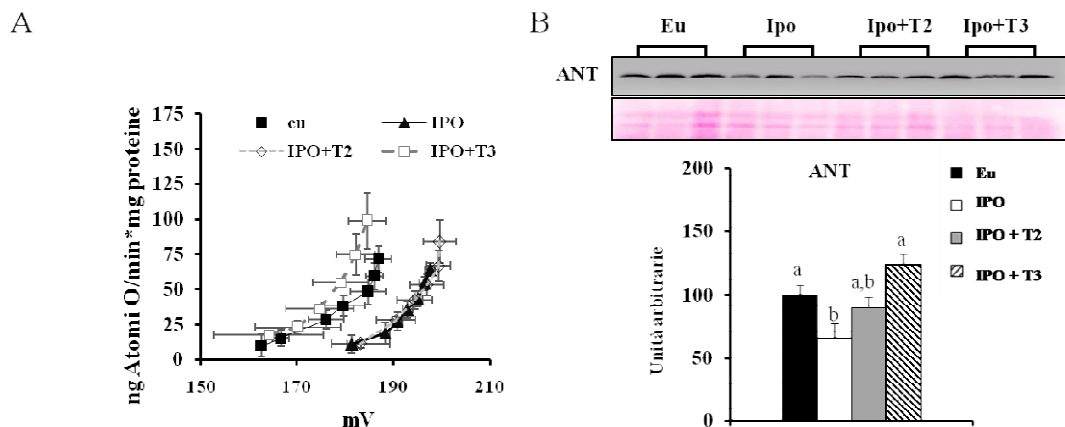


Figura 14. A) Effetto della somministrazione delle iodotironine a ratti ipotiroidici sulla cinetica della proton leak di mitocondri di fegato. I valori rappresentano la media \pm ES di 4 esperimenti indipendenti. **B) Western Blot rappresentativo dei livelli di adenine nucleotide translocasi determinati in mitocondri di fegato.** I dati rappresentano la media \pm ES di 5-6 differenti esperimenti. Il valore medio ottenuto dai ratti eutiroidici è stato impostato come 100. Colonne marcate con lettere differenti indicano che le differenze tra i gruppi sperimentali sono statisticamente significative ($P < 0,05$).

6.3 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidici sulle vie respiratorie mitocondriali associate ai complessi I, II, IV e G3PDH determinate in mitocondri di fegato

E' stato poi valutato se l'ipotiroidismo e la somministrazione di iodotironine potessero influenzare le vie respiratorie mitocondriali associate ai vari complessi della catena di trasporto. A tale scopo è stato determinato il consumo di ossigeno in mitocondri trattati con digitonina, in presenza di substrati ed inibitori specifici dei vari complessi. In particolare, per determinare l'attività delle vie respiratorie associate al complesso I, si è utilizzato NADH come substrato (in quanto dona elettroni direttamente al predetto complesso) ed è stato poi determinato il consumo di ossigeno sensibile al rotenone, un inibitore del complesso I.

Come è possibile osservare in Figura 15A le *pathway* respiratorie associate al complesso I sono significativamente inibite dall'ipotiroidismo (-35% vs. Eu), le

stesse non sono influenzate dalla somministrazione di 3,5-T2, ma risultano incrementate in seguito a somministrazione di T3 (+145% vs. Ipo e + 60% vs. Eu). Per valutare eventuali variazioni dell'attività delle vie respiratorie associate al complesso II della catena di trasporto degli elettroni, il consumo di ossigeno mitocondriale è stato determinato utilizzando Succinato come substrato in presenza di rotenone (inibitore del complesso I). Con l'impiego di tale substrato si è evidenziata una lieve ma significativa diminuzione dell'attività del complesso II negli animali ipotiroidei rispetto ai controlli eutiroidei (-17%), ma tale attività è poi risultata incrementata in seguito alla somministrazione di 3,5-T2 e T3 (Figura 15B). In particolare, quando si considera T3, la respirazione mitocondriale raggiunge livelli superiori a quelli osservati nei controlli eutiroidei (+66% vs. Ipo e +35% vs. Eu).

Per valutare l'attività delle vie respiratorie associate al complesso IV della catena di trasporto elettronica, come substrato per la respirazione è stato utilizzato TMPD, ed allo stesso tempo è stato escluso il coinvolgimento degli altri complessi respiratori, grazie alla presenza di rotenone (inibitore del complesso I) e antimicina (inibitore del complesso III). I dati ottenuti hanno evidenziato che i mitocondri di fegato di animali ipotiroidei presentano una riduzione dell'attività del complesso IV di circa il 37%, rispetto ai controlli eutiroidei. La somministrazione di 3,5-T2 non ha influenzato l'attività delle vie respiratorie associate al complesso IV, mentre quella di T3 ha indotto un incremento dell'attività del predetto complesso del 38%, rispetto alla condizione di ipotiroidismo (Figura 15C).

Infine, le vie respiratorie associate alla glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (G3PDH) sono state analizzate utilizzando glicerolo 3 fosfato (G3P) come substrato, in presenza di rotenone. Come è possibile osservare in Figura 15D, in presenza di G3P, l'ipotiroidismo ha comportato una significativa riduzione del consumo di ossigeno (-60% vs. Eu) mentre la somministrazione delle iodotironine ha causato un aumento significativo del suo valore. In particolare, 3,5-T2, producendo un incremento del consumo di ossigeno del 165% rispetto

agli animali ipotiroidici, ha ripristinato i valori osservati nei ratti eutiroidici. T3 ha mostrato un effetto maggiore rispetto a 3,5-T2, infatti i valori osservati negli animali trattati con T3, sono risultati incrementati di circa 6 e 3 volte rispetto a quelli osservati rispettivamente nei ratti ipotiroidici ed eutiroidici.

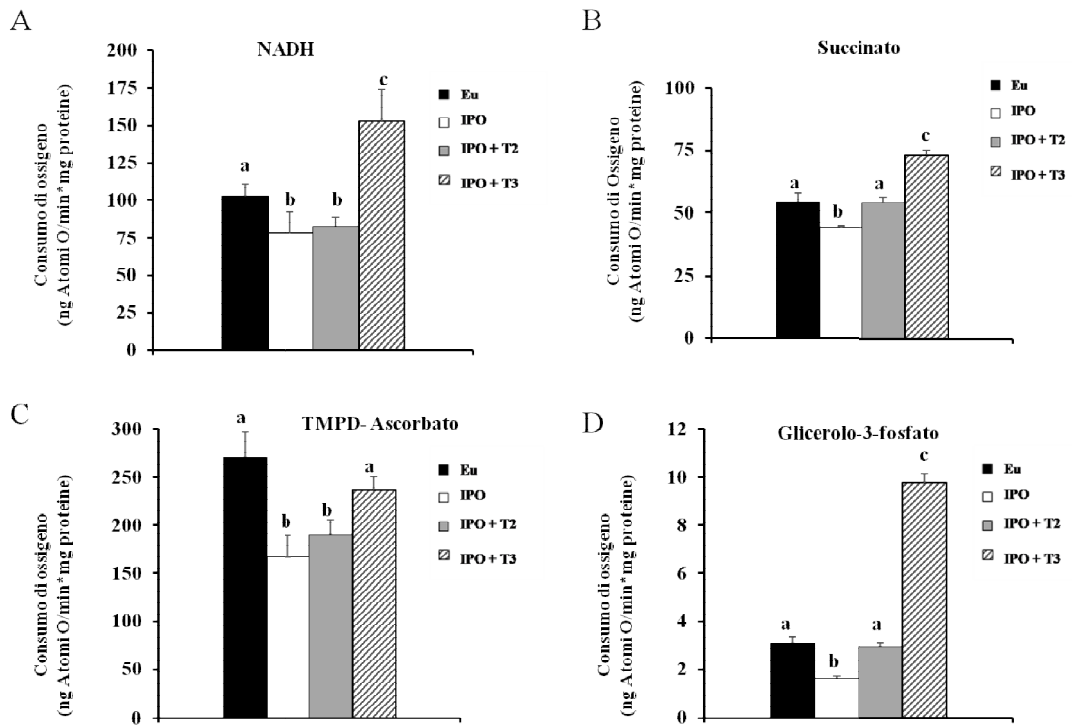


Figura 15. Effetto della somministrazione delle iodotironine sulle vie respiratorie mitocondriali in fegato di ratto. Sono state valutate le vie respiratorie associate al complesso I (A), al complesso II (B), al complesso IV (C), e alla G3PDH (D). I dati rappresentano la media \pm ES di 5-6 differenti esperimenti. Colonne marcate con lettere differenti indicano che le differenze tra i gruppi sono statisticamente significative ($P < 0,05$).

6.4 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidei sull'attività in gel dei complessi respiratori determinata in mitocondri isolati da fegato

Per approfondire gli effetti della somministrazione delle iodotironine sulle proprietà biochimiche dei mitocondri epatici, i complessi respiratori mitocondriali ottenuti dai vari gruppi di animali sono stati estratti con due detergenti differenti, il dodecil-maltoside, che permette di separare i complessi respiratori in forma nativa, e un detergente più blando quale la digitonina, che preserva le interazioni tra i vari complessi respiratori che mantengono l'organizzazione in supercomplessi. Gli estratti proteici sono stati sottoposti a BN-PAGE (Figura 16 e Figura 17), a cui è seguita la determinazione dell'attività in gel di specifici complessi. Per quanto concerne i complessi solubilizzati con dodecil-maltoside, l'analisi densitometrica ha rivelato che l'ipotiroidismo non comporta cambi significativi dell'attività in gel di tutti i complessi analizzati (Figura 16). La somministrazione di 3,5-T2 a ratti ipotiroidei induce un incremento delle attività del complesso I (+12% vs. Ipo) e del complesso II (+5% vs. Ipo; +12% vs. Eu, Figura 16). La somministrazione di T3 invece induce una significativa stimolazione dell'attività in gel di tutti i complessi valutati, l'effetto maggiore è stato riscontrato sul complesso IV (+24% vs. Ipo; +45% vs. Eu) (Figura 16).

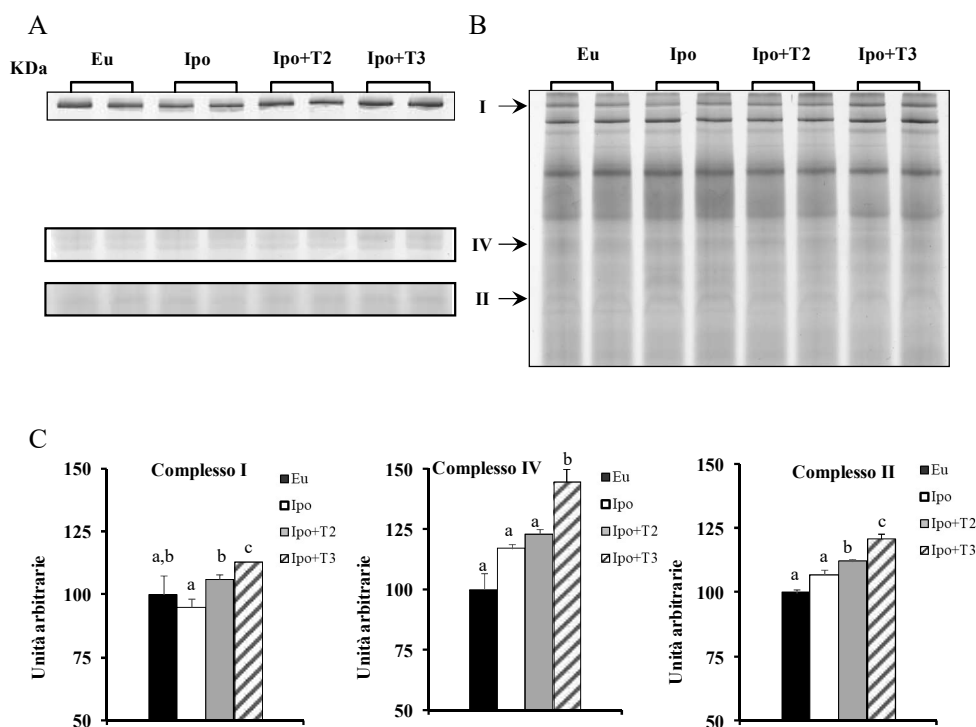


Figura 16. Analisi di BN-PAGE per determinare l'attività in gel dei complessi respiratori di mitocondri di fegato di ratto solubilizzati con dodecilmaltoside. BN-PAGE e attività in gel dei complessi I, II e IV di mitocondri di fegato di ratti Eutiroidi (Eu), Ipotiroidi (Ipo), ipotiroidei trattati con 3,5-T2 (Ipo + T2), e ipotiroidei trattati con T3 (Ipo + T3). A) Immagine rappresentativa della colorazione istochimica dei complessi I, VI e II. B) Immagine rappresentativa del gel BN-PAGE colorato con Blu di Coomassie. Le bande caratteristiche dei complessi respiratori individuali sono riconoscibili e indicati dalle frecce. C) Quantizzazione densitometrica delle bande colorate corrispondenti all'attività in gel del complesso I, complesso IV e complesso II. Le proteine estratte sono state preparate per ciascun animale e caricate in pozzetti individualmente (15 µg). Il valore medio ottenuto dai ratti eutiroidi è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media ± SEM di 4 esperimenti differenti. Colonne marcate con lettere differenti indicano che le differenze tra i gruppi sono statisticamente significative ($P < 0,05$).

In Figura 17 è rappresentato il profilo elettroforetico della BN page dei supercomplessi mitocondriali solubilizzati con digitonina. Attraverso la determinazione dell'attività in gel si è potuto poi definire quale delle varie bande contenesse i complessi I e IV. Cinque bande hanno mostrato l'attività del complesso I e/o del complesso IV; per una più chiara descrizione dei

risultati ottenuti, le cinque bande sono state nominate in base all'attività in gel che presentavano come SC Ia, SC Ib, SC I+IV, SC IVa, SC IVb, a partire dalla banda con il più alto peso molecolare (Figura 17). Tre bande con peso molecolare tra 1200–2100 kDa risultavano positive all'attività del complesso I (SC Ia, SC Ib, SC I+IV). L'attività del complesso IV è stata determinate in tre bande con massa molecolare compresa tra 380-1200 kDa (SC I+IV, SC IVa, SC IVb). Inoltre la banda più leggera positiva all'attività del complesso I (1200 kDa) risulta positiva anche a quella del complesso IV (SC I+IV in Figura 17A e 17B) e, perciò, rappresenta un supercomplesso contenente entrambi i complessi respiratori.

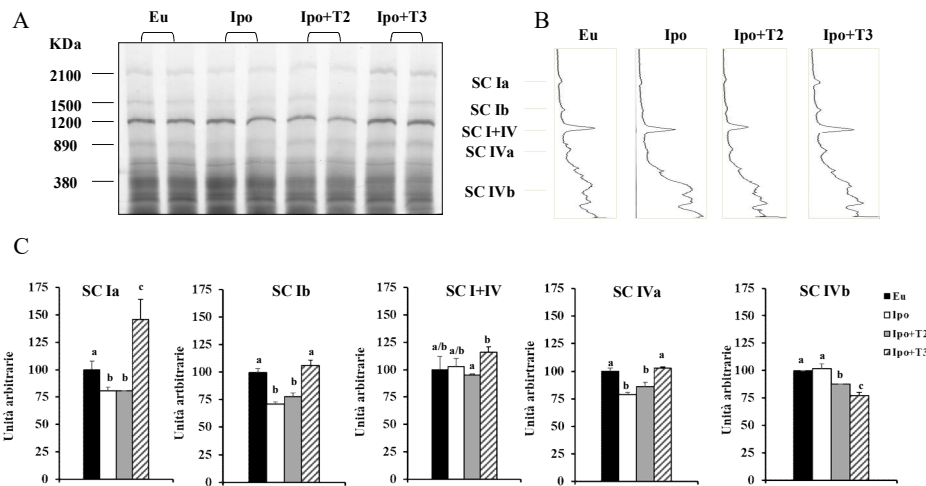


Figura 17. Analisi di BN-PAGE effettuata su mitocondri di fegato di ratto solubilizzati con digitonina. Analisi di BN-PAGE di mitocondri di fegato solubilizzati con digitonina, isolati da ratti Eutiroidei (Eu), Ipotiroidei (Ipo), ipotiroidei trattati con 3,5-T2 (Ipo + T2), e ipotiroidei trattati con T3 (Ipo + T3). A) Immagine rappresentativa del gel BN PAGE colorato con Blu di Coomassie. Le bande caratteristiche dei supercomplessi della catena respiratoria (OXPHOS) sono riconoscibili in tutti i gruppi sperimentali. B) Profilo elettroforetico rappresentativo delle bande relative ai supercomplessi dell'OXPHOS. C) Quantizzazione densitometrica delle bande colorate relative ai supercomplessi, positive all'attività in gel dei Complessi I e IV (nominati SC Ia, SC Ib, SC I+IV, SC IVa, SC IVb). Il valore medio ottenuto dai ratti eutiroidei è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media \pm SEM di 4 esperimenti. Colonne marcate con lettere differenti indicano che le differenze tra i gruppi sono statisticamente significative ($P < 0,05$).

L'analisi densitometrica del profilo elettroforetico dei supercomplessi ha mostrato che i mitocondri isolati da ratti ipotiroidei presentano una significativa riduzione dei supercomplessi SC Ia, SC Ib e SC IVa (Figure 17B e 17C). La somministrazione di 3,5-T2 non ha comportato alcuna variazione significativa dei livelli dei supercomplessi con l'eccezione del supercomplesso SCIVb, che risulta significativamente ridotto (-12% vs. Ipo; -14% vs. Eu) (Figure 17B e 17C). In seguito a somministrazione di T3, si è osservato un significativo incremento dei livelli dei supercomplessi più pesanti che presentano l'attività del complesso I, quali SC Ia, SC Ib e SC I-IV (rispettivamente +80%, +49%, +25% vs. Ipo) e, allo stesso tempo, una riduzione del supercomplesso SC IVb (-24% vs. Ipo) (Figure 17B e 17C).

6.5 Effetto della somministrazione di 3,5-T2 e T3 a ratti ipotiroidei sull'abbondanza dei complessi respiratori in mitocondri di fegato di ratto

L'abbondanza dei complessi respiratori mitocondriali epatici è stata determinata attraverso western blot, valutando i livelli proteici di specifiche subunità appartenenti ai cinque complessi respiratori (Figura 18) e quelli di mG3PDH (Figura 19). I livelli del complesso I e di mG3PDH sono significativamente ridotti dalla condizione di ipotiroidismo (rispettivamente -43% e -50% vs. Eu). 3,5-T2 ha indotto un significativo incremento dei livelli proteici del complesso V (+30% vs. Ipo) (Figura 18) e di mG3PDH (170% vs. Ipo e +38% vs. Eu) (Figura 19). T3 ha invece incrementato significativamente tutti i complessi respiratori mitocondriali. Gli incrementi osservati sono stati i seguenti: complesso I +94% vs. Ipo e +67% vs. Eu, complesso II +40% vs. Ipo e Eu, complesso III +140% vs. Ipo e +97% vs. Eu, complesso IV +100% vs. Ipo e +62% vs. Eu, complesso V circa +55% vs. Ipo e Eu (Figura 18). Inoltre, T3 ha mostrato un forte effetto sui livelli di mG3PDH che risultano incrementati del +250% e del +560% rispettivamente vs. Ipo e Eu (Figura 19).

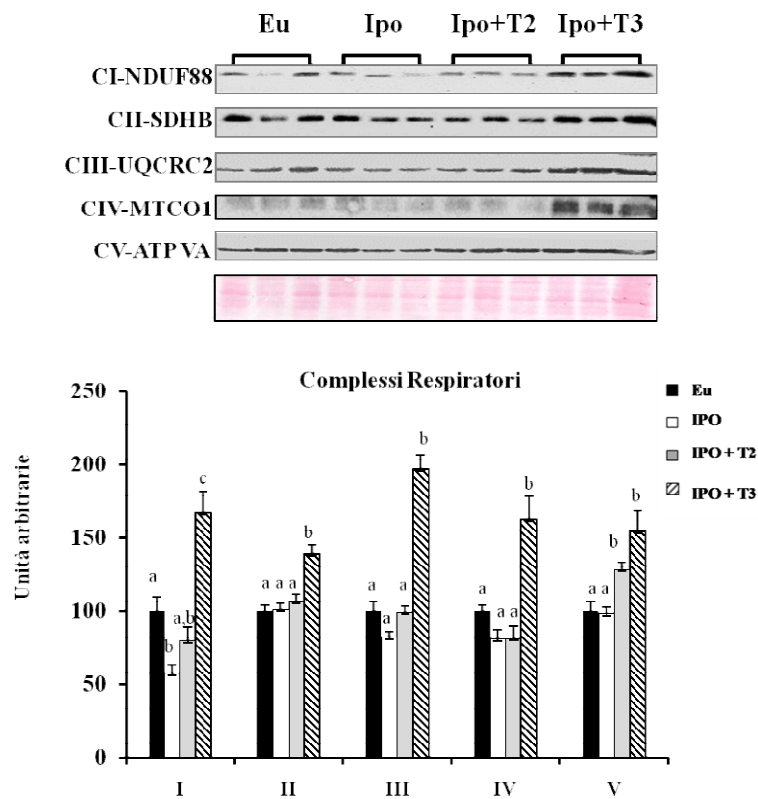


Figura 18. Effetto della somministrazione delle iodotironine a ratti ipotiroidici sull'abbondanza dei complessi respiratori mitocondriali. In alto è riportata l'immagine rappresentativa di western blot effettuati per le subunità dei complessi respiratori mitocondriali CI-NDUF88, CII-SDHB, CIII-UQCRC2, CIV-MTCO1 e CV-ATP VA rilevate in mitocondri isolati da fegato di ratto (15 µg). In basso sono riportati gli istogrammi relativi alle quantizzazioni delle bande. Il valore medio ottenuto dai ratti eutiroidici è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media± SEM di 4 esperimenti differenti. Colonne marcate con lettere differenti indicano che le differenze tra i gruppi sono statisticamente significative, (P<0,05).

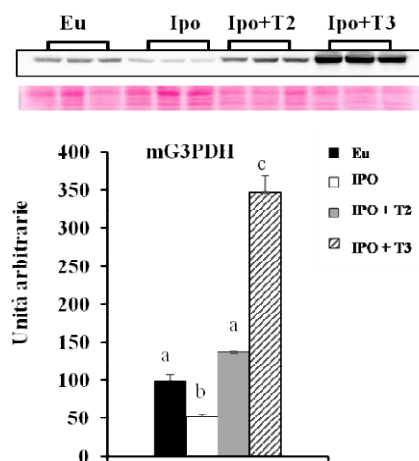


Figura 19. Effetto della somministrazione delle iodotironine a ratti ipotiroidei sull'abbondanza della glicerolo-3-fosfato deidrogenasi mitocondriale (G3PDH). In alto è riportata l'immagine rappresentativa di western blot effettuati per i livelli di mG3PDH rilevati in mitocondri isolati da fegato di ratto (15 μ g). In basso sono riportati gli istogrammi relativi alle quantizzazioni delle bande. Il valore medio ottenuto dai ratti eutiroidi è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media \pm SEM di 4 esperimenti differenti. Colonne marcate con lettere differenti indicano che le differenze tra i gruppi sono statisticamente significative ($P < 0,05$).

7. RISULTATI DEL SECONDO DISEGNO SPERIMENTALE

7.1 Effetto dell'assenza di UCP3 sui parametri metabolici, sullo stress ossidativo sistemico e sulla morfometria dei tessuti

Allo scopo di valutare se l'assenza di UCP3 potesse influenzare il metabolismo energetico dell'animale in topi adulti, stabulati a termoneutralità, sono stati determinati: la velocità metabolica a riposo (*Resting Metabolic Rate*, RMR), la spesa energetica a riposo (*Resting Energy Expenditure*, RRE) e il quoziente respiratorio (*Respiratory Quotient*, RQ). Il RMR, risulta significativamente ridotto (~30%) nei topi KO rispetto ai controlli WT (Figura 20A, 20B) sia quando espresso in Litri di Ossigeno/(ora· Kg^{0.75}) sia quando espresso in Litri di ossigeno/(ora·g di massa magra). Il quoziente respiratorio risulta incrementato nei topi KO rispetto ai WT, indicando un ridotto utilizzo di lipidi come substrato energetico nei primi (Figura 20C). Nei topi KO, infatti, il contributo dell'ossidazione dei grassi alla spesa energetica basale risulta ridotta del 27% rispetto ai WT (Figura 20F). In essi, inoltre, anche l'assunzione di cibo risulta minore del 15% rispetto ai WT, con valori di 3.1±0.11 e 2.63±0.014 g di cibo al giorno per WT e KO rispettivamente (n = 6, p < 0,05).

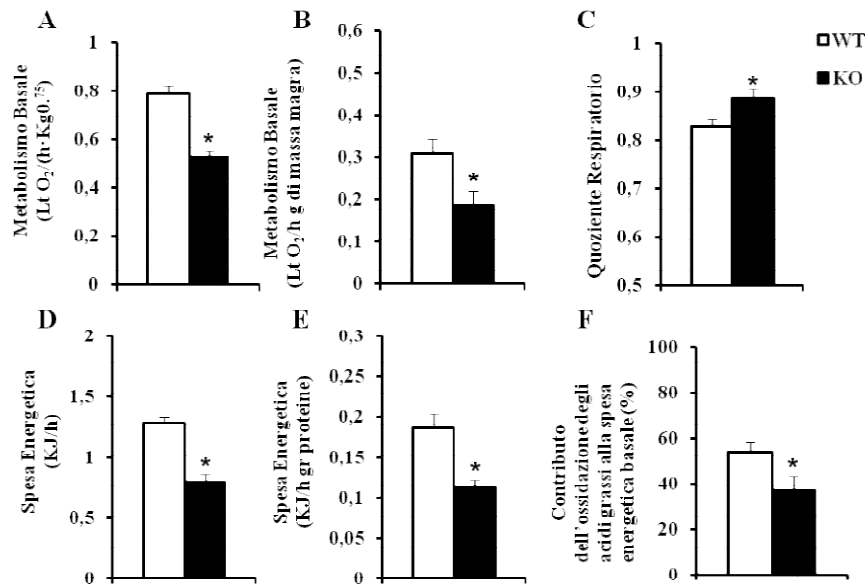


Figura 20. Effetto dell'assenza di UCP3 sui principali parametri metabolici. A), B) Metabolismo basale, C) Quoziente respiratorio, D), E) Spesa energetica, F) Contributo dell'ossidazione degli acidi grassi alla spesa energetica basale. I dati rappresentano la media \pm ES di 6-7 animali per WT e KO rispettivamente (*P < 0,05 vs. WT).

L' assenza della proteina UCP3, provoca stress ossidativo a livello sistemico come deducibile dai livelli di 8-OHdG, un importante biomarker dello stress ossidativo, rilevati nei sieri dei topi KO in cui, la concentrazione di tale prodotto dell'ossidazione del DNA, risulta significativamente maggiore rispetto ai controlli WT (+50% vs. WT) (Figura 21).

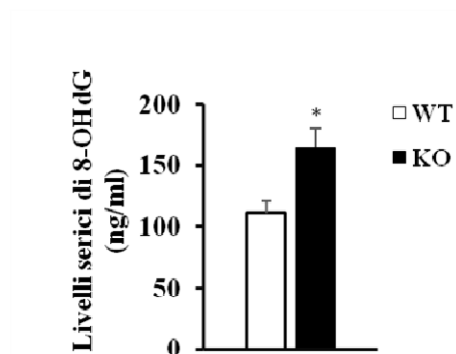


Figura 21. Effetto dell'assenza di UCP3 sul marker di stress ossidativo sistemico 8-OHdG. Istogrammi relativi al dosaggio di 8-OHdG determinati all'interno dei sieri di topi WT e KO per UCP3. I dati rappresentano la media \pm ES di 6-7 animali per WT e KO rispettivamente (* $P < 0,05$ vs. WT).

Allo scopo di valutare se l'assenza di UCP3 potesse influenzare la massa e la morfometria dei tessuti che contribuiscono maggiormente al metabolismo energetico, è stato valutato il contributo di fegato, cuore, muscolo scheletrico (gastrocnemio), WAT gonadico (WATg) e tessuto adiposo bruno (BAT) al peso corporeo dell'animale. Tale contributo non presenta variazioni tra topi WT e KO, ad eccezione del WATg che presenta una riduzione significativa del 36% nei KO rispetto ai controlli WT (Tabella 3).

Tabella 3: Peso corporeo e contributo al peso corporeo dei tessuti isolati da topi WT e KO per UCP3.

	Peso corporeo (g)	Fegato	Cuore	Gastrocnemio (g tessuto/g animale)*100	iBAT	gWAT
WT	32.36±1.01	4.27±0.14	0.42±0.2	0.85±0.06	0.70±0.05	3.68± 0.32
KO	29±1.11	4.04±0.14	0.42±0.03	1.4±0.06	0.70±0.5	2.34± 0.06*

I valori rappresentano la media ± ES di 8 differenti animali di ciascun gruppo sperimentale (*P<0,05 vs WT).

Analisi istologiche su sezioni di fegato, muscolo scheletrico, di WATg e di BAT, ottenute attraverso colorazione con eosina ematossilina, hanno permesso di rivelare la presenza di alcune goccioline lipidiche nel fegato dei topi WT (Figura 22). Quanto osservato è probabilmente dovuto alla stabulazione degli animali a 30°C, ossia alla temperatura di termoneutralità, ed è in accordo con dati presenti in letteratura (195). Nei topi KO si evidenzia un notevole accumulo lipidico nel citoplasma di tutti gli epatociti. Le stesse analisi evidenziano la presenza di grandi goccioline lipidiche intramiocellulari, che appaiono come cerchi privi di colore, nei muscoli dei topi KO.

Gli adipociti di BAT, il tessuto termogenico per eccellenza, presentano un fenotipo uniloculare simile a quello degli adipociti bianchi, indipendentemente dal genotipo dell'animale, che è attribuito alla stabulazione degli animali a termoneutralità. L'assenza di UCP3 influenza la morfologia del tessuto adiposo bianco epididimale, infatti gli adipociti dei topi KO presentano un'area minore rispetto ai controlli WT.

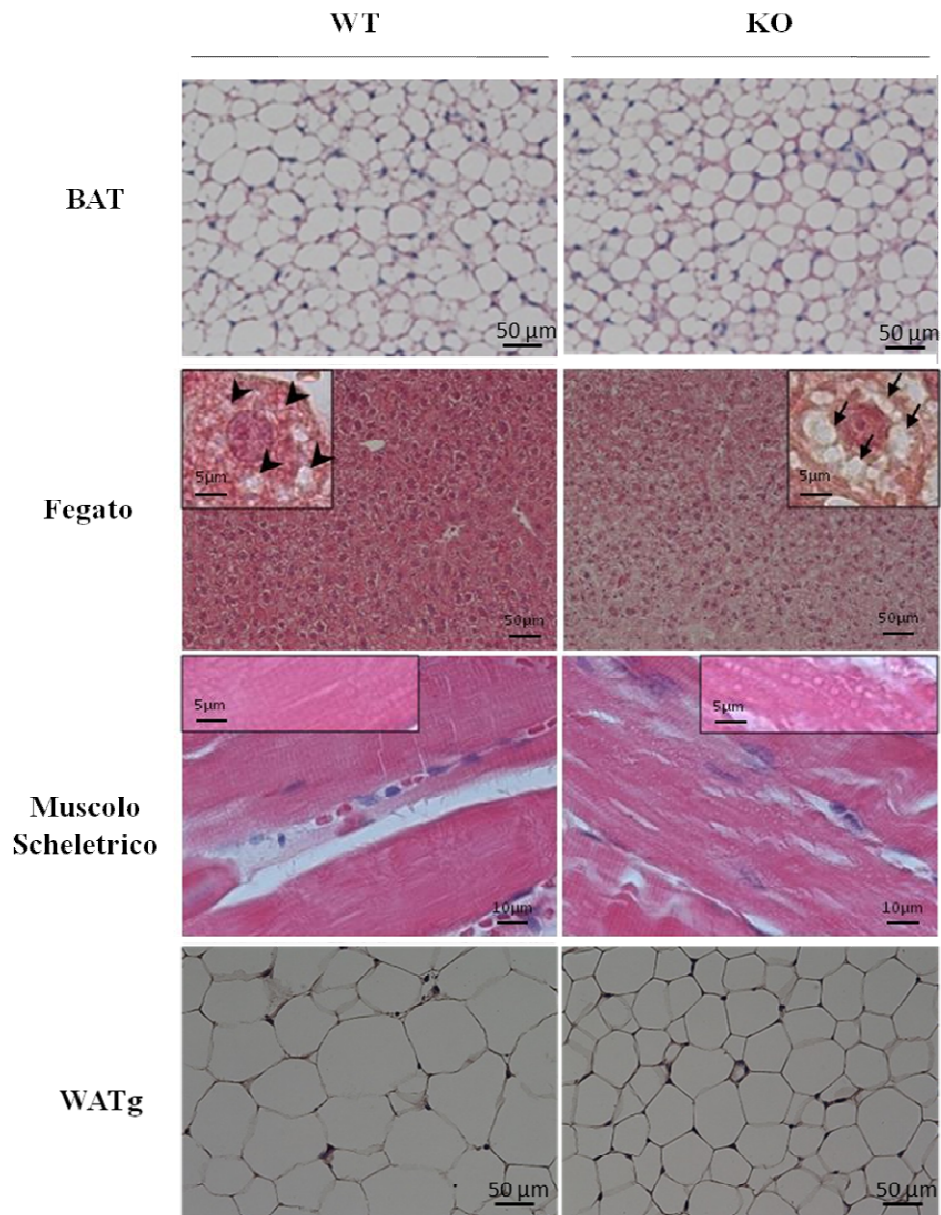


Figura 22. Analisi istologica di tessuto adiposo bianco e bruno, fegato e muscolo di topi WT e KO per UCP3. Immagini istologiche rappresentative di tessuto adiposo bruno (BAT), fegato, gastrocnemio e tessuto adiposo gonadico (WATg) isolati da topi WT e KO per UCP3 stabulati a termoneutralità. Nel fegato dei KO è possibile osservare le grandi gocce lipidiche all'interno del riquadro di ingrandimento 100X, indicate da frecce nere. Allo stesso modo, nel muscolo scheletrico, l'ingrandimento 10X mostra la presenza di grandi goccioline lipidiche intramiocellulari, che appaiono come cerchi privi di colore.

7.2 Effetto dell'assenza di UCP3 sui parametri respiratori mitocondriali e sulla cinetica della proton leak del muscolo scheletrico

Per valutare se UCP3 potesse influenzare i parametri bioenergetici mitocondriali, è stata determinata la respirazione mitocondriale in condizioni sperimentali in cui la fosforilazione di ADP ad ATP procede alla massima velocità (Stato 3) e in condizioni in cui tale processo è praticamente assente e i mitocondri respirano per bilanciare il flusso di protoni dallo spazio intermembrana verso la matrice, non accoppiato alla sintesi di ATP (Stato 4). Inoltre sono stati utilizzati tre diversi substrati respiratori: il Piruvato (+malato), il Succinato (+rotenone) e la Palmitoil-carnitina (+malato). Non sono state riscontrate differenze significative nella velocità del consumo di ossigeno in presenza di Piruvato (+ malato) o Succinato (+ rotenone) come substrati della respirazione, (Figura 23A, 23B). D'altro canto, in presenza della Palmitoil-carnitina (+ malato), lo Stato 3 della respirazione risulta significativamente inibita nei mitocondri dei topi KO (Figura 23C). E' da considerare che il consumo di ossigeno mitocondriale determinato in presenza del substrato Palmitoil-carnitina è un indice della capacità mitocondriale di ossidare gli acidi grassi. Pertanto, i dati ottenuti a livello dei mitocondri di muscolo scheletrico sono in pieno accordo con quelli ottenuti sull'intero animale, che indicavano un ridotto utilizzo di acidi grassi come substrati metabolici nei topi KO.

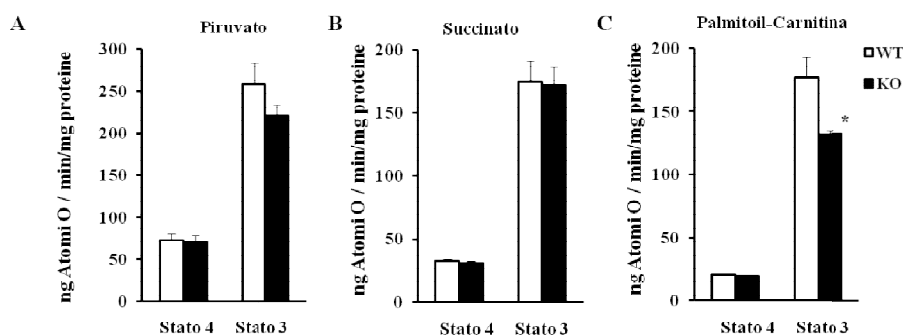


Figura 23. Effetto dell'assenza di UCP3 sulla respirazione mitocondriale del muscolo scheletrico. I mitocondri di muscolo scheletrico, isolati da topi WT e KO per UCP3, sono stati energizzati con tre differenti substrati respiratori: A) Succinato (+rotenone), B) Piruvato

(+malato), e C) Palmitoil-carnitina (+malato). I valori rappresentano la media \pm ES di 6 diversi esperimenti (* $P < 0,05$ vs. WT).

Al fine di valutare il coinvolgimento di UCP3 nel processo di proton leak, si è valutata la cinetica della proton leak determinando le variazioni del consumo di ossigeno non associato a sintesi di ATP in funzione della variazione di potenziale di membrana. Nelle adeguate condizioni sperimentali utilizzate (descritte nella sezione metodi) il consumo di ossigeno mitocondriale è indice del flusso protonico mentre il potenziale presente ai capi della membrana mitocondriale interna è indice dell'ampiezza della forza proton motrice. La cinetica della proton leak è stata valutata in assenza e in presenza di acidi grassi (acido arachidonico) e, come è possibile evincere dal grafico riportato in Figura 24, in assenza di acidi grassi non si osservano differenze nella cinetica della proton leak tra topi WT e KO per UCP3, in quanto le curve sono sovrapponibili. L'aggiunta di acido arachidonico nel mezzo di respirazione induce un incremento della cinetica della proton leak che risulta maggiore nei topi WT. Infatti, in presenza di acido arachidonico, a qualsiasi potenziale di membrana, i mitocondri isolati da topi WT respirano di più rispetto ai KO per bilanciare il processo di proton leak. Per quantificare le differenze osservate nella conduttanza protonica mitocondriale tra topi WT e KO, sono stati considerati i valori della respirazione corrispondenti al più alto valore di potenziale comune a tutte le cinetiche (nel caso specifico 185 mV, linea tratteggiata di figura 24). Al più alto potenziale di membrana comune alle cinetiche di proton leak, in presenza di acido arachidonico, la respirazione osservata nei topi WT è circa il 57 % in più rispetto ai topi KO, indice che il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi coinvolge UCP3, in accordo con i dati presenti in letteratura relativi a topi WT e KO stabulati a temperatura standard (24°C) (130,134).

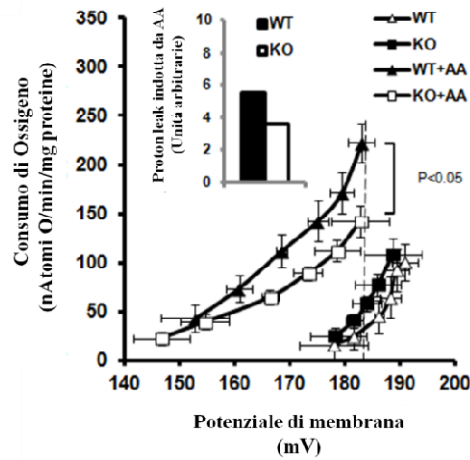


Figura 24. Effetto dell'assenza di UCP3 sulla proton leak del muscolo scheletrico. Valutazione della cinetica della proton leak rilevata in mitocondri isolati da muscolo di topi WT e KO. In assenza e in presenza di acido arachidonico (AA). L'inserto rappresenta l'induzione della proton leak da parte dell'acido arachidonico, misurata al più alto potenziale di membrana (183 mV). I dati rappresentano la media \pm ES di 3-4 animali.

7.3 Effetto dell'assenza di UCP3 sulla morfologia degli adipociti e dei mitocondri di BAT

L'analisi ad alta risoluzione di campioni inclusi in resina, mostra una colorazione citoplasmatica non omogenea nel parenchima di BAT di topi KO, caratterizzato, infatti, da gruppi isolati di adipociti che, quando trattati con blu di toluidina, mostrano un citoplasma debolmente colorato (Figura 25A).

Analisi ultrastrutturali del BAT di topi WT, effettuate attraverso microscopia elettronica a trasmissione (TEM), hanno confermato l'organizzazione uniloculare del contenuto lipidico degli adipociti, simile a quella degli adipociti bianchi, ma hanno anche rivelato la presenza di una fitta rete di mitocondri, aspetto peculiare del tessuto adiposo bruno. I mitocondri risultano grandi, numerosi e caratterizzati da una completa struttura a due membrane, e hanno l'aspetto tipico di mitocondri funzionali (Figura 25B, 25C). Al contrario, alcune

cellule di BAT di topi KO, mostrano una debole colorazione degli adipociti bruni e mitocondri danneggiati con una parziale o totale mancanza di creste. Tali caratteristiche suggeriscono una ridotta attività mitocondriale di questi adipociti.

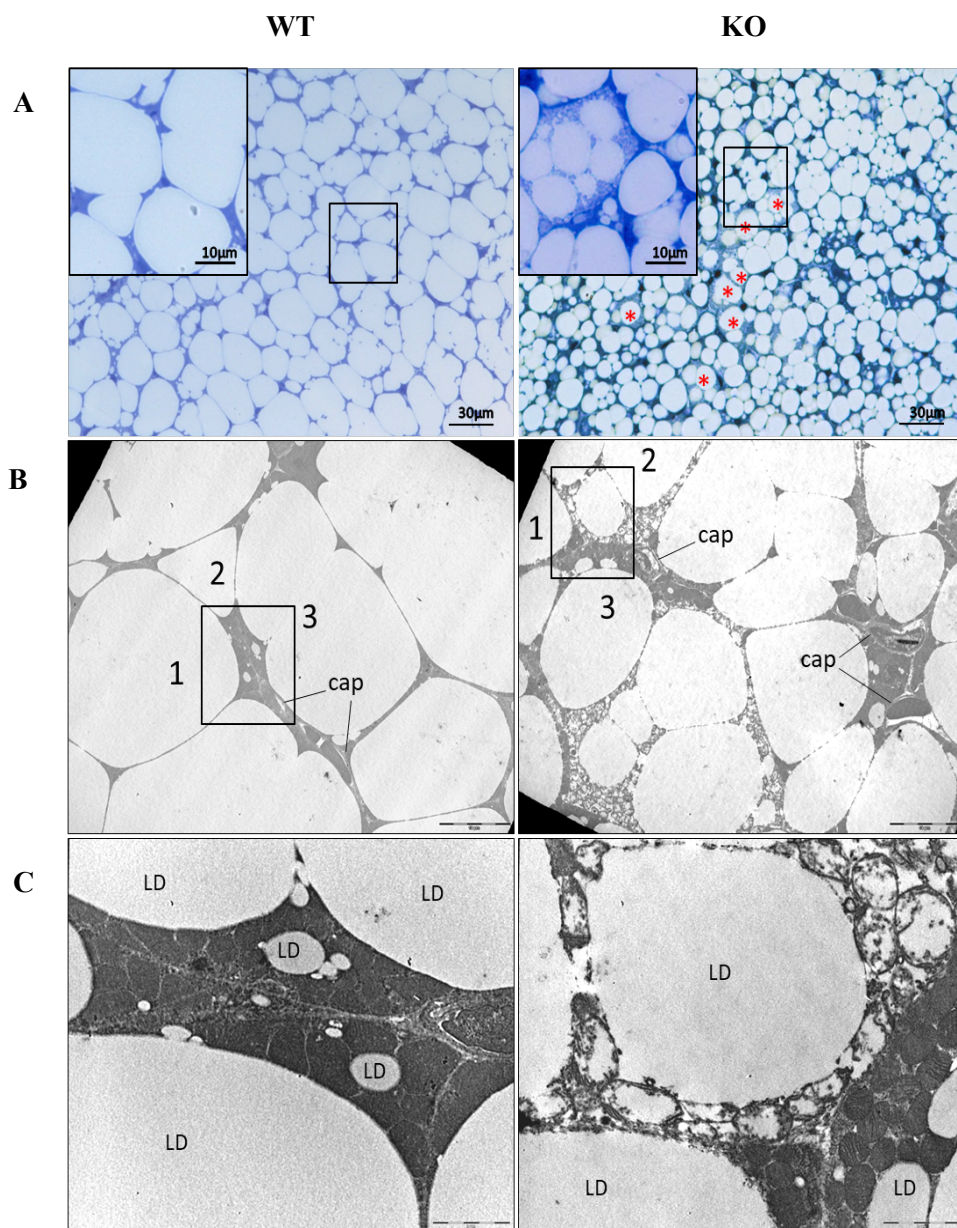


Figura 25. Immagini di microscopia elettronica: BAT di topi WT e KO per UCP3. Immagini di microscopia ottica (A) e microscopia elettronica (B) e (C) di BAT di topi WT e KO. (A) Grandi gocce lipidiche e citoplasma uniformemente colorato di blu caratterizzano gli

adipociti bruni dei topi WT acclimatati alla termoneutralità. Il BAT dei topi KO mostra gocce lipidiche di dimensioni inferiori a quelle dei WT e una colorazione non omogenea del citoplasma degli adipociti. Sono presenti alcuni adipociti multiloculari debolmente colorati (pannello A, asterischi rossi).(B) Ingrandimenti della micrografia elettronica delle aree incorniciate nel pannello A permettono di rivelare sia il bordo citoplasmatico elettron-denso degli adipociti dei topi WT, sia la sottile ultrastruttura degli adipociti (mostrati nel pannello A, a sinistra) e mettono in evidenza un citoplasma ben strutturato contenente mitocondri.(C) L'ingrandimento delle aree incorniciate in (B), mostrano la morfologia mitocondriale di tre adipociti adiacenti sia di topi WT che di topi KO. Nelle cellule adipose dei topi WT, sono stati ritrovati numerosi e grandi mitocondri con creste intatte (e membrana mitocondriale interna intatta). Nelle cellule adipose dei topi KO, è possibile osservare un bordo citoplasmatico elettronchiaro ed una fitta rete di mitocondri che presentano chiari segni di degenerazione come la mancanza, parziale o totale, della membrana mitocondriale interna. Non ci sono però segni di degenerazione nei mitocondri delle cellule subito adiacenti. Scala: A = 30 μm , inserti= 10 μm ; B = 10 μm ; C = 2 μm .

7.4 Effetto dell'assenza di UCP3 sui livelli proteici di UCP1 e di PGC-1 α nel BAT

E' stata esaminata l'influenza dell'assenza di UCP3 sui livelli proteici di UCP1 e PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α*), dato il ruolo chiave che tali proteine svolgono nella termogenesi e nella fisiologia del BAT. Non sono state riscontrate differenze nei livelli di UCP1 tra WT e KO, analizzati sia nei lisati di mitocondri isolati dal BAT sia nei lisati totali di tessuto (Figura 26A). I livelli tissutali di PGC-1 α , una proteina chiave nella termogenesi del BAT e nella biogenesi mitocondriale, invece, sono risultati significativamente ridotti nei topi KO (Figura 26B).

Il contenuto mitocondriale del BAT proveniente da topi WT e KO per UCP3 è stato valutato considerando diversi parametri: i) il recupero di proteine mitocondriali da 100 mg di tessuto, ii) il rapporto tra i livelli proteici di UCP1 rilevati nei lisati tissutali e quelli rilevati nei mitocondri isolati; data la localizzazione mitocondriale di UCP1, essa è infatti considerata un marker dell'organello.

Il recupero mitocondriale risulta indipendente dal genotipo (3.5 ± 0.2 e 3.4 ± 0.3 mg proteine micondriali/g tessuto in topi WT e KO, rispettivamente) e, inoltre, il rapporto UCP1 tissutale/UCP1 mitocondriale è risultato simile in

entrambi i genotipi, indicando che topi WT e KO per UCP3 hanno un contenuto mitocondriale paragonabile (Figura 26C).

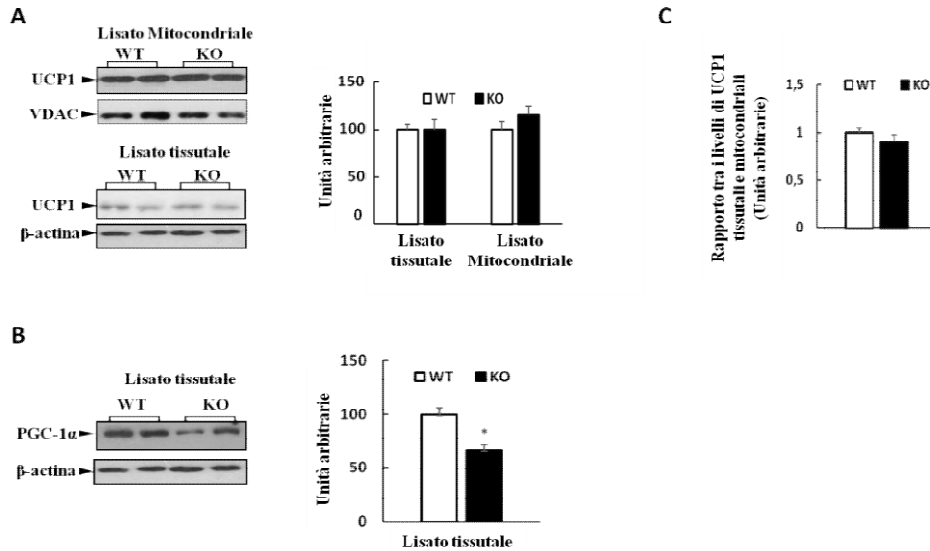


Figura 26. Livelli di UCP1 e PGC1 α nel BAT di topi WT e KO per UCP3. Livelli proteici di UCP1 (A) e PGC-1 α (B), e il rapporto tra i livelli tissutali e mitocondriali di UCP1 (C) in BAT di topi WT e KO. VDAC e β -actina sono stati utilizzati rispettivamente come normalizzatori per i lisati mitocondriali e tissutali. Gli istogrammi rappresentano la quantizzazione relativa alle bande di interesse. Il valore medio ottenuto dai campioni WT è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media \pm ES di 6 differenti esperimenti (*P<0,05 vs. WT).

7.5 Effetto dell'assenza di UCP3 sui parametri respiratori di mitocondri isolati da BAT

La respirazione di mitocondri isolati da BAT è stata determinata in condizioni basali, in presenza di GDP, che permette di escludere il contributo delle UCPs alla respirazione (in quanto loro inibitore), e in presenza di FCCP un disaccoppiante in presenza del quale i mitocondri respirano alla massima velocità. In particolare, in presenza di FCCP la respirazione mitocondriale è controllata esclusivamente dall'attività delle reazioni coinvolte nell'ossidazione dei substrati tra cui la catena elettronica. L'effetto dell'assenza di UCP3 sul

consumo di ossigeno mitocondriale, dipende dal substrato energetico utilizzato. In presenza di Piruvato (+malato), non si evidenzia nessuna differenza significativa nella respirazione basale tra i mitocondri isolati dal BAT di topi WT e KO (Figura 27A). L'aggiunta di GDP al mezzo di incubazione induce un'inibizione della respirazione mitocondriale di circa il 30%, indipendentemente dal genotipo. La successiva aggiunta di FCCP, invece, induce un aumento della respirazione che raggiunge livelli più alti di quelli osservati in condizioni basali, indicando un'adeguata preparazione mitocondriale (Figura 27A).

In presenza di Palmitoil-carnitina (+malato) come substrato, il consumo di ossigeno risulta significativamente inferiore (-25%) nei KO rispetto ai controlli WT (Figura 27B). Il GDP aggiunto al mezzo di incubazione, induce una riduzione della respirazione sia nei WT che nei KO, tuttavia, il consumo di ossigeno rimane più basso nei KO (Figura 27B).

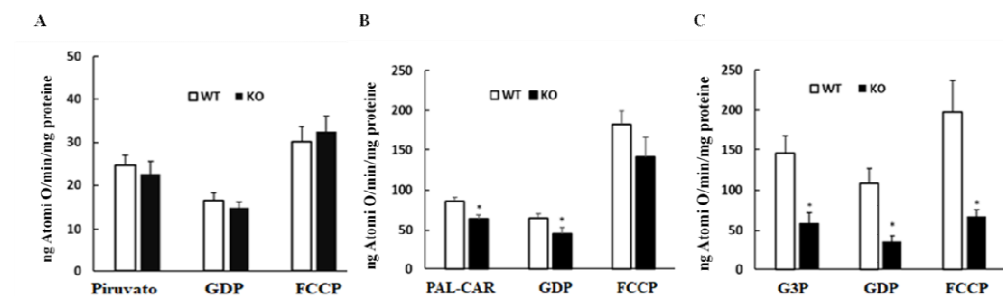


Figura 27. Velocità di respirazione dei mitocondri di BAT di topi WT e KO per UCP3. I mitocondri sono stati energizzati con tre differenti substrati: Piruvato (+ malato) (A), Palmitoil-carnitina (PAL-CAR) (B) e Glicerolo-3-fosfato (G3P) (C). Il consumo di ossigeno è stato valutato in condizioni basali e dopo l'aggiunta sequenziale di GDP e FCCP nel mezzo di respirazione. I valori rappresentano la media \pm ES di 5 differenti misurazioni nel caso del Piruvato + malato e di 9 differenti misurazioni nel caso dei restanti substrati (* $P < 0,05$ vs. WT).

Quando il G3P viene utilizzato come substrato della respirazione mitocondriale, il consumo di ossigeno determinato nei topi KO mostra una significativa riduzione (-60%) rispetto ai controlli WT. Tale riduzione persiste in presenza di

GDP e FCCP, suggerendo che, nei campioni provenienti da topi KO, vi sia un'alterazione delle reazioni coinvolte nell'ossidazione del G3P (Figura 27C). Tale ipotesi è supportata dall'evidenza che la cinetica di tutte le reazioni di ossidazione del G3P risultano inibite nei mitocondri di BAT dei topi KO rispetto ai controlli WT, dal momento che, ad ogni valore di potenziale di membrana, i mitocondri dei topi WT, mostrano un consumo di ossigeno maggiore (Figura 28).

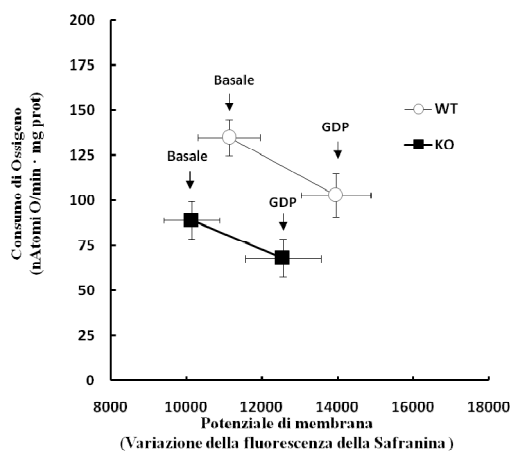


Figura 28. Attività complessiva delle reazioni coinvolte nell'ossidazione del G3P nei mitocondri di BAT di topi WT e KO. Per ciascun gruppo sperimentale sono stati valutati il potenziale di membrana e il consumo di ossigeno di mitocondri che utilizzano come G3P come substrato respiratorio, in assenza e in presenza di GDP. I valori rappresentano la media \pm ES di 8 differenti misurazioni.

7.6 Effetto dell'assenza di UCP3 sull'abbondanza e sull'attività in gel dell'enzima mG3PDH e dei complessi della catena respiratoria mitocondriale nel BAT

Analisi di Western blot, non hanno evidenziato variazioni nei livelli dell'enzima mG3PDH e dei cinque complessi respiratori in mitocondri isolati dal BAT di topi WT e KO, indicando che le variazioni del consumo di ossigeno

in presenza di G3P, osservate nei KO, non sono attribuibili ad un minore contenuto proteico dell'enzima in grado di metabolizzarlo o degli altri componenti della catena respiratoria coinvolti nell'ossidazione del substrato, ad esempio complesso III e IV (Figura 29A e 29B).

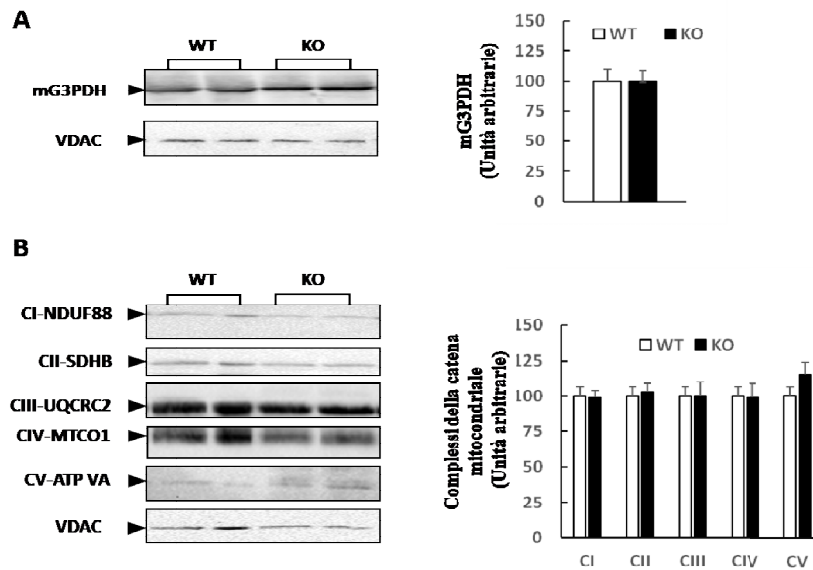


Figura 29. Livelli proteici di mG3PDH e dei complessi respiratori in mitocondri di BAT di topi WT e KO per UCP3. Western blot rappresentativi dei livelli proteici di mG3PDH (A) e delle subunità CI-NDUF88, CII-SDHB, CIII-UQCRC2, CIV-MTCO1 e CV-ATP VA (B) in mitocondri isolati dal BAT di topi WT e KO. Gli istogrammi rappresentano la quantizzazione relativa alle bande di interesse. Il valore medio ottenuto dai campioni WT è stato impostato come 100. I valori rappresentano la media \pm ES di 6 differenti esperimenti.

Successivamente è stato valutato se l'assenza di UCP3 potesse influenzare l'attività della mG3PDH o dei Complessi respiratori I e IV. A tale scopo, i mitocondri di BAT sono stati solubilizzati con un detergente blando, la digitonina e le proteine estratte sono state separate attraverso BN-PAGE e successivamente utilizzate per valutare l'attività *in gel* dei predetti enzimi e complessi respiratori (Figura 30).

L'enzima mG3PDH è stato rilevato in diversi omo-oligomeri (presumibilmente trimeri e tetrameri), ma anche in aggregati di supercomplessi (SC) ad alto peso molecolare (Figura 30A). Tuttavia, l'attività della mG3PDH è stata evidenziata maggiormente nelle bande di peso molecolare tra 146 e 720 kDa e, in particolare, la massima attività si evidenzia a 250 kDa circa, che rappresenta, probabilmente, la massa molecolare dell'oloenzima (Figura 30A). In alcuni SC ad alto peso molecolare, la mG3PDH colocalizza con il Complesso I e/o il complesso IV della catena respiratoria. L'analisi densitometrica mostra che l'assenza di UCP3 è associata ad una significativa riduzione dell'attività *in gel* dell'enzima mG3PDH rilevata nelle tre bande più intense (ovvero quella a 250, 418, e 540 kDa) (Figura 30D).

Due delle bande che corrispondono a supercomplessi di peso molecolare apparente 935 e 824 kDa mostrano attività del Complesso I (NADH deidrogenasi) (Figura 30B). Quattro bande, corrispondenti a supercomplessi con apparente peso molecolare di 824, 730, 614, e 418 kDa, mostrano attività del Complesso IV (Figura 30C). Tuttavia, non sono state osservate significative differenze nell'attività in gel di tali complessi tra topi WT e KO (Figura 30E e 30F).

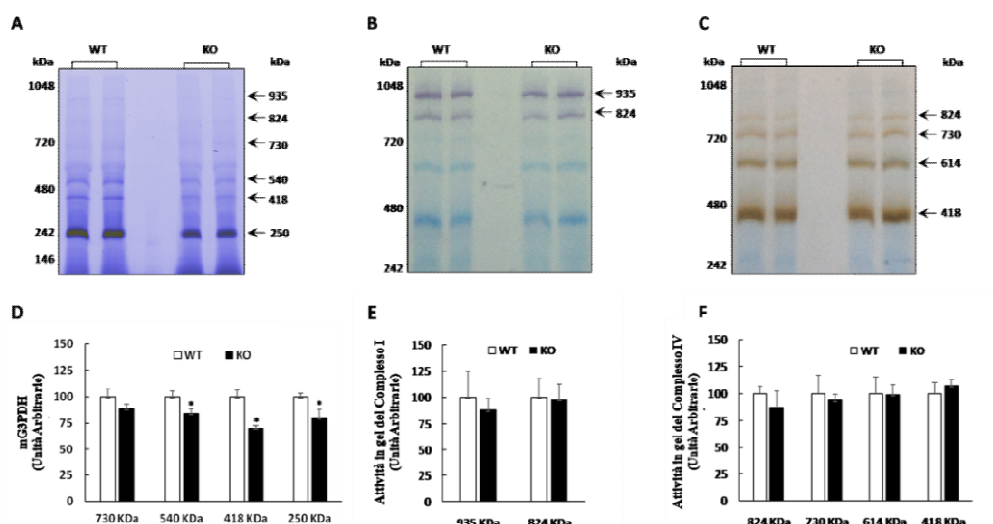


Figura 30. Analisi dell'attività in-gel di mG3PDH, dei complessi I e IV in mitocondri, permeabilizzati con digitonina, di BAT di topi WT e KO per UCP3. I Pannelli in alto mostrano immagini rappresentative delle attività in gel di mG3PDH (A), del Complesso I (B), e del Complesso IV (C). Il peso molecolare delle proteine standard è indicato sulla sinistra, mentre la relativa posizione dei supercomplessi respiratori (a destra) è indicata dalle frecce. (D) (E) (F) Quantizzazione densitometrica delle bande colorate corrispondenti all'attività in gel dei supercomplessi indicati. Il valore medio ottenuto dai campioni WT è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media \pm ES di 3 differenti esperimenti (*P<0,05 vs. WT).

7.7 Effetto dell'assenza di UCP3 sullo stress ossidativo e sulle difese enzimatiche antiossidanti mitocondriali

In seguito, è stato valutato se l'assenza della proteina UCP3 potesse avere impatto sul rilascio mitocondriale di H₂O₂ e sull'electron leak, considerata come la percentuale di elettroni che, durante il loro trasporto attraverso la catena respiratoria mitocondriale, sfugge ad essa e riduce l'ossigeno in superossido. Tale percentuale viene calcolata dividendo la quantità di H₂O₂ rilasciata (indice indiretto della produzione di superossido) per il consumo di ossigeno corrispondente. Indipendentemente dal substrato utilizzato, non è stata osservata nessuna differenza significativa nel rilascio di H₂O₂ tra topi WT e KO (Figura 31A); d'altro canto, quando viene utilizzato il G3P come substrato, l'electron leak risulta significativamente maggiore nei mitocondri dei topi KO (Figura 31B).

Il BAT dei topi KO mostra un forte aumento dei livelli proteici degli enzimi antiossidanti SOD-2, CAT e GPX4 (Figura 32). Nonostante tale incremento però, i mitocondri del tessuto stesso, quando paragonati a quelli dei WT, mostrano livelli di idroperossidi lipidici, un indice del danno ossidativo a carico dei lipidi, significativamente maggiore (Figura 31C).

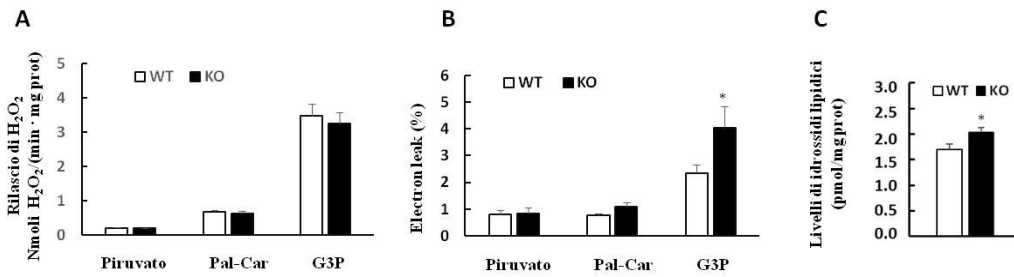


Figura 31. Rilascio di H₂O₂(A), electron leak (B) e idroperossidi lipidici (C) rilevati in mitocondri di BAT di topi WT e KO. Nei pannelli A e B, i mitocondri sono stati energizzati con differenti substrati: Piruvato (+ malato), Palmitoil-carnitina (PAL-CAR), o Glicerolo-3-fosfato(G3P). I valori rappresentano la media \pm ES di 6 differenti esperimenti nel caso del rilascio di H₂O₂ ed electron leak, mentre di 8 differenti esperimenti per i livelli di idroperossidi lipidici (*P<0,05 vs. WT).

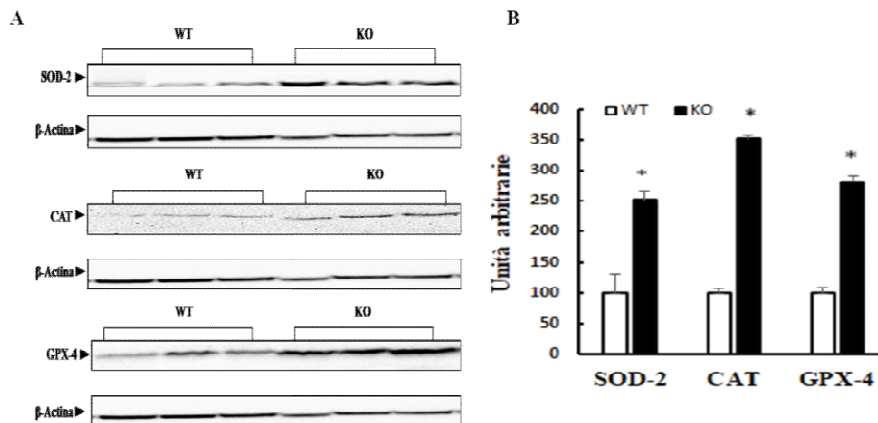


Figura 32. Livelli di enzimi antiossidanti mitocondriali nel BAT di topi WT e KO per UCP3. A) Western blot rappresentativi relativi ai livelli di Superossido Dismutasi 2 (SOD-2), Catalasi (CAT) e Glutazione perossidasi-4 (GPX-4) in lisati tissutali di BAT. La β -Actina è stata utilizzata come normalizzatore; B) Gli istogrammi rappresentano la quantizzazione relativa alle bande di interesse. Il valore medio ottenuto dai campioni WT è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media \pm ES di 4 differenti esperimenti. (*P<0.01 vs. WT).

7.8 Effetto dell'assenza di UCP3 sull'organizzazione delle proteine mitocondriali in supercomplessi respiratori

In Figura 33, sono mostrati i profili elettroforetici dei supercomplessi ottenuti dai mitocondri di BAT di topi WT e KO (33A e 33B rispettivamente) dopo l'estrazione proteica con digitonina, la successiva separazione attraverso BN-PAGE e la colorazione con Blu di Comassie. L'analisi densitometrica mostra che i mitocondri isolati dal BAT dei topi WT contengono due bande proteiche nel range di 730-830 kDa (indicate dalle frecce in figura 33A), che sono significativamente meno intense nei topi KO: di circa il 30% e il 50% in meno per quella a più basso e quella a più alto peso molecolare rispettivamente, rispetto ai WT. Per isolare e identificare le proteine presenti in tali bande, le aree di interesse sono state escisse dal gel nativo e successivamente analizzate tramite 2D SDS-PAGE (Figure 33C e 33D). Gli spot corrispondenti alle proteine di interesse (numerate in Figura 33 C), sono state escisse, incubate con tripsina e analizzate attraverso LC-ESI-LIT-MS/MS. Nella Tabella 4 sono elencate le proteine rilevate in tali spots. In particolare, ciascun spot risulta una miscela di proteine co-migranti tra cui componenti della β -ossidazione degli acidi grassi (come l'enzima trifunzionale, la deidrogenasi specifica per gli Acil-CoA a lunga catena, l'Acil-CoA deidrogenasi, la propionil-CoA carbossilasi e l'Enoil-CoA isomerasi), proteine coinvolte nel mantenimento della morfologia mitocondriale e nell'organizzazione delle creste (come le subunità del complesso MICOS e le subunità F_1F_0 dell'ATP sintasi o complesso V) e subunità dei Complessi I e III. Inoltre, tra queste proteine è stata identificata anche la mG3PDH.

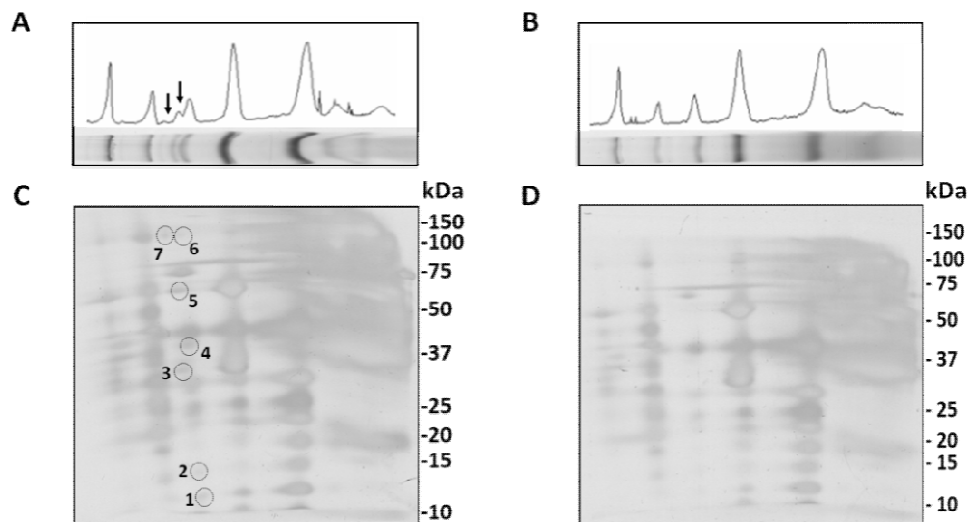


Figura 33. Analisi mediante 2D-BN-SDS-PAGE dei supercomplessi mitocondriali di BAT di topi WT e KO. BN-PAGE monodimensionale di mitocondri solubilizzati in digitonina, WT (A) e KO (B). Immagini rappresentative delle bande ottenute dalla BN PAGE dopo la colorazione con Blu di Comassie. Sono riconoscibili le bande caratteristiche dei supercomplessi del sistema di fosforilazione ossidativa e sono anche raffigurati i tracciati del profilo elettroforetico delle bande dei SC. Le frecce in (A) indicano le bande proteiche rilevate nei WT ma significativamente meno dense nei KO. Le aree di interesse del gel nativo sono state successivamente analizzate attraverso 2D-SDS-PAGE al 16% , ottenendo così gli spots visibili grazie a colorazione con nitrato d'argento (C e D).

Tabella 4 :Elenco delle proteine differientemente rappresentate nella 2DBN-SDS-PAGE di mitocondri di BAT di topi WT e KO, nel range di massa molecolare di 730-830 kDa, raggruppate in base alla funzione cellulare svolta (componenti della catena respiratoria, proteine coinvolte nell' ossidazione degli acidi grassi e nella morfologia dei mitocondri e delle creste mitocondriali). I numeri degli spot si riferiscono alla Figura 33C.

Spot	Proteine coinvolte nella catena respiratoria	Proteine coinvolte nella β-ossidazione	Proteine coinvolte nella morfologia mitocondriale e nella formazione delle creste
1	Cytochrome c oxidase subunit 6C Cytochrome b-c1 complex Rieske		
2	ATP synthase subunit e ATP synthase subunit g ATP synthase subunit f Cytochrome b-c1 complex subunit 8		ATP synthase subunit e ATP synthase subunit g ATP synthase subunit f
3	ATP synthase F(0) complex subunit B1 ATP synthase subunit alpha Cytochrome c1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfurprotein 3 Cytochrome b-c1 complex subunit 2 Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske		MICOS complex subunit Mic19 MICOS complex subunit Mic27 ATP synthase F(0) complex subunit B1 ATP synthase subunit alpha
4	ATP synthase subunit alpha ATP synthase subunit gamma		ATP synthase subunit alpha ATP synthase subunit gamma
5	ATP synthase subunit beta NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfurprotein 2 Cytochrome b-c1 complex subunit 1 Cytochrome b-c1	Trifunctional enzyme subunit beta Alpha-enolase Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	MICOS complex subunit Mic60

	complex subunit 2		
6	ATP synthase subunit alpha ATP synthase subunit beta Glycerol-3-phosphate dehydrogenase Cytochrome b-c1 complex subunit 1 Cytochrome b-c1 complex subunit 2	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9 Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase Trifunctional enzyme subunit alpha Fatty acid synthase Propionyl-CoA carboxylase alpha chain Propionyl-CoA carboxylase beta chain	ATP synthase subunit alpha ATP synthase subunit beta
7	ATP synthase subunit alpha ATP synthase subunit beta Cytochrome b-c1 complex subunit 1 Cytochrome b-c1 complex subunit 2 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase Trifunctional enzyme subunit alpha Trifunctional enzyme subunit beta Fatty acid synthase -CoA carboxylase beta chain Propionyl-CoA carboxylase alpha chain Propionyl subunit 2	MICOS complex subunit Mic60

7.9 Effetto dell'assenza di UCP3 sulle dimensioni degli adipociti e sul metabolismo lipidico e glucidico del WATg

Considerate le differenti dimensioni del tessuto adiposo gonadico osservate nei KO rispetto ai WT, sono state effettuate ulteriori analisi morfometriche. La figura 34 illustra sezioni di tessuto adiposo bianco epididimale, provenienti da topi WT e KO colorate con eosina- ematossilina. Come si evince dalla figura, gli adipociti dei topi KO presentano un'area significativamente minore di circa il 100% rispetto ai controlli WT.

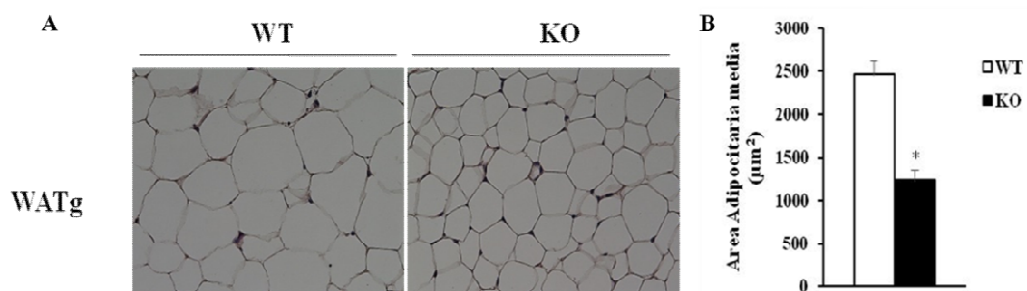


Figura 34. Valutazione dell'area adipocitaria media in sezioni di WATg isolato da topi WT e KO per UCP3. A) Immagini di microscopia ottica di sezioni di tessuto adiposo bianco gonadico di topi WT (a sinistra) e KO (a destra). Colorazione con ematossilina-eosina. B) Gli istogrammi rappresentano la quantizzazione dell'area adipocitaria. I valori rappresentano la media \pm ES di 8 diversi esperimenti (* $P < 0,05$ vs. WT).

E' stato ipotizzato che le differenze osservate nell'area adipocitaria, e quindi nelle dimensioni delle cellule che compongono il WAT dei topi KO, fossero associate ad un incrementato processo di lipolisi, il quale riduce inevitabilmente la dimensione delle goccioline lipidiche presenti all'interno degli adipociti, e di conseguenza l'area totale di questi ultimi. A tale scopo è stato valutato il rilascio di glicerolo libero da parte del tessuto adiposo bianco gonadico, isolato da topi WT e KO, in condizioni basali e sotto stimolazione di un composto simpatico-mimetico quale l'Isoproterenolo. Come è possibile notare dai grafici in Figura 35, nel WATg dei topi KO, il rilascio basale di glicerolo risulta essere significativamente incrementato, rispetto a quello dei topi WT, variazione non riscontrata sotto stimolazione da Isoproterenolo; tuttavia quest'ultimo ha indotto una stimolazione sia nei topi WT che nei KO del 200% e 100% rispettivamente.

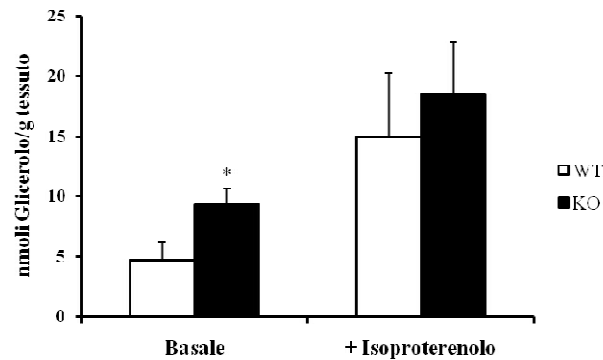


Figura 35. Rilascio di glicerolo da parte del WATg di topi WT e KO per UCP3. Istogrammi relativi alla quantità di glicerolo rilasciato nel mezzo da pezzettini di tessuto adiposo bianco gonadico isolato da topi WT e KO per UCP3, in assenza e in presenza della stimolazione da parte dell' Isoproterenolo. I valori rappresentano la media \pm ES di 5 animali per ciascun gruppo (* $P < 0,05$ vs. WT).

L'aumentato processo di lipolisi nel WATg dei topi KO è stato inoltre confermato da analisi di Western blot, effettuate sui lisati tissutali, che hanno permesso di rilevare i livelli proteici dei principali fattori (proteine ed enzimi) coinvolti nelle reazioni di scissione dei trigliceridi ad acidi grassi liberi, quali la perilipina-1 (PLIN-1), la trigliceride lipasi (ATGL), la lipasi ormone sensibile (HSL). Come è possibile osservare dalle immagini rappresentative e dalle quantizzazioni riportate sugli istogrammi in figura 36, i livelli di PLIN-1, perilipina che regola l'accesso delle lipasi alle LDs, risultano significativamente ridotti all'interno del WATg dei topi KO (~90%) rispetto ai controlli WT. Tra gli enzimi coinvolti nella lipolisi, sono state prese in considerazione le lipasi ATGL ed HSL. Mentre i livelli della prima risultano essere simili nei due gruppi sperimentali, quelli della seconda presentano una riduzione significativa di circa il 60% negli KO rispetto ai controlli WT.

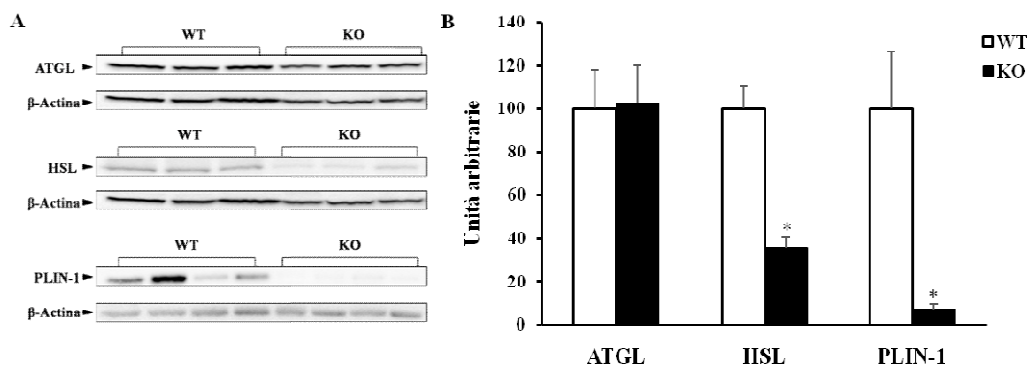


Figura 36. Livelli proteici di proteine ed enzimi coinvolti nella lipolisi nel WATg di topi WT e KO per UCP3.A) Western blot rappresentativi dei livelli proteici di PLIN-1, HSL e ATGL in lisati tissutali di WATg isolato da topi WT e KO per UCP3. B) Istogrammi relativi alle quantizzazioni delle bande. La β -actina è stata utilizzata per normalizzare i livelli proteici. Gli istogrammi rappresentano la quantizzazione relativa alle bande di interesse. Il valore medio ottenuto dai campioni WT è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media \pm ES di 6 differenti esperimenti (* $P < 0,05$ vs. WT).

7.10 Effetto dell'assenza di UCP3 sulla capacità ossidativa del WATg e sulle vie metaboliche glicolitiche

Per valutare la massima capacità ossidativa del WATg di topi WT e KO per UCP3, è stata misurata per via polarografica l'attività della citocromo c ossidasi (COX), ovvero il complesso IV della catena respiratoria, nota per essere un indicatore del corretto funzionamento dei mitocondri. In Figura 37 sono riportati gli istogrammi relativi alla velocità del consumo di O_2 della COX e, come è possibile osservare, nei KO si evidenzia una significativa riduzione del 10% di tale attività.

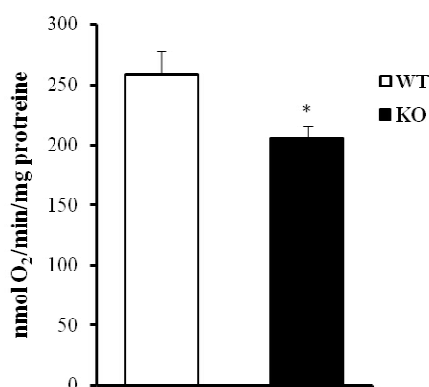


Figura 37. Valutazione dell'attività della Citocromo c ossidasi nel WATg di topi WT e KO per UCP3. I valori rappresentano la media \pm ES di 12 differenti esperimenti (*P<0,05 vs WT).

Associata a tale riduzione della capacità ossidativa del tessuto, in assenza di UCP3, è stata inoltre osservata un'incrementata attività dell'enzima citosolico Fosfofruttochinasi (PFK), che svolge un ruolo chiave nel processo glicolitico, indicando quindi un aumento del metabolismo dei carboidrati, plausibilmente atto a compensare la riduzione della produzione di ATP mitocondriale (Figura 38).

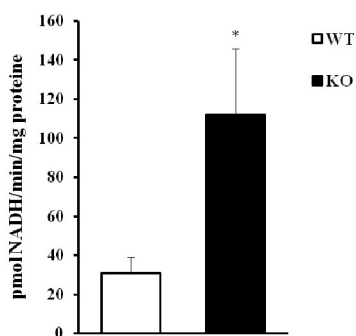


Figura 38. Attività della PFK valutata nel WATg di topi WT e KO per UCP3. I valori rappresentano la media \pm ES di 6 differenti esperimenti (*P<0,05 vs WT).

7.11 Effetto dell'assenza di UCP3 sullo stress del reticolo, sulla capacità antiossidante enzimatica mitocondriale del WATg e sulla produzione di ROS

Data la compromessa funzionalità mitocondriale del WATg riscontrata in assenza di UCP3, sono stati analizzati i livelli di espressione dei principali marker dello stress del reticolo quali gli chaperoni molecolari GRP-78/BiP e calnessina, coinvolti nel processo di folding delle proteine neo-sintetizzate, e del fattore eIF2 α , totale e nella sua forma fosforilata, in grado di mettere in atto un meccanismo di controllo del processo traduzionale in risposta allo stress dell'organello.

Come si evince dai grafici di seguito, nel tessuto dei topi KO risultano significativamente incrementati i livelli degli chaperoni Calnessina e GRP-78/BiP di 2 e 5 volte rispettivamente. Nessuna significativa differenza tra WT e KO è stata riscontrata nei livelli totali di eIF2 α , a differenza invece della sua forma fosforilata i cui livelli risultano essere significativamente incrementati di circa 6 volte nei topi KO rispetto ai controlli WT.

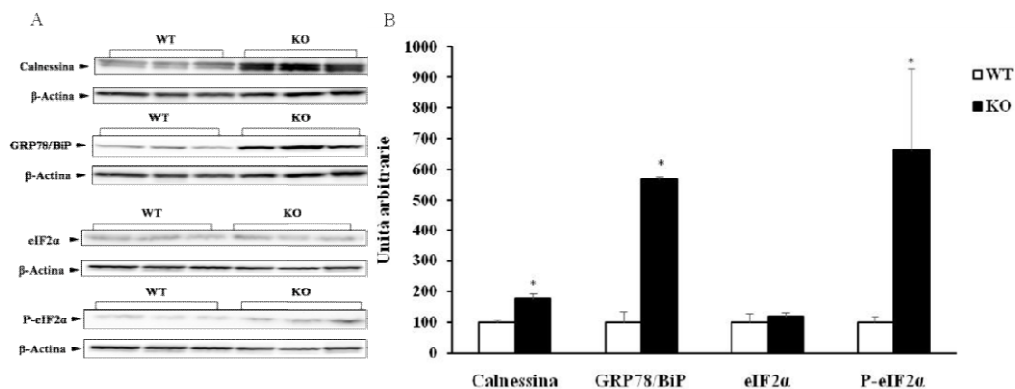


Figura39. Livelli proteici di Calnessina, GRP78/BiP e eIF2 α in lisati tissutali di WATg isolato da topi WT e KO. A) Western blot rappresentativi dei livelli proteici di GRP78/BiP, Calnessina e eIF2 α totale e fosforilata in lisati tissutali di WATg isolato da topi WT e KO per UCP3. La β -actina è stata utilizzata come normalizzatore. B) Gli istogrammi rappresentano la quantizzazione relativa alle bande di interesse. Il valore medio ottenuto dai campioni WT è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media \pm ES di 6 differenti esperimenti (*P<0,05 vs. WT).

Per valutare se la capacità antiossidante mitocondriale potesse essere influenzata dall'assenza di UCP3, sono stati rilevati i livelli proteici della Superossido Dismutasi 2 (SOD), della Catalasi (CAT) e della Glutazione perossidasi-4 (GPX-4), i principali enzimi antiossidanti mitocondriali.

In figura 40 sono raffigurati i Western Blot rappresentativi e gli istogrammi relativi alle quantizzazioni delle bande. I livelli degli enzimi GPX-4 e SOD-2 risultano significativamente incrementati nei topi KO mentre non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi nei livelli dell' enzima CAT.

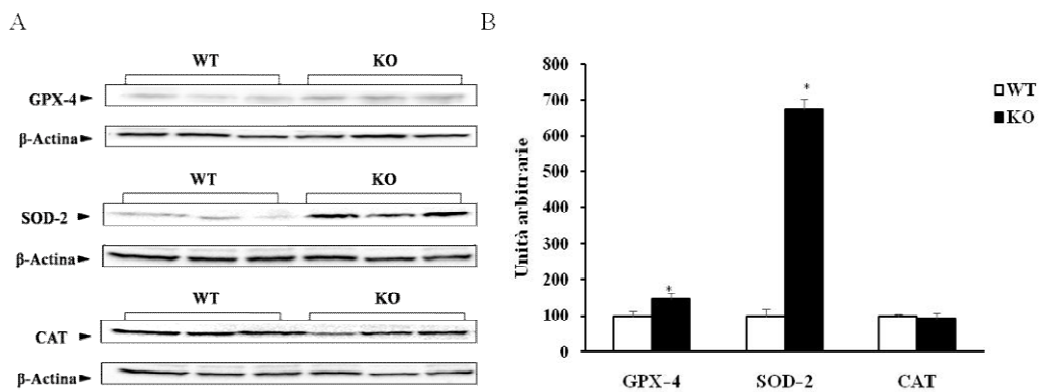


Figura 40. Livelli proteici di GPX-4, SOD-2 e CAT in lisati tissutali di WATg isolato da topi WT e KO per UCP3. A) Western blot rappresentativi dei livelli proteici degli enzimi antiossidanti mitocondriali GPX-4, SOD-2 e CAT in lisati tissutali di WATg isolato da topi WT e KO per UCP3. La β -actina è stata utilizzata come normalizzatore. B) Gli istogrammi rappresentano la quantizzazione relativa alle bande di interesse. Il valore medio ottenuto dai campioni WT è stato impostato come 100. I dati rappresentano la media \pm ES di 6 differenti esperimenti (* $P < 0,05$ vs. WT).

Infine, la misura delle specie reattive dell'ossigeno e dei radicali liberi presenti all'interno del tessuto adiposo gonadico, effettuata mediante il dosaggio della diclorofluoresceina, non ha mostrato differenze significative tra i due gruppi (Figura 41).

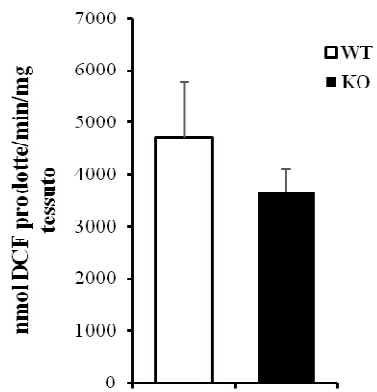


Figura 41. Livelli di ROS valutati i lisati tissutali di WATg isolato da topi WT e KO per UCP3. I valori riportati sugli istogrammi sono la media \pm ES di 6 differenti esperimenti.

DISCUSSIONE

I mitocondri svolgono un ruolo cruciale nella fisiologia cellulare ed influenzano notevolmente l'omeostasi energetica. I dati riportati nella presente tesi hanno messo in luce i meccanismi molecolari mediante i quali 3,5-T2 esercita i suoi effetti a livello dei mitocondri epatici. Inoltre hanno permesso di individuare l'impatto dell'assenza di UCP3 sulla funzionalità mitocondriale di tre diversi tessuti che contribuiscono in maniera integrata all'omeostasi energetica sistemica.

Identificazione dei meccanismi molecolari mediante i quali 3,5-T2 esercita i suoi effetti a livello dei mitocondri epatici

Negli ultimi anni un numero crescente di studi ha messo in evidenza che il controllo del metabolismo energetico da parte della tiroide non è dovuto solo all'ormone T3, e che anche altre iodotironine e metaboliti degli ormoni tiroidei possono avere un ruolo significativo. Nonostante da più di venti anni sia nota la capacità di 3,5-T2 di incrementare il metabolismo energetico e di stimolare la funzionalità mitocondriale, i meccanismi molecolari che sottendono gli effetti di tale iodotironina sono solo parzialmente noti ed i dati riportati nella presente tesi, relativi ai meccanismi molecolari mediante i quali 3,5-T2 influenza la funzionalità dei mitocondri epatici di ratto, contribuiscono a far luce su tale aspetto.

I dati riportati hanno mostrato che sia l'ipotiroidismo sia la somministrazione di iodotironine influenzano i parametri bioenergetici mitocondriali. È importante ricordare che lo stato 3 della respirazione rappresenta il consumo di ossigeno in cui il trasporto di elettroni lungo la catena è accoppiato alla sintesi di ATP. Esso è controllato sia dall'insieme di reazioni coinvolte nell'ossidazione dei substrati e nella genesi della forza proton-motrice che si instaura ai capi della membrana mitocondriale interna (Δp) (tra cui l'attività della catena di trasporto

elettronica), sia dal sistema di fosforilazione (che comprende proteine quali l'ATP sintasi e lo scambiatore ANT). Lo stato 4, invece, rappresenta la respirazione in cui il trasporto di elettroni è disaccoppiato dalla sintesi di ATP; questo è controllato sia dal processo di proton leak, sia dall'attività delle reazioni coinvolte nell'ossidazione dei substrati e nella produzione del Δp (185). Nel fegato la proteina ANT sottende il processo della proton-leak indotta dagli acidi grassi.

I dati mostrati nella presente tesi sono in accordo con quanto riportato in letteratura riguardo l'inibizione della funzionalità mitocondriale indotta dall'ipotiroidismo (196-198). Infatti l'ipotiroidismo riduce significativamente sia lo stato 4 sia lo stato 3 della respirazione.

Nei mitocondri di fegato isolati da ratti ipotiroidei, l'inibizione dell'attività della catena respiratoria e i bassi livelli di ANT portano ad una ridotta capacità dei mitocondri di sintetizzare ed esportare ATP. Allo stesso tempo la contemporanea inibizione del processo di proton-leak porta ad una ridotta dissipazione di energia sotto forma di calore. Anche una variazione della composizione dei fosfolipidi che costituiscono la membrana mitocondriale interna, nota verificarsi nei mitocondri di ratti ipotiroidei (199), potrebbe aver contribuito alla ridotta proton-leak osservata.

La somministrazione di 3,5-T2 per una settimana a ratti ipotiroidei influenza stato 4 e 3 della respirazione, ma tale effetto è evidenziabile solo in presenza di Succinato come substrato. L'effetto della iodotironina sullo stato 4 non sembra coinvolgere il processo di proton-leak ma, plausibilmente, è il risultato di un'incrementata attività delle reazioni coinvolte nell'ossidazione dello stesso Succinato, come deducibile dalle seguenti evidenze sperimentali:

- i) Il grafico che rappresenta la cinetica della proton leak relativa ai mitocondri di ratti trattati con 3,5-T2, oltre a sovrapporsi per la maggior parte con quello relativo ai mitocondri isolati da ratti ipotiroidei

(condizione che indica una assenza di variazione della conduttanza protonica della membrana mitocondriale interna) si estende verso valori della respirazione e del Δp più elevati. Tale risultato indica una maggiore attività delle reazioni coinvolte nell'ossidazione del substrato che è stato utilizzato per determinare la cinetica della proton leak, quale appunto il Succinato.

- ii) L'attività delle vie respiratorie mitocondriali associate al complesso della Succinato Deidrogenasi (noto anche come complesso II) risulta aumentata
- iii) L'attività in gel del complesso II risulta incrementata

Per quanto concerne i meccanismi che sottendono l'effetto di 3,5-T2 sullo stato 3 della respirazione, questi includono l'incremento dell'attività delle reazioni coinvolte nell'ossidazione del Succinato sopra citate, e l'incremento del contenuto mitocondriale del complesso dell'ATP sintasi (o complesso V).

Nonostante i dati riportati nella presente tesi mostrino che 3,5-T2 non regoli la dispersione dell'energia immagazzinata nel Δp sotto forma di calore attraverso il processo di proton-leak, essa è in grado di influenzare la termogenesi mitocondriale attraverso processi che coinvolgono la formazione e la successiva ossidazione di $FADH_2$. Infatti bisogna considerare che la quantità di ATP generata dall'ossidazione mitocondriale del $FADH_2$ (prodotto a partire da G3P attraverso la G3PDH o dal succinato tramite il complesso II /succinato deidrogenasi) è minore rispetto a quella che si produce dall'ossidazione del NADH a livello del complesso I della catena di trasporto elettronica (200). Tale inefficienza è da attribuirsi al fatto che la mG3PDH e il complesso II, a differenza del complesso I, non sono pompe protoniche (35). Pertanto, l'evidenza che 3,5-T2 incrementa selettivamente l'utilizzo mitocondriale di substrati respiratori dalla cui ossidazione si genera $FADH_2$ (quali Succinato e G3P) e allo stesso tempo non influenza l'ossidazione mitocondriale del NADH,

individua il meccanismo molecolare mediante il quale 3,5-T2 influenza la termogenesi mitocondriale a livello epatico.

La comparazione degli effetti indotti da 3,5-T2 con quelli di T3 ha permesso di evidenziare che entrambe le iodotironine attivano le vie respiratorie mitocondriali associate al complesso II ed alla mG3PDH, ma gli effetti indotti dalla T3 sono molto più pronunciati rispetto a quelli di 3,5-T2. Inoltre, solo T3 attiva la proton leak; in questo caso l'incremento dei livelli mitocondriali di ANT, riportati nella presente tesi, e le variazioni nella composizione del contenuto fosfolipidico della membrana mitocondriale interna, riportate in letteratura (199) plausibilmente sottendono e/o contribuiscono all'effetto di T3 sulla proton leak. Nel caso della T3, la notevole attivazione delle vie respiratorie associate alla mG3PDH, implicate nella produzione di calore mitocondriale, rappresenta un effetto termogenico che si aggiunge a quello della proton leak.

Al contrario della 3,5-T2, che ha mostrato un effetto specifico verso le vie respiratorie che vedono coinvolte l'ossidazione del FADH₂, T3 incrementa l'attività di tutte le vie respiratorie analizzate e le attività dei singoli complessi respiratori. Tali effetti, indotti da T3, possono essere spiegati dal maggior contenuto mitocondriale dei complessi respiratori e dal loro assemblaggio in strutture sovramolecolari quali i supercomplessi o respirosomi osservati. La formazione dei supercomplessi ha un vantaggio cinetico importante in quanto migliora la velocità del trasporto elettronico e incrementa la capacità ossidativa del tessuto. D'altro canto, poichè l'ipertiroidismo è associato con un aumento dello stress ossidativo mitocondriale (197), l'assemblaggio dei supercomplessi può essere vantaggioso nel limitare o bilanciare la formazione di ROS, la cui produzione eccessiva può causare danni notevoli alla cellula.

Nella loro globalità i dati presentati rivelano nuovi meccanismi molecolari alla base dell'effetto indotto dalla somministrazione cronica di 3,5-

T2 sulla velocità respiratoria mitocondriale e sulla termogenesi mitocondriale, che contribuiscono quindi all'aumento del dispendio energetico dell'intero animale. Inoltre, i dati presentati indicano che 3,5-T2 e T3 condividono solo alcuni dei loro effetti a livello mitocondriale e che i meccanismi molecolari che li sottendono variano sostanzialmente: 3,5-T2, influenzando le proprietà cinetiche di specifiche vie respiratorie mitocondriali, sarebbe coinvolta nel mediare una risposta rapida dell'organello alle variazioni delle richieste energetiche cellulari, mentre T3, incrementando i livelli proteici dei complessi respiratori mitocondriali e favorendone l'organizzazione in supercomplessi, indurrebbe una risposta più lenta, prolungata e più sostenuta dell'organello.

Ruolo di UCP3 nell'omeostasi energetica

Per quanto riguarda il secondo aspetto degli studi affrontati durante il dottorato di ricerca, finalizzati ad individuare se e come UCP3 potesse influenzare l'omeostasi energetica, si è scelto di avvalersi di topi privi di UCP3 stabulati alla temperatura di termoneutralità come modello animale. Ciò ha permesso di minimizzare lo stress termico a cui sono soggetti gli animali, importante aspetto per gli studi metabolici, e di rendere i risultati ottenuti più facilmente traslabili all'uomo che, per se stesso, crea un ambiente termoneutrale, grazie agli abiti che indossa e al riscaldamento degli ambienti (177).

I risultati mostrati hanno indicato che l'assenza di UCP3 ha un profondo impatto sui mitocondri e sulla fisiologia dei vari tessuti in cui è espressa e che contribuiscono all'omeostasi energetica. In particolare, i dati ottenuti hanno permesso di evidenziare che l'assenza di UCP3 riduce significativamente la velocità metabolica a riposo, la spesa energetica a riposo, l'*intake* energetico e l'utilizzo di lipidi come substrati metabolici. Inoltre l'assenza di UCP3 è anche

associata a stress ossidativo, come osservabile dagli aumentati livelli serici di 8-OHdG.

E' noto che un eccessivo rilascio di FA nel torrente ematico, se non compensato da un'adeguata ossidazione degli stessi, può comportarne l'accumulo in tessuti "magri" e indurre lipotossicità, condizione che predispone all'insorgenza di patologie dismetaboliche (201).

Questo "quadro metabolico" viene osservato nei topi KO, in cui

- i) l'ossidazione dei grassi è attenuata, come deducibile dall'aumento del quoziente respiratorio dell'animale e dalla riduzione dell'ossidazione mitocondriale di acidi grassi, determinata nei mitocondri di muscolo e BAT;
- ii) la capacità del tessuto adiposo di immagazzinare TG è compromessa, come si evince dalla riduzione della massa del WATg e dell'area degli adipociti, a cui si associa anche un aumento della lipolisi;
- iii) si riscontra un accumulo dei lipidi nel fegato e nel muscolo scheletrico, valutabili grazie alle analisi istologiche.

Nella loro globalità questi dati indicano che UCP3 ha un impatto sull'omeostasi energetica ed esercita un ruolo protettivo contro la lipotossicità nei tessuti magri, evitando accumuli ectopici di grasso. Quanto detto è presumibilmente il risultato delle alterazioni della funzionalità mitocondriale che si osservano nei tessuti che esprimono UCP3, ognuno dei quali dà il suo contributo specifico all'omeostasi energetica.

In particolare, nel muscolo scheletrico l'assenza di UCP3 non influenza i parametri respiratori mitocondriali (stato 3 e stato 4), quando sono utilizzati come substrati respiratori Piruvato e Succinato. Considerando i fattori responsabili del controllo dello stato 3 e dello stato 4 della respirazione, già menzionati nella sezione precedente della discussione, i dati riportati

indicano che le reazioni coinvolte nella sintesi e nell'esporto dell'ATP e quelle coinvolte nell'ossidazione dei substrati non sono influenzate significativamente dall'assenza di UCP3. L'assenza di variazioni dello stato 4 è in accordo con i dati relativi alle cinetiche della proton leak basale, determinate in mitocondri di muscolo di topi WT e KO in assenza di acidi grassi, che risultano sovrapponibili. Di notevole importanza è l'evidenza che la proteina è coinvolta nella proton leak indotta da acidi grassi, in quanto le cinetiche determinate in presenza di acido arachidonico, hanno mostrato che nei topi KO la proton leak risulta inibita rispetto ai WT. Infatti, il muscolo scheletrico rappresenta la maggior parte della massa metabolicamente attiva di un animale, e la proton leak di tale tessuto contribuisce alla velocità metabolica dell'animale per circa il 20% (50). Pertanto, la riduzione della proton leak inducibile dagli acidi grassi, osservata nei mitocondri di muscolo scheletrico di topi KO, può aver contribuito significativamente al declino della velocità metabolica e della spesa energetica dell'animale in toto.

La riduzione della velocità dello stato 3 della respirazione, rilevata nei mitocondri di muscolo dei topi KO in presenza di Palmitoil-carnitina, suggerisce che tale fenomeno è il risultato di un'alterata attività delle reazioni coinvolte nell'ossidazione di tale substrato e che contribuisce, quindi, alla ridotta capacità dell'animale di utilizzare grassi come substrati metabolici.

Tra i tessuti che esprimono UCP3, il BAT è quello che ne presenta i più alti livelli (202). Nonostante sia ben noto che tale tessuto è coinvolto principalmente nella termogenesi adattativa, indotta dall'esposizione degli animali a temperature al di sotto della termoneutralità, studi più recenti hanno mostrato che esso è in grado di contribuire all'omeostasi energetica anche in assenza di stimoli termici (138). Gli studi effettuati durante il dottorato hanno permesso di evidenziare che la compromissione della

funzionalità del BAT possa aver contribuito alle alterazioni dei parametri metabolici osservate nei topi KO.

In particolare, i mitocondri di BAT provenienti da topi KO mostrano una ridotta capacità di utilizzare acidi grassi come substrati metabolici. Nel BAT, il cofattore trascrizionale PGC-1 α è il principale regolatore della biogenesi mitocondriale ed è coinvolto nel metabolismo lipidico e nell'ossidazione degli acidi grassi a lunga catena (203). I minori livelli proteici di PGC-1 α , osservati nel BAT dei topi KO, sottendono plausibilmente la ridotta capacità mitocondriale di ossidare acidi grassi osservata.

Un altro fattore che può contribuire a tale fenomeno è l'alterazione dell'organizzazione sovramolecolare in complessi multi-enzimatici funzionali delle proteine coinvolte nella β -ossidazione degli acidi grassi. In linea con questa considerazione, il profilo elettroforetico delle proteine mitocondriali di topi WT estratte con digitonina, ottenuto con BN-PAGE, mostra due bande d'intensità maggiore rispetto ai KO. Tali dati indicano che l'assenza di UCP3 può modificare l'assemblaggio sovramolecolare e/o i livelli di specifici complessi proteici mitocondriali. L'analisi 2D BN-SDS-PAGE, combinata con la nanoLC-ESI-LIT-MS/MS, ha poi permesso di identificare alcune delle proteine presenti nei multicomplexi che risultavano sovrarappresentati nei mitocondri di topi WT. Tra queste, sono stati riscontrati enzimi coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi (come l'enzima trifunzionale, la deidrogenasi specifica per gli Acil-CoA a lunga catena, l'Acil-CoA deidrogenasi, la propionil-CoA carbossilasi e l'Enoil-CoA isomerasi), supportando quanto ipotizzato.

L'assenza di UCP3 influenza negativamente anche l'ossidazione mitocondriale di G3P. Tale processo vede coinvolto l'enzima mG3PDH, che rappresenta la componente mitocondriale dello shuttle del Glicerolo-fosfato. L'espressione di mG3PDH è particolarmente alta nei tessuti che per il loro

funzionamento richiedono principalmente ATP proveniente dal processo glicolitico (35). Tra questi si annovera il BAT, in cui la produzione mitocondriale di ATP è esigua, dati i livelli molto bassi del complesso dell'ATP sintasi e gli elevati livelli di UCP1 (138). Infatti, una delle funzioni principali di mG3PDH è la ri-ossidazione del NADH citosolico, che permette al processo glicolitico di procedere velocemente senza che si accumulino lattato (35). Allo stesso tempo, mediando il trasferimento di elettroni, provenienti dal NADH citosolico alla catena respiratoria mitocondriale, attraverso la formazione di FADH₂, mG3PDH contribuisce alla funzione termogenica del BAT (35). Tenendo conto di queste considerazioni, i dati riportati nella presente tesi, suggeriscono che l'assenza di UCP3, riducendo l'ossidazione mitocondriale del G3P, nel BAT, sia in grado di influenzare la velocità di produzione di energia citosolica, e i processi termogenici mitocondriali. In particolare, l'inibizione delle reazioni coinvolte nell'ossidazione del G3P e dell'attività in gel dell'enzima mG3PDH, osservati nei mitocondri di topi KO, sembrano essere il risultato di un meccanismo post traduzionale; infatti i livelli proteici di mG3PDH rilevati nel BAT non risultano influenzati dal genotipo dell'animale. Diversi fattori possono essere coinvolti nella regolazione allosterica della mG3PDH, tra cui lo stress ossidativo e i metaboliti lipidici come gli acidi grassi liberi e gli acil-CoA, che inibiscono l'enzima (204-206). Data la ridotta capacità dei mitocondri di BAT KO di utilizzare gli Acil-CoA come substrati metabolici, è presumibile che essi si accumulino, attuando un'inibizione sull'enzima mG3PDH.

Mráček et al (2014) hanno dimostrato la capacità di mG3PDH di associarsi in omoligomeri e in supercomplessi ad alto peso molecolare (35). Come già precedentemente citato, l'organizzazione sovramolecolare dei componenti della catena respiratoria in supercomplessi migliora la velocità di trasferimento elettronico tra vari complessi e limita la produzione di ROS

(207). In tale ambito, i dati ottenuti, relativi all'analisi delle proteine presenti nei multicompleksi sovrarappresentati nei topi WT, suggeriscono che mG3PDH interagisce con il complesso III formando un supercomplesso che, nei mitocondri dei topi KO, non si assembla correttamente o non si assembla affatto. Perciò, è plausibile che l'alterazione dell'assemblaggio sovramolecolare di mG3PDH in supercomplessi funzionali sottenda la ridotta capacità dei mitocondri KO di utilizzare G3P come substrato respiratorio. Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione è che l'enzima mG3PDH è un importante sito di produzione di superossido (35,208-210), e, nel BAT, sembra essere responsabile di circa il 63% della produzione totale di H₂O₂ (210). La compromissione dell'associazione tra mG3PDH e Complesso III nei topi KO potrebbe anche essere alla base della maggiore percentuale di elettroni che, durante il loro trasporto lungo la catena respiratoria, sfuggono ad essa e riducono l'ossigeno a O₂^{-•} (electron-leak).

I risultati riportati nella presente tesi indicano anche che la prima linea di difesa antiossidante, che protegge i mitocondri dai danni indotti dall'anione superossido, e che comprende enzimi quali SOD-2, CAT e GPX-4, è significativamente up-regolata nel BAT dei topi KO, e suggeriscono l'insorgenza di un meccanismo compensatorio nei mitocondri privi di UCP3, atto a rimuovere l'anione superossido e a metabolizzare l'H₂O₂ e gli idroperossidi lipidici. Nonostante ciò, il rilascio mitocondriale di H₂O₂, che in realtà dipende dal bilancio tra la sua produzione e la sua metabolizzazione, non è influenzato dall'assenza di UCP3, indicando che i mitocondri di BAT dei topi KO hanno una maggiore capacità di produrre ROS. Tale ipotesi è sostenuta, inoltre, dalle evidenze che nei mitocondri di BAT di topi KO si osserva l'incremento dell'electron-leak (in presenza di G3P come substrato della respirazione) e del danno ossidativo a carico dei lipidi.

Tra le proteine presenti nei multicompleksi sovrarappresentati nei mitocondri di topi WT, sono comprese alcune proteine coinvolte nella formazione e nella stabilizzazione delle creste mitocondriali. In particolare sono state identificate proteine del sistema MICOS, responsabili dei siti di contatto tra le membrane mitocondriali interna ed esterna (211) e alcune subunità del complesso dimerico dell'ATP-sintasi, che contribuiscono al ripiegamento delle creste (212). Questa potrebbe essere la causa dell'alterata morfologia mitocondriale osservata in alcuni adipociti bruni di topi KO, che mostrano mitocondri rigonfi con creste sottili e disorientate o in numero ridotto.

Nella loro globalità i risultati ottenuti mettono in luce per la prima volta il ruolo cruciale svolto da UCP3 nel preservare la funzionalità mitocondriale del BAT e l'organizzazione sovramolecolare delle proteine mitocondriali, importante per i) il mantenimento di un'adeguata velocità dell'ossidazione dei grassi, ii) limitare lo stress ossidativo, iii) la struttura delle creste mitocondriali.

Anche il WAT influenza l'omeostasi energetica e, nonostante contenga un esiguo numero di mitocondri, questi ultimi svolgono un ruolo chiave nella funzionalità del tessuto regolando i processi di lipolisi, lipogenesi de-novo e riesterificazione dei FA. Nel WAT, la disfunzione mitocondriale pertanto, può portare ad alterazioni della capacità dell'adipocita di accumulare TG (213,214). Inoltre la stessa disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo che ne consegue scatenano una serie di eventi interrelati, come lo stress del reticolo e la risposta indotta dalle proteine mal-ripiegate (*Unfolded Protein Response*, UPR). Il folding proteico è un processo energeticamente dispendioso e fortemente influenzato dallo stato redox cellulare. La risposta UPR prevede l'attivazione di vie di segnalazione che partono dal reticolo endoplasmatico mirate a ripristinare la funzione normale della cellula. A tale scopo viene inibito il processo della sintesi

proteica, incrementa la produzione di chaperoni molecolari coinvolti nel ripiegamento proteico e viene potenziata la difesa antiossidante. Qualora questi obiettivi non vengano raggiunti, la risposta UPR dirige la cellula verso la morte programmata (apoptosi). Alcune evidenze indicano che lo stress del reticolo sembra anche essere coinvolto nell'attivazione del processo lipolitico (215).

Nei topi privi di UCP3, la ridotta funzionalità mitocondriale osservata nel WATg, è associata all'attivazione di una serie di risposte cellulari che sono in linea con quanto sopra descritto, quali appunto lo stress del reticolo endoplasmatico e il processo di lipolisi basale (spontanea). Partendo proprio da quest'ultima, i risultati ottenuti hanno mostrato che essa sembra essere il risultato di ridotti livelli di perilipina A (PLIN-1), che, come ampiamente riportato in letteratura, è una proteina che riveste la goccia lipidica e che impedisce alle lipasi di poter "attaccare" i trigliceridi (216). Inoltre, PLIN-1 lega il co-attivatore (ABHD5) di ATGL, inibendolo (217). La dissociazione di PLIN-I dalla goccia lipidica consente il distacco di ABHD5 da ATGL (i cui livelli non variano tra topi WT e KO per UCP3), consentendo a quest'ultima di accedere alla goccia lipidica e idrolizzare i trigliceridi con la liberazione di FA e di diacilglicerolo (DAG). Nei topi KO, inoltre, i livelli di HSL, lipasi che contribuisce alla lipolisi indotta dall'attivazione del sistema nervoso simpatico (che può essere simulata dall'isoproterenolo), e che ha come substrato il DAG, risultano invece significativamente ridotti rispetto ai WT. Tali osservazioni suggeriscono che nel tessuto si verifichi un accumulo di DAG, lipide implicato nell'attivazione dei processi infiammatori e nell'insorgenza dell'insulino-resistenza (218) ma ulteriori studi sono necessari per verificare quanto ipotizzato.

Nel WATg, l'assenza di UCP3, provoca l'attivazione della risposta UPR, che è stata verificata dall'attivazione di una delle tre vie coinvolte, quale PERK-eIF2 α -ATF4 (219). Questa via coinvolge il sensore molecolare

PERK, una chinasi in grado di fosforilare il fattore di traduzione eIF2 α . La fosforilazione di eIF2 α è seguita da una ridotta sintesi proteica generale, finalizzata a rallentare il carico di proteine che devono essere correttamente ripiegate, e dall'attivazione del fattore di trascrizione ATF4 che regola la trascrizione di geni codificanti per chaperoni molecolari (219). I dati riportati nella presente tesi indicano appunto che l'assenza di UCP3 è associata ad un incremento dei livelli di eIF2 α , fosforilata e attivata, e dei due chaperoni molecolari quali GRP78 BiP e Calnessina, quest'ultima coinvolta nel retro-trasporto delle proteine mal ripiegate dal lume del reticolo al citoplasma, ove vengono poi degradate.

Analogamente a quanto osservato nel BAT, nonostante la capacità antiossidante enzimatica mitocondriale sia significativamente incrementata nei topi privi di UCP3, nel WATg non sono state riscontrate variazioni nei livelli tissutali di ROS, indicando che il tessuto mette in atto meccanismi per contrastare lo stress ossidativo associato all'assenza di UCP3.

Nella loro globalità i dati riportati nella presente tesi hanno individuato in UCP3 un componente molecolare che regola la funzionalità di mitocondri dei diversi tessuti in cui è espressa, ognuno dei quali contribuisce in modo specifico all'omeostasi energetica. Essi contribuiscono a chiarire l'associazione tra patologie dismetaboliche e la riduzione dei livelli di UCP3 riportati in studi clinici sull'uomo (163,164). Gli stessi permettono di considerare UCP3 un possibile target terapeutico per lo sviluppo di nuovi farmaci diretti a livello mitocondriale ed in grado di contrastare le patologie dismetaboliche.

BIBLIOGRAFIA

1. Desler C., Rasmussen LJ. Mitochondria in biology and medicine--2012. *Mitochondrion*. 16, 2-6 (2014).
2. Koopman, W. J., Willems, P. H. & Smeitink, J. A. Monogenic mitochondrial disorders. *N. Engl. J. Med.* 366, 1132–1141 (2012).
3. Wallace, D. C., Fan, W. & Procaccio, V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 297–348 (2010).
4. Pfeffer, G., Majamaa, K., Turnbull, D. M., Thorburn, D. & Chinnery, P. F. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD004426 (2012).
5. Mehta, M. M., Weinberg, S. E. & Chandel, N. S. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 608–620 (2017).
6. Nunnari, J. & Suomalainen, A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145–1159 (2012).
7. Suomalainen A. & Battersby B. J. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 77–92 (2017).
8. Ahn, C. S. & Metallo, C. M. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer Metab.* 3, 1 (2015).
9. Brand M., Orr A., Perevoshchikova I. and Quinlan C., The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *British Journal of Dermatology*. 169, 1-8 (2013).
10. Vyas, S., Zaganjor, E. & Haigis, M. C. Mitochondria and cancer. *Cell* 166, 555–566 (2016).
11. Gorman, G. S. et al. Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2, 16080 (2016).
12. Whitaker, R. M., Corum, D., Beeson, C. C. & Schnellmann, R. G. Mitochondrial biogenesis as a pharmacological target: a new approach to acute and chronic diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 229–249 (2016).

13. Hassani, A., Horvath, R. & Chinnery, P. F. Mitochondrial myopathies: developments in treatment. *Curr. Opin. Neurol.* 23, 459–465 (2010).
14. Wai, T. & Langer, T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 105–117 (2016).
15. Koopman, W. J., Distelmaier, F., Esseling, J. J., Smeitink, J. A. & Willems, P. H. Computer-assisted live cell analysis of mitochondrial membrane potential, morphology and calcium handling. *Methods* 46, 304–311 (2008).
16. Moehle, E. A., Shen, K. & Dillin, A. Mitochondrial proteostasis in the context of cellular and organismal health and aging. *J. Biol. Chem.* (2018).
17. Wallace, D. C. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 440–450 (2010).
18. Sorrentino V., Menzies K. J. & Auwerx, J. Repairing mitochondrial dysfunction in disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58, 353–389 (2018).
19. Andreux, P. A., Houtkooper, R. H. & Auwerx, J. Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 465–483 (2013).
20. Smith, R. A., Hartley, R. C., Cocheme, H. M. & Murphy, M. P. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 341–352 (2012).
21. Sivitz, W. I. & Yorek, M. A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 537–577 (2010).
22. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* 2014, 943162 (2014).
23. Harper ME, Green K, Brand MD. The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Annu Rev Nutr.* 28, 13-33 (2008).
24. Quiros, P. M., Langer, T. & Lopez-Otin, C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 345–359 (2015).

25. Zutz, A., Gompf, S., Schagger, H. & Tampe, R. Mitochondrial ABC proteins in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 681–690 (2009).
26. Soubannier V. et al. A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr. Biol.* 22, 135–141 (2012).
27. Sugiura A., McLelland G. L., Fon E. A. & McBride H. M. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.* 33, 2142–2156 (2014).
28. Valero T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr. Pharm. Design* 20, 5507–5509 (2014).
29. Scarpulla, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1269–1278 (2011).
30. Yatsuga, S. & Suomalainen, A. Effect of bezafibrate treatment on late-onset mitochondrial myopathy in mice. *Hum. Mol. Genet.* 21, 526–535 (2012).
31. Viscomi, C. et al. In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 α axis. *Cell Metab.* 14, 80–90 (2011).
32. Herzig, S. & Shaw, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 121–135 (2017).
33. Nicholls, D. G. & Ferguson, S. J. *Bioenergetics* 4th edn. (Academic Press, 2013).
34. Palmieri, F. The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol. Aspects Med.* 34, 465–484 (2013).
35. Mráček T, Drahotka Z., Houštěk J. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues (Review) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827, 401–410 (2013).
36. Kröger A, Klingenberg M. Quinones and nicotinamide nucleotides associated with electron transfer. *Vitam Horm.* 1970;28:533–74 (1970).
37. Fahien LA, Laboy JI, Din ZZ, Prabhakar P, Budker T, Chobanian M. Ability of cytosolic malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase to

increase the ratio of NADPH to NADH oxidation by cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 364(2):185-94 (1999).

38. Koza RA, Kozak UC, Brown LJ, Leiter EH, MacDonald MJ, Kozak LP. Sequence and tissue-dependent RNA expression of mouse FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*. 336(1),97-104 (1996).

39. Schägger H. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52, 119–128 (2001).

40. Jang S, Javadov S. Current Challenges in Elucidating Respiratory Supercomplexes in Mitochondria: Methodological Obstacles. *Front Physiol*. 16;9,238 (2018).

41. Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., and Genova, M. L. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid. Redox Signal*. 19, 1469–1480 (2013).

42. Milenkovic, D., Blaza, J. N., Larsson, N.-G., and Hirst, J. The Enigma of the respiratory chain supercomplex. *Cell Metab*. 25, 765–776. (2017).

43. Schägger H., and Pfeiffer, K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*. 19, 1777–1783 (2000).

44. Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J. A.. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* 32, 529–539 (2008).

45. Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., et al.. The architecture of the mammalian respirasome. *Nature*. 537, 639–643 (2016).

46. Letts, J. A., Fiedorczuk, K., and Sazanov, L. A. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* 537, 644–648 (2016).

47. Wu, M., Gu, J., Guo, R., Huang, Y., and Yang, M. Structure of mammalian respiratory supercomplex I1III2IV1. *Cell* 167, 1598–1609.e10 (2016).

48. Sousa J. S., Mills D. J., Vonck J., and Kühlbrandt W. Functional asymmetry and electron flow in the bovine respirasome. *eLife* 5:e21290 (2016).

49. Brand M.D., Chien L.F., Ainscow E.K., Rolfe D.F.S., Porter R.K., The causes and functions of mitochondrial proton leak, *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 132-139 (1994).
50. Rolfe D.F.S., Newman J.M.B., Buckingham J.A., Clark M.G., Brand M.D., Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR, *Am. J. Physiol.* 276, C692-C699 (1999).
51. Brookes P.S., Buckingham J.A., Tenreiro A.M., Hulbert A.J., Brand M.D., The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition, *Comp. Biochem. Physiol. B* 119, 325-334 (1998).
52. Porter R.K., Hulbert A.J., Brand M.D., Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition, *Am. J. Physiol.* 271, R1550-R1560 (1996).
53. Fontaine E.M., Moussa M., Devin A., Garcia J., Ghisolfi J., Rigoulet M., Leverve X.M., Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1276, 181-187 (1996).
54. Brookes P.S., Rolfe D.F.S., Brand M.D., The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: comparison with isolated mitochondria, *J. Membr. Biol.* 155, 167-174 (1997).
55. Sheldon J.G., Williams S.P., Fulton A.M., Brindle K.M., ³¹P NMR magnetization transfer study of the control of ATP turnover in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6399-6404 (1996).
56. Skulachev V.P., Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 100-124 (1998).
57. Moreno M., Lombardi A., Beneduce L., Silvestri E., Pinna G., Goglia F., et al. Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* 143, 504–510 (2002).
58. Goglia F. Biological effects of 3,5-diiodothyronine (T₂). *Biochemistry (Mosc)* 70, 164–172 (2005).
59. Lombardi A, De Matteis R, Moreno M, Napolitano L, Busiello RA, et al. Responses of skeletal muscle lipid metabolism in rat gastrocnemius to

hypothyroidism and iodothyronine administration: a putative role for FAT/CD36. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303(10), E1222–E1233 (2012).

60. Lombardi A., Lanni A., Moreno M., Brand M. D., Goglia F. Effect of 3,5-di-iodo-L-thyronine on the mitochondrial energy-transduction apparatus *Biochem. J.* 330, 521–526 (1998).

61. Cavallo A., Taurino F., Damiano F., Siculella L., Sardanelli A. M., Gnoni A. Acute administration of 3,5-diiodo-L-thyronine to hypothyroid rats stimulates bioenergetic parameters in liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 48, 521–529 (2016).

62. Lombardi A., Senese R., De Matteis R., Busiello R.A., Cioffi F., Goglia F., et al. 3,5-Diiodo-L-Thyronine Activates Brown Adipose Tissue Thermogenesis in Hypothyroid Rats. *PLoS ONE* 10(2), e0116498(2015).

63. Lombardi A., Moreno M., de Lange P., Iossa S., Busiello R.A. and Goglia F. Regulation of skeletal muscle mitochondrial activity by thyroid hormones: focus on the “old” triiodothyronine and the “emerging” 3,5-diiodothyronine. *Front. Physiol.* 6:237 (2015).

64. Goglia F., Lanni A., Horst C., Moreno M., Thoma R. In vitro binding of 3,5-di-iodo-L-thyronine to rat liver mitochondria. *J Mol Endocrinol.* 13(3), 275–282 (1994).

65. Lombardi, A.; Lanni, A.; de Lange, P.; Silvestri, E.; Grasso, P.; Senese, R.; Goglia, F.; Moreno, M. Acute administration of 3,5-diiodo-L-thyronine to hypothyroid rats affects bioenergetic parameters in rat skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett.* 581, 5911–5916 (2007).

66. Arnold S., Goglia F., Kadenbach B. 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur J Biochem.* 252(2), 325-30 (1998).

67. Hummerich H., Soboll S. Rapid stimulation of calcium uptake into rat liver by L-tri-iodothyronine. *Biochem J.* 258(2), 363–367 (1989).

66 diventano 68. Lombardi, A., Grasso, P., Moreno, M., de Lange, P., Silvestri, E., Lanni, A., Goglia, F. Interrelated influence of superoxides and free fatty acids over mitochondrial uncoupling in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* 1777, 826-833 (2008).

69. Lombardi A., Beneduce L., Moreno M., Diano S., Colantuoni V., Ursini M.V., Lanni A., Goglia F. 3,5-diiodo-L-thyronine regulates glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the rat. *Endocrinology*. 141(5),1729-34 (2000).
70. Gnoni A, Siculella L, Paglialonga G, Damiano F, Giudetti AM. 3,5-diiodo-L-thyronine increases de novo lipogenesis in liver from hypothyroid rats by SREBP-1 and ChREBP-mediated transcriptional mechanisms. *IUBMB Life*. 71(7):863-872 (2019).
71. Gnocchi D, Ellis ECS, Johansson H, Eriksson M, Bruscalupi G, Steffensen KR, Parini P. Diiodothyronines regulate metabolic homeostasis in primary human hepatocytes by modulating mTORC1 and mTORC2 activity. *Mol Cell Endocrinol*. 499,110604 (2020).
72. Lanni A., Moreno M., Lombardi A., Goglia F. Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *The Journal of Physiology*. 494 (1996).
73. Scapin S., Leoni S., Spagnuolo S., Gnocchi D., De Vito P., Luly P., Pedersen J.Z., Incerpi S. Short-term effects of thyroid hormones during development: Focus on signal transduction. *Steroids*. 75(8-9),576-84 (2010).
74. Grasselli E., Voci A., Canesi L., De Matteis R., Goglia F., Cioffi F., Fugassa E., Gallo G., Vergani L. Direct effects of iodothyronines on excess fat storage in rat hepatocytes. *Journal of Hepatology* 54:1230–1236 (2011)
75. Grasselli E., Voci A., Demori I., Canesi L., De Matteis R., Goglia F., Lanni A., Gallo G., Vergani L. 3,5-Diiodo-L-thyronine modulates the expression of genes of lipid metabolism in a rat model of fatty liver. *J Endocrinol*. 212(2), 149-58 (2012).
76. Jonas W., Lietzow J., Wohlgemuth F., Hoefig C.S., Wiedmer P., Schweizer U., et al. 3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-T₂) exerts thyromimetic effects on hypothalamus-pituitary-thyroid axis, body composition, and energy metabolism in male diet-induced obese mice. *Endocrinology* 156,389–99 (2015)
77. Lanni A., Moreno M., Lombardi A., de Lange P., Silvestri E., Ragni M., et al. 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *FASEB J*. 19,1552–4 (2005).
78. Goldberg I.J., Huang L.S., Huggins L.A., Yu S., Nagareddy P.R., Scanlan T.S., et al. Thyroid hormone reduces cholesterol via a non-LDL receptor-mediated pathway. *Endocrinology*. 153,5143–9 (2012).

79. Antonelli A., Fallahi P., Ferrari S.M., Di Domenicantonio A., Moreno M., Lanni A., et al. 3,5-diiodo-L-thyronine increases resting metabolic rate and reduces body weight without undesirable side effects. *J BiolRegulHomeost Agents*. 25,655–60 (2011).
80. Grasselli E., Canesi L., Voci A., De Matteis R., Demori I., Fugassa E., Vergani L. Effects of 3,5-diiodo-L-thyronine administration on the liver of high fat diet-fed rats. *Experimental Biology and Medicine* 233549–55 (2008).
81. de Lange P., Cioffi F., Senese R., Moreno M., Lombardi A., Silvestri E., et al. Nonthyrotoxic prevention of diet-induced insulin resistance by 3,5-diiodo-L-thyronine in rats. *Diabetes* (2011).
82. Mollica MP., Lionetti L., Moreno M., Lombardi A., De Lange P., Antonelli A., et al. 3,5-diiodo-L-thyronine, by modulating mitochondrial functions, reverses hepatic fat accumulation in rats fed a high-fat diet. *J Hepatol*. 51,363–70 (2009).
83. Moreno M., Silvestri E., De Matteis R., de Lange P., Lombardi A., Glinni D., et al. 3,5-Diiodo-L-thyronine prevents high-fat-diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle through metabolic and structural adaptations. *FASEB J*. 25, 3312–3324 (2011).
84. Iannucci L.F., Cioffi F., Senese R., Goglia F., Lanni A., Yen P.M., Sinha R.A. Metabolomic analysis shows differential hepatic effects of T2 and T3 in rats after short-term feeding with high fat diet. *Sci Rep*. 7(1),2023 (2017).
85. Silvestri E., Coppola M., Cioffi F., Goglia F. Proteomic approaches for the study of tissue specific effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and 3,5-diiodo-L-thyronine in conditions of altered energy metabolism. *Front Physiol*. 5,491 (2014).
86. Silvestri E., Cioffi F., De Matteis R., Senese R., de Lange P., Coppola M., Salzano A.M., Scaloni A., Ceccarelli M., Goglia F., Lanni A., Moreno M., Lombardi A. 3,5-Diiodo-L-Thyronine Affects Structural and Metabolic Features of Skeletal Muscle Mitochondria in High-Fat-Diet Fed Rats Producing a Co-adaptation to the Glycolytic Fiber Phenotype. *Front Physiol*. 9,194 (2018).
87. Silvestri E., Senese R., Cioffi F., De Matteis R., Lattanzi D., Lombardi A., Giacco A., Salzano A.M., Scaloni A., Ceccarelli M., Moreno M., Goglia F., Lanni A., de Lange P. 3,5-Diiodo-L-Thyronine Exerts Metabolically Favorable Effects on Visceral Adipose Tissue of Rats Receiving a High-Fat Diet. *Nutrients*. 11(2),278 (2019).

88. Senese R., Cioffi F., De Matteis R., Petito G., de Lange P., Silvestri E., Lombardi A., Moreno M., Goglia F., Lanni A. 3,5-Diiodo-L-Thyronine (T₂) Promotes the Browning of White Adipose Tissue in High-Fat Diet-Induced Overweight Male Rats Housed at Thermoneutrality. *Cells*. 8(3) (2019).
89. Moreno M., Silvestri E., Coppola M., Goldberg I.J., Huang L.S., Salzano A.M., et al. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine- and 3,5-diiodo-L-thyronine- affected metabolic pathways in liver of LDL receptor deficient mice. *Front Physiol*. 7, 545 (2016).
90. Padron A. S., Neto R. A., Pantaleão T. U., de Souza Santos M. C., Araujo R. L., de Andrade B. M., et al. Administration of 3,5-diiodothyronine (3,5-T₂) causes central hypothyroidism and stimulates thyroid-sensitive tissues. *J Endocrinol*. 221, 415–427 (2014).
91. Coppola M., Cioffi F., Moreno M., Goglia F., Silvestri E. 3,5-diiodo-L-thyronine: A possible pharmacological agent? *Curr Drug Deliv*. 13(3), 330-8 (2016).
92. Lehmpfuhl I., Brabant G., Wallaschofski H., Ruchala M., Strasburger C.J., Köhrle J., Wu Z. Detection of 3,5-diiodothyronine in sera of patients with altered thyroid status using a new monoclonal antibody-based chemiluminescence immunoassay. *Thyroid*. 24(9), 1350-60 (2014).
93. Meinhold H., Shurnbard P. A radioimmunoassay for 3,5-diiodothyronine *Clin Endocrinol*. 8, 493–7 (1978).
94. Faber J, Lumholtz IB, Kirkegaard C, Siersbaek-Nielsen KFT. Isolation of radioactive iodothyronines for kinetic studies: a comparison of two methods. *Acta Endocrinol*. 99, 64–71 (1982).
95. Pinna G., Meinhold H., Hiedra L., Thoma R., Hoell T., Gräf K.J., et al. Elevated 3,5-diiodothyronine concentrations in the sera of patients with nonthyroidal illnesses and brain tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. (1997).

96. Wang D, Stapleton HM. Analysis of thyroid hormones in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 397:1831–9 (2010).
97. Lorenzini L., Nguyen N.M., Sacripanti G., Serni E., Borsò M., Saponaro F., Cecchi E., Simoncini T., Ghelardoni S., Zucchi R., Saba A. Assay of Endogenous 3,5-diiodo-L-thyronine (3,5-T(2)) and 3,3'-diiodo-L-thyronine (3,3'-T(2)) in Human Serum: A Feasibility Study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 10,88 (2019).
98. Moreno M, Silvestri E, Lombardi A, Visser TJ, Goglia F, Lanni A. Identification of 3,5-diiodo-L-thyronine-binding proteins in rat liver cytosol by photoaffinitylabeling. *Endocrinology* 144,2297–303 (2003).
99. Cheng S.Y., Leonard J.L., Davis P.J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 31(2),139-70 (2010).
100. Leeson P.D., Ellis D., Emmett J.C., Shah V.P., Showell G.A., Underwood A.H. Thyroid hormone analogues. Synthesis of 3'-substituted 3,5-diiodo-L-thyronines and quantitative structure-activity studies of in vitro and in vivo thyromimetic activities in rat liver and heart. *J Med Chem.* 31(1), 37-54 (1988).
101. Ball S.G., Sokolov J., Chin W.W. 3,5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *J MolEndocrinol.* 19,137–47 (1997).
102. Mendoza A., Navarrete-Ramírez P., Hernández-Puga G., Villalobos P., Holzer G., Renaud J.P., Laudet V., Orozco A. 3,5-T2 is an alternative ligand for the thyroidhormone receptor β 1. *Endocrinology.* 154(8),2948-58b(2013).
103. Navarrete-Ramirez P., Luna M., Valverde R.C., Orozco A. 3,5-diiodothyronine stimulates tilapia growth through an alternate isoform of thyroid hormone receptor beta1. *J MolEndocrinol.* 52,1–9 (2014).
104. Orozco A., Navarrete-Ramírez P., Olvera A., García-G C. 3,5-Diiodothyronine (T2) is on a role. A new hormone in search of recognition. *Gen Comp Endocrinol.* 203,174-80 (2014).
105. Wrutniak-Cabello C., Casas F., Cabello G. The direct tri-iodothyronine mitochondrial pathway: science or mythology? *Thyroid.* 10(11),965-9 (2000).
106. Jezek P, Jezek J. Sequence anatomy of mitochondrial anion carriers. *FEBS Lett.*;534(1-3):15-25 (2003).

107. Klingenberg M. Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *J Bioenergbiomembr.* 31(5), 419-30 (1999).
108. Cannon B, Nedergaard J. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem.*;20:110-64 (1985).
109. Nicholls D.G., Brown adipose tissue mitochondria, *Biochim. Biophys.Acta* 549 1-29 (1979).
110. Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D. The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int J Biochem.*;23(9):791-801 (1991).
111. Azzu V, Brand MD. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci.* May; 35(5):298-307(2010).
112. Boss O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., et al..Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.*408, 39–42 (1997).
113. Fleury C., Neverova M., Collins S., Raimbault S., Champigny O., Levi-Meyrueis C., et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* 15, 269–272 (1997).
114. Sanchis D., Fleury C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., et al. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 34611–34615 (1998).
115. Mao W., Yu X. X., Zhong A., Li W., Brush J., Sherwood S. W., et al.. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett.* 443, 326–330 (1999).
116. Haguenaer A., Raimbault S., Masscheleyn S., Gonzalez-Barroso M del M., Criscuolo F., Plamondon J., et alA new renal mitochondrial carrier, KMCP1, is up-regulated during tubular cell regeneration and induction of antioxidant enzymes. *J. Biol. Chem.* 280, 22036–22043 (2005).
117. Boss O., Hagen T., Lowell B.B. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes.* 49(2),143-56 (2000).
118. Busiello R.A., Savarese S., Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol.*10,6:36 (2015).

119. Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trezeguet, V., Lauquin G. J., and Brandolin G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426, 39–44 (2003).
120. Pohl E.E., Rupprecht A., Macher G. and Hilse K.E. Important Trends in UCP3 Investigation. *Front. Physiol.* 10,470 (2019).
- 121 Solanes G., Vidal-Puig A., Grujic D., Flier J. S., and Lowell B. B. The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal localization, and genetic basis for short and long form transcripts. *J. Biol. Chem.* 272, 25433–25436 (1997).
122. Rousset S., Mozo J., Dujardin, G., Emre, Y., Masscheleyn, S., Ricquier D., et al. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett.* 581, 479–482 (2007).
123. Puigserver, P., Herron, D., Gianotti, M., Palou, A., Cannon, B., and Nedergaard J. Induction and degradation of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes in vitro and in vivo. Evidence for a rapidly degradable pool. *Biochem. J.* 284(Pt 2), 393–398 (1992).
124. Cioffi F., Senese R., de Lange P., Goglia F., Lanni A., Lombardi A. Uncoupling proteins: a complex journey to function discovery. *Biofactors.* 35(5),417-28 (2009).
125. Macher G., Koehler, M., Rupprecht, A., Kreiter, J., Hinterdorfer, P., and Pohl E. E. Inhibition of mitochondrial UCP1 and UCP3 by purine nucleotides and phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 664–672 (2018).
126. Gong, D. W., Monemdjou, S., Gavrilova, O., Leon, L. R., Marcus-Samuels, B., Chou C. J., et al. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem.* 275, 16251–16257 (2000).
127. Vidal-Puig, A. J., Grujic, D., Zhang, C. Y., Hagen, T., Boss, O., Ido Y., et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 16258–16266 (2000).
128. Riley, C. L., Dao, C., Kenaston, M. A., Muto, L., Kohno, S., Nowinski S. M., et al. The complementary and divergent roles of uncoupling proteins 1 and 3 in thermoregulation. *J. Physiol.* 594, 7455–7464 (2016).

129. Brand M. D., Esteves T. C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2, 85-93 (2005).
130. Lombardi, A., Busiello, R. A., Napolitano, L., Cioffi, F., Moreno, M., de Lange, P., et al. UCP3 Translocates lipid hydroperoxide and mediates lipid hydroperoxide-dependent mitochondrial uncoupling. *J. Biol. Chem.* 285, 16599–16605 (2010).
131. Ricquier, D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: a personal contribution and a historical perspective. *Biochimie* 134,3–8 (2017).
132. Urbankova E., Voltchenko A., Pohl P., Jezek P., and Pohl E. E. Transport kinetics of uncoupling proteins. Analysis of UCP1 reconstituted in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 278, 32497–32500 (2003).
133. Klingenberg M. UCP1 – A sophisticated energy valve. *Biochimie* 134, 19–27 (2017).
134. Cadenas, S., Echtay, K. S., Harper, J. A., Jekabsons, M. B., Buckingham, J. A., Grau, E., et al. The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem.* 277, 2773–2778 (2002).
135. Zackova, M., Skobisova, E., Urbankova, E., and Jezek, P. Activating omega-6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J. Biol. Chem.* 278, 20761–20769 (2003).
136. Beck, V., Jaburek, M., Demina, T., Rupprecht, A., Porter, R. K., Jezek P., et al. Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *FASEB J.* 21, 1137–1144 (2007).
137. Echtay K. S., Liu, Q., Caskey, T., Winkler, E., Frischmuth, K., Bienengraber M., et al. Regulation of UCP3 by nucleotides is different from regulation of UCP1. *FEBS Lett.* 450, 8–12 (1999).
138. Cannon B., and Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359 (2004).
139. Bargut T. C., Aguila M. B., and Mandarim-de-Lacerda C. A. Brown adipose tissue: updates in cellular and molecular biology. *Tissue Cell* 48, 452–460 (2016).

140. Egan, B., and Zierath J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* 17, 162–184 (2013).
141. Cortright R. N., Zheng D., Jones J. P., Fluckey J. D., DiCarlo S. E., Grujic D., et al. Regulation of skeletal muscle UCP-2 and UCP-3 gene expression by exercise and denervation. *Am. J. Physiol.* 276, E217–E221 (1999).
142. Zhou M., Lin B. Z., Coughlin S., Vallega G., and Pilch P. F. UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E622–E629 (2000).
143. Matsuda J., Hosoda K., Itoh H., Son C., Doi K., Tanaka T., et al. Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: their gene expression in rats fed high-fat diet. *FEBS Lett.* 418, 200–204 (1997).
144. Millet L., Vidal H., Andreelli F., Larrouy D., Riou J. P., Ricquier D., et al. Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J. Clin. Invest.* 100, 2665–2670 (1997).
145. Cadenas S., Buckingham J. A., Samec S., Seydoux J., Din N., and Dulloo A. G. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett.* 462, 257–260 (1999).
146. Senese R., Valli V., Moreno M., Lombardi A., Busiello R. A., Cioffi F. Uncoupling protein 3 expression levels influence insulin sensitivity, fatty acid oxidation, and related signaling pathways. *Pflugers Arch.* 461, 153–164 (2011).
147. Costford S. R., Chaudhry S. N., Crawford S. A., Salkhordeh M., Harper M. E. Long-term high-fat feeding induces greater fat storage in mice lacking UCP3. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1018–E1024 (2008).
148. Nabben M., Hoeks J., Moonen-Kornip, E., van B. D., Briede J. J., Hesselink M. K., et al. Significance of uncoupling protein 3 in mitochondrial function upon mid- and long-term dietary high-fat exposure. *FEBS Lett.* 585,4010–4017 (2011a).
149. Hilse K.E., Rupprecht A.; Egerbacher M.; Bardakji S.; Zimmermann L.; Wulczyn A.E.M.S., Pohl E.E. The Expression of Uncoupling Protein 3 Coincides with the Fatty Acid Oxidation Type of Metabolism in Adult Murine Heart. *Front. Physiol.* 9, 747 (2018).
150. McBride S., Wei-LaPierre L., McMurray F., MacFarlane M., Qiu X., Patten D.A., Dirksen R.T., Harper M.E. Skeletal muscle mitoflashes, pH, and

the role of uncoupling protein-3. *Arch. Biochem. Biophys.* 663, 239–248 (2019).

151. Brand M. D., Affourtit C., Esteves T. C., Green K., Lambert A. J., Miwa S., et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 755–767 (2004).

152. Mailloux R. J., and Harper M. E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1106–1115 (2011).

153. Jezek P., Holendova B., Garlid K. D., and Jaburek M. Mitochondrial uncoupling proteins: subtle regulators of cellular redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 29, 667–714 (2018).

154. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416(1),15-8 (1997).

155. Chouchani E. T., Kazak L., and Spiegelman B. M. Mitochondrial reactive oxygen species and adipose tissue thermogenesis: bridging physiology and mechanisms. *J. Biol. Chem.* 292, 16810–16816 (2017).

156. Goglia F., Skulachev VP. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J.* 17(12),1585-91 (2003).

157. Costford S. R., Chaudhry S. N., Salkhordeh M., and Harper M. E. Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E1304–E1312 (2006).

158. Son C., Hosoda K., Ishihara K., Bevilacqua L., Masuzaki H., Fushiki T., et al. Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. *Diabetologia* 47, 47–54 (2004).

159. Fink B. D., Herlein J. A., Almind K., Cinti S., Kahn C. R., and Sivitz W. I. Mitochondrial proton-leak in obesity resistant and obesity-prone mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1773–R1780 (2007).

160. Aguer C., Fiehn O., Seifert E. L., Bézaire V., Meissen J. K., Daniels A., et al. Muscle uncoupling protein 3 overexpression mimics endurance training and

reduces circulating biomarkers of incomplete β -oxidation. *FASEB J.* 27, 4213–4225 (2013).

161. Fischer A.W., Cannon B., Nedergaard J. Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: An experimental study. *MolMetab.* 7,161–170 (2018).

162. Choi C. S., Fillmore J. J., Kim, J. K., Liu Z. X., Kim S., Collier E. F., et al. Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 117, 1995–2003 (2007).

163. Schrauwen P., Hesselink M. K. C., Blaak E. E., Borghouts L. B., Schaart G., Saris W. H., et al. Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50, 2870–2873 (2001).

164. Schrauwen P., and Hesselink M. K. C. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 1412–1417 (2004a).

165. Jia J. J., Zhang X., Ge C. R., and Jois M. The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Obes. Rev.* 10, 519–526 (2009).

166. Musa C.V., Mancini A., Alfieri A., Labruna G., Valerio G., Franzese A., et al. Four novel UCP3 gene variants associated with childhood obesity: effect on fatty acid oxidation and on prevention of triglyceride storage. *Int.J.Obes.* 36, 207–217 (2012).

167. Schrauwen P., Xia J., Walder K., Snitker S., and Ravussin E. A novel polymorphism in the proximal UCP3 promoter region: effect on skeletal muscle UCP3 mRNA expression and obesity in male non-diabetic Pima Indians. *Int.J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23, 1242–1245 (1999).

168. Meirhaeghe A., Amouyel P., Helbecque N., Cottel D., Otabe S., Froguel P., et al. An uncoupling protein 3 gene polymorphism associated with a lower risk of developing Type II diabetes and with atherogenic lipid profile in a French cohort. *Diabetologia* 43, 1424–1428 (2000).

169. Herrmann S.M., Wang J.G., Staessen J.A., Kertmen E., and Schmidt-Petersen K., Zidek, W., et al. Uncoupling protein 1 and 3 polymorphisms are associated with waist to hip ratio. *J. Mol. Med.* 81, 327–332 (2003).

170. Liu Y.J., Liu P.Y., Long J., Lu Y., Elz L., Recker R.R., et al. Linkage and association analyses of the UCP3 gene with obesity phenotypes in Caucasian families. *Physiol.Genomics* 22, 197–203 (2005).

171. de Almeida Brondani L., deSouza B.M., Assmann T.S., Bouças A.P., Bauer A. C., Canani L.H., et al .Association of the UCP polymorphisms with susceptibility to obesity: case-control study and meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* 41, 5053–5067 (2014).
172. Lapice E., Monticelli A., Cocozza S., Pinelli M., Giacco A., and Rivellesse A.A., et al. The energy intake modulates the association of the -55CT polymorphism of UCP3 with body weight in type 2 diabetic patients. *Int. J. Obes. (Lond).* 38, 873–877 (2014).
173. Argyropoulos G., Brown A.M., Willi S.M., Zhu J., He Y., Reitman M., et al. Effects of mutations in the human uncoupling protein 3 gene on the respiratory quotient and fat oxidation in severe obesity and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 102, 1345–1351 (1998).
174. Adams, S.H., Hoppel, C.L., Lok, K.H., Zhao, L., Wong, S.W., Minkler, P.E., et al. Plasma acyl carnitine profiles suggest complete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. *J. Nutr.* 139, 1073–1081 (2009).
175. Sinha RA, Singh BK, Zhou J, Wu Y, Farah BL, Ohba K, Lesmana R, Gooding J, Bay BH, Yen PM: Thyroid hormone induction of mitochondrial activity is coupled to mitophagy via ROS-AMPK-ULK1 signaling. *Autophagy* 2015;11:1341-57.
176. Moreno M., Lanni A., Lombardi A., Goglia F. How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *J Physiol.* Dec 1;505 (Pt 2),529-38.(1997)
177. Reitman M.L. Of mice and men - environmental temperature, body temperature, and treatment of obesity. *FEBS Lett.* 592(12):2098-2107 (2018).
178. Golozoubova V., Cannon B., Nedergaard J. UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am J PhysiolEndocrinolMetab.* (2), E350-7 (2006).
179. Feldmann H.M., Golozoubova V., Cannon B., Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermo-neutrality. *Cell Metab* 9, 203-209 (2009)
180. Chouchani E.T., Kazak L., Spiegelman B.M. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* 29(1),27-37 (2019).

181. Nabben M., van Bree B.W.J., Lenaers E., Hoeks J., Hesselink M.K.C., Schaart G., Gijbels M.J.J., Glatz J.F.C., da Silva G.J.J., de Windt L.J., Tian R., Mike E., Skapura D.G., Wehrens X.H.T., Schrauwen P. Lack of UCP3 does not affect skeletal muscle mitochondrial function under lipid-challenged conditions, but leads to sudden cardiac death. *Basic Res Cardiol.* 109(6),447 (2014).
182. Costford S.R., Seifert E.L., Bézaire V.F., Gerrits M., Bevilacqua L., Gowing A., Harper M.E. The energetic implications of uncoupling protein-3 in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 32(5),884-94 (2007).
183. Perrino C., Schiattarella G.G., Sannino A., et al. Genetic deletion of uncoupling protein 3 exaggerates apoptotic cell death in the ischemic heart leading to heart failure. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(3):e000086 (2013)
184. Edwards K.S., Ashraf S., Lomax T.M., et al. Uncoupling protein 3 deficiency impairs myocardial fatty acid oxidation and contractile recovery following ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol.*;113(6),47 (2018).
185. Brand M.D.: The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1018:128-33 (1990).
186. Brown G.C., Brand M.D.: Thermodynamic control of electron flux through mitochondrial cytochrome bcl complex. *Biochem J* 1985;225:399–405.
187. Schagger H: Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods Enzymol.* 260:190–202 (1995).
188. Lombardi A., Silvestri E., Cioffi F., Senese R., Lanni A., Goglia F., de Lange P., Moreno M: Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach. *J Proteomics.* 72:708-721 (2009).
189. Zerbetto E., Vergani L., Dabbeni-Sala F.: Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 18,2059– 2064 (1997).
190. Lusk, G. Animal calorimetry: Analysis of the oxidation of mixtures of carbohydrates and fat. *J. Biol. Chem.* 59, 41–42 (1926).
191. Zanotti A., Azzone G.F.. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 201(1):255-65 (1980).

192. Schagger H., Cramer W.A., von Jagow G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem.* 217(2):220-30 (1994).
193. Arioli S, Roncada P, Salzano A. M., Deriu F., Corona S, Guglielmetti S, Bonizzi L., Scaloni A., Mora D. The relevance of carbon dioxide metabolism in *Streptococcus thermophiles*. *Microbiology* 155,1953-1965 (2009).
194. Salzano AM, Novi G, Arioli S, Corona S, Mora D, Scaloni A. Mono-dimensional blue native-PAGE and bi-dimensional blue native/urea-PAGE or/SDS-PAGE combined with nLC-ESI-LIT-MS/MS unveil membrane protein heteromeric and homomeric complexes in *Streptococcus thermophiles* *J Proteomics* 94,240-261 (2013).
195. Castillo M., Hall J.A., Correa-Medina M., Ueta C., Kang H.W., Cohen D.E., Bianco A.C. Disruption of thyroid hormone activation in type 2 deiodinase knockout mice causes obesity with glucose intolerance and liver steatosis only at thermoneutrality. *Diabetes.* 60(4):1082-9 (2011).
196. Lanni A., Moreno M., Cioffi M., Goglia F.: Effect of 3,3'-di-iodothyronine and 3,5-di-iodothyronine on rat liver mitochondria. *J Endocrinol.* 136(1):59-64 (1993).
197. Venditti P., De Rosa R., Di Meo S.: Effect of thyroid state on H₂O₂ production by rat liver mitochondria. *Mol Cell Endocrinol.* 205:185-192 (2003).
198. Hafner R.P., Nobes C.D., McGown A.D., Brand M.D.: Altered relationship between protonmotive force and respiration rate in non-phosphorylating liver mitochondria isolated from rats of different thyroid hormone status. *Eur J Biochem.* 178:511–518 (1998).
199. Brand M.D., Steverding D., Kadenbach B., Stevenson P.M., Hafner R.P.: The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *Eur J Biochem* 1206,775-781 (1992).
200. Dawson AG: Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.* 8,171-176 (1979).
201. Schönke, M.; Massart, J.; Zierath, J.R. Effects of high-fat diet and AMP-activated protein kinase modulation on the regulation of whole-body lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 59, 1276–1282 (2018).

202. Hilse K.E., Kalinovich A.V., Rupprecht A., Smorodchenko A., Zeitz U., Staniek K., Erben R.G., Pohl E.E. The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue. *BiochimBiophys Acta*. 1857(1),72-78 (2016).
203. Cheng C.F., Ku H.C., Lin H. PGC-1 α as a Pivotal Factor in Lipid and Metabolic Regulation. *Int J Mol Sci*. 2,19 (11) (2018).
204. Garrib A., McMurray W.C. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (flavin-linked) from rat liver mitochondria. *J Biol Chem*. 261(17),8042-8 (1986).
205. Rauchová H, Drahotka Z, Rauch P, Fato R, Lenaz G. Coenzyme Q releases the inhibitory effect of free fatty acids on mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Acta Biochim Pol*. 50(2),405-13 (2003).
206. Bukowiecki L.J., Lindberg O. Control of sn-glycerol 3-phosphate oxidation in brown adipose tissue mitochondria by calcium and acyl-CoA. *BiochimBiophys Acta* 348,115–125 (1974).
207. Lenaz G., Genova M.L. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol*.748,107-44 (2012).
208. Miwa S., Brand M.D. The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *BiochimBiophys Acta*.1709(3),214-9 (2005).
209. Vrbacký M, Drahotka Z, Mráček T, Vojtísková A, Jesina P, Stopka P, Houstek J. Respiratory chain components involved in the glycerophosphate dehydrogenase-dependent ROS production by brown adipose tissue mitochondria. *BiochimBiophys Acta*. 1767(7).989-97 (2007).
210. Orr A.L., Quinlan C.L., Perevoshchikova I.V., Brand M.D. A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Author information J Biol Chem*. 287(51),42921-35 (2012).
211. Friedman JR, Mourier, A, Yamada, J, McCaffery, JM, Nunnari, J. MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish inner mitochondrial membrane architecture. *eLife*.4 (2015).

212. Quintana-Cabrera R., Mehrotra A., Rigoni G., Soriano M.E. Who and how in the regulation of mitochondrial cristae shape and function. *Biochem Biophys Res Commun.* 500(1),94-101 (2018).
213. Trayhurn P., Wood I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 92,347-5 (2004).
214. Koumenis C., Naczki C., Koritzinsky M., Rastani S., Diehl A., Sonenberg N., Coromilas A. Wouters B.G. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol.* 22(21),7405-7416 (2002).
215. Deng J., Liu S., Zou L., Xu C., Geng B., Xu G. Lipolysis response to endoplasmic reticulum stress in adipose cells. *J Biol Chem.* 287(9),6240-9 (2012).
- 216 Greenberg A.S., Coleman R.A., Kraemer F.B., McManaman J.L., Obin M.S, Puri V., et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J Clin Invest* 121: 2102-2110 (2011).
217. Girisusse A. and Langin D. Adipocyte lipases and lipid droplet-associated proteins: insight from transgenic mouse models. *International Journal of Obesity* 36, 581–594 (2012).
218. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32 (1994).
219. Doultzinos D., Avril T., Lhomond S., Dejeans N., Guédât P., Chevet E. Control of the Unfolded Protein Response in Health and Disease. *SLAS Discov.* 22(7),787-800 (2017).

