

INDICE

INTRODUZIONE	2
Gli ormoni tiroidei	2
CAPITOLO 1	
Regolazione dell'attività della tiroide	4
Metabolismo periferico delle iodotironine	6
Siti di legame per gli ormoni tiroidei	10
Meccanismi molecolari dell'azione dell'ormone tiroideo a livello nucleare	21
Geni della catena respiratoria codificati nel nucleo	25
Meccanismi non trascrizionali	27
Meccanismi molecolari della T3 a livello mitocondriale	27
Gli ormoni tiroidei e l'efficienza della fosforilazione ossidativa	30
Ormoni tiroidei e proteine che mediano il disaccoppiamento	32
CAPITOLO 2	
Ruolo della T2 nel controllo del metabolismo energetico	34
Bersagli cellulari della T2	38
Importanza della T2 nel ridurre l'adiposità nei ratti	41
SCOPO DELLA TESI	44
PARTE TEORICA	48
PARTE SPERIMENTALE	56
RISULTATI	65
DISCUSSIONE	88
BIBLIOGRAFIA	95

INTRODUZIONE

Ormoni tiroidei

La tiroide è una ghiandola endocrina presente in tutti i vertebrati, ma particolarmente sviluppata ed attiva nei mammiferi. Questa ghiandola si sviluppa dall'endoderma associato alla tasca faringea e successivamente discende nella regione anteriore del collo collocandosi ai due lati della trachea. La tiroide, insieme ad altre ghiandole quali l'ipotalamo e l'ipofisi, svolge un ruolo di estrema importanza nella regolazione di molte funzioni vitali.

La tiroide è capace di sintetizzare e di secernere gli ormoni tiroidei, coinvolti nella regolazione di fondamentali fenomeni biologici come il differenziamento cellulare, la termogenesi, lo sviluppo fisico e psichico ed il metabolismo energetico. L'influenza di questi ormoni su tali processi è sottolineata, in maniera specifica, dai vari stati patologici che si verificano in conseguenza a disturbi nel normale funzionamento ormonale (*Soboll, 1993; Pillar e Seitz, 1997; Goglia e coll, 1999*).

Le cellule che producono gli ormoni tiroidei sono di tipo epiteliale cubico, disposte a formare follicoli circolari. Gli ormoni sintetizzati vengono accumulati nel lume follicolare sotto forma di materiale colloidale (colloide). Ciascuna cellula è rivestita alla base da una membrana basale ed è connessa, tramite giunzioni serrate, alle cellule adiacenti.

Nella ghiandola, oltre alle cellule follicolari, sono presenti le cellule parafollicolari, denominate cellule C, che sintetizzano l'ormone polipeptidico calcitonina.

Per poter sintetizzare le iodotironine è necessario lo iodio. Le cellule follicolari captano lo iodio dal circolo ematico in forma di ioduro (I⁻). Esso viene trasportato attivamente all'interno della ghiandola contro

gradiente elettrochimico grazie alla presenza di un sistema di cotrasporto Na^+/I^- , localizzato nella porzione basale della membrana delle cellule epiteliali tiroidee. Tale processo viene definito intrappolamento dello iodio ed è stimolato dal TSH. Una volta che lo ione ioduro penetra nelle cellule, le attraversa e passa nel lume. Qui, viene prima ossidato dalle perossidasi tiroidee e poi incorporato nei residui amminoacidici di tirosina della tireoglobulina, una grossa glicoproteina che si ritrova nel lume del follicolo. La iodinazione nei residui di tirosina porta alla formazione di monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT). Dalla coniugazione di due molecole di DIT si genererà la tiroxina o T_4 , mentre dalla coniugazione di DIT e MIT si generano la 3,5',3'-triiodotironina o rT_3 e la 3,5,3'-triiodotironina o T_3 . L'immissione in circolo di T_4 e T_3 richiede l'idrolisi della tireoglobulina. La colloide viene, perciò, prelevata dal lume follicolare attraverso un processo di endocitosi effettuato dalle cellule epiteliali. Questa porzione del contenuto luminale appare sotto forma di goccioline di colloide all'interno del citoplasma. Queste goccioline si muovono verso la parte basale, si fondono con i lisosomi e si dirigono nella direzione apicale. L'azione delle proteasi lisosomiali consente la liberazione degli ormoni tiroidei che si immettono nella rete di capillari sanguigni. Le molecole di MIT e DIT, anch'esse liberate in seguito alla proteolisi della tireoglobulina, vengono deiodinate, ad opera di enzimi deiodinasi, all'interno della cellula follicolare in maniera tale da permettere il recupero dello iodio che viene successivamente riciclato nella sintesi delle iodotironine.

CAPITOLO 1

Regolazione dell'attività della tiroide

L'attività della tiroide, in termini di produzione e secrezione di ormoni, è principalmente sotto il controllo dell'ormone anteroipofisario tireostimolante TSH (Thyroid Stimulating Hormone). Questa funzione ipofisaria è a sua volta regolata dal TRH (Thyrotropin Releasing Hormone), un tripeptide prodotto dai neuroni ipotalamici, il quale, trasportato lungo gli assoni di tali neuroni arriva fino all'eminenza mediana, qui viene rilasciato nel circolo portale ipofisario attraverso il quale arriva all'ipofisi anteriore, dove, legandosi a specifici recettori presenti sulle membrane delle cellule tireotrope, stimola la sintesi ed il rilascio di TSH (*Gershengon 1986*). La tiroide è provvista di un peculiare sistema di autoregolazione che ha il principale scopo di mantenere il più possibile costante la secrezione ormonale. I livelli di ormone circolante infatti, mediante meccanismi di *feedback*, possono agire sia direttamente sulla ghiandola tiroidea, sia sull'ipofisi, dove risultano i principali inibitori della produzione di TSH, e sia sull'ipotalamo ove regolano la produzione di TRH (fig. 1).

L'ipotiroidismo induce un aumento della sintesi dell'm RNA per il TRH. Di conseguenza viene prodotto più TSH, ed infine, viene stimolata la funzione tiroidea. Al contrario, alti livelli serici di ormone tiroideo hanno un effetto inibitorio a livello ipotalamico e sopprimono completamente la risposta del TSH al TRH (*Larsen 1982*).

Nel plasma T4 e T3 circolano fundamentalmente legati a tre proteine: la globulina (TBG), la prealbumina (TBPA) e l'albumina. Nell'uomo esse trasportano rispettivamente il 75, il 15 ed il 10% della tiroxina plasmatica mentre i valori per le proteine che legano la T3 vanno dal 38-80% per TGB, al 9-27% per TBPA e 11-35% per l'albumina (*Robhins e*

Bartalme 1986; Hennemann e Docter 1990) La TBPA e l'albumina presentano bassa affinità per questi ormoni e quindi ne determinano un rilascio rapido. La globulina, al contrario, mostra elevata affinità per le iodotironine rilasciandole lentamente. Il ruolo di tali proteine potrebbe essere quello di immagazzinare gli ormoni e contribuire alla loro omeostasi nell'organismo (*Pardrige, 1987; Davis, 1970*). Una volta liberi, T4 e T3 possono agire sulle cellule bersaglio. Infatti, solo la frazione libera di tali ormoni, che risulta per entrambi molto bassa (0,2%), è responsabile dell'attività biologica.

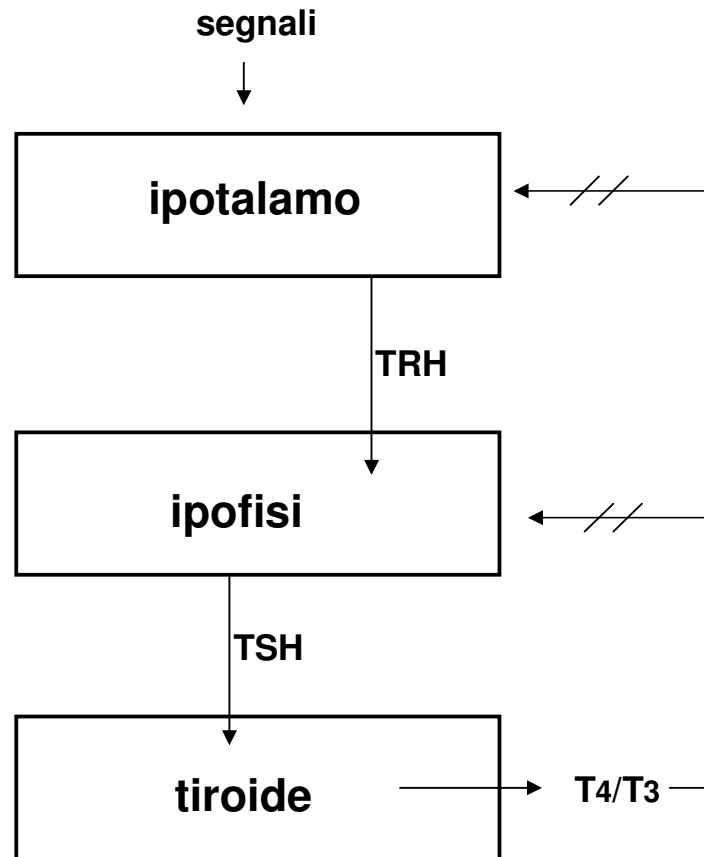


Fig. 1. Asse ipotalamo-ipofisi-tiroide e sua regolazione.
Gli ormoni tiroidei esercitano un'azione a feedback negativo sull'ipofisi e sull'ipotalamo inibendo la secrezione del TSH e TRH rispettivamente.

Metabolismo periferico delle iodotironine

Il prodotto principale della tiroide è la T₄ (90%). La tiroide produce anche T₃, l'ormone biologicamente attivo (10%). Tuttavia, la produzione tiroidea giornaliera di T₃ corrisponde al 20% della sua produzione totale, mentre il restante 80% deriva dalla deiodinazione periferica di T₄ a T₃ (*Visser, 1988*). Anche la T₃ revers, biologicamente inattiva, è prodotta dalla tiroide. La ghiandola ne produce però solo il 5% dell'ammontare giornaliero totale; la restante parte deriva dalla deiodinazione periferica di T₄ (*Kohrle e coll., 1991*). Nel siero, inoltre, sono presenti altre iodotironine: si tratta di tre diiodotironine (3,3'-T₂, 3,5-T₂ e 3',5'-T₂) e di due monoiodotironine (3'-T₁ e 3-T₁). Le principali vie del metabolismo intracellulare delle iodotironine sono:

- Rimozione dello iodio mediante deiodinazione enzimatica.
- Coniugazione del gruppo ossidrilico fenolico con acido glucuronico (reazione nota come glucuronidazione) o con solfato (reazione nota come solfatazione).
- Deaminazione ossidativa e decarbossilazione della catena laterale di alanina.

La deiodinazione è la principale via del metabolismo dell'ormone tiroideo in quanto è implicata nella regolazione dell'attività ormonale (fig. 2). Infatti la T₄ viene convertita nei tessuti periferici mediante deiodinazione dell'anello fenolico esterno (ORD) in T₃, l'ormone biologicamente attivo, o mediante deiodinazione dell'anello tirosilico interno (IRD) in rT₃. Sia T₃ che rT₃ vengono ulteriormente deiodinate e producono diiodotironine. In particolare, la rimozione di un atomo di iodio dall'anello esterno della rT₃ genera 3,3'-T₂ mentre la rimozione dell'anello interno genera 3',5'-T₂.

La deiodinazione dell'anello interno della T₃ genera 3,3'-T₂, quello dell'anello esterno la 3,5-T₂. La via di formazione della 3,5-T₂ a partire dal precursore T₃, al contrario della 3,3'-T₂, non è stata evidenziata in vitro ma solo in studi in vivo (*Moreno e coll. 2003*).

Gli enzimi responsabili delle deiodinazioni delle iodotironine sono stati individuati e clonati; essi sono: la iodotironina deiodinasi di tipo 1 (ID-I), la iodotironina deiodinasi di tipo 2 (ID-II) e la iodotironina deiodinasi di tipo 3 (ID-III).

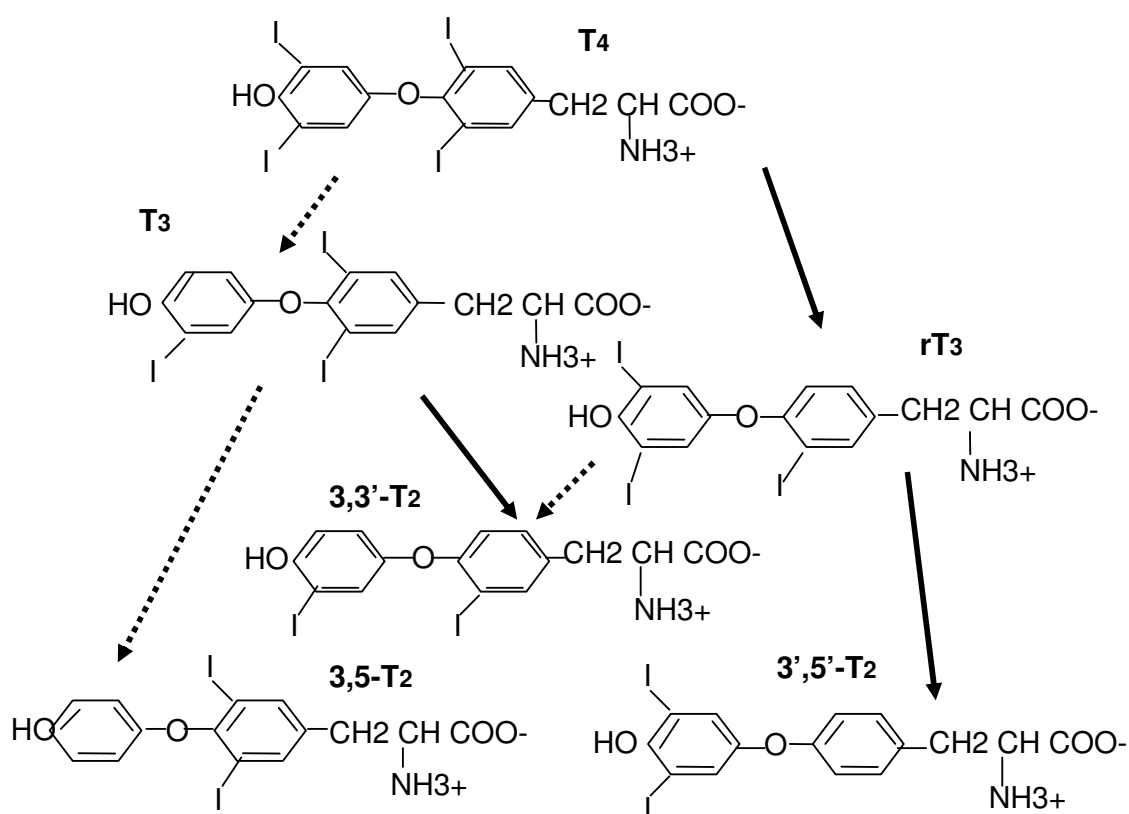


Fig. 2. Deiodinazione periferica delle iodotironine: produzione di T₃, rT₃, 3,3'-T₂, 3,5-T₂ e 3',5'-T₂ a partire da T₄ (le linee tratteggiate rappresentano la deiodinazione dell'anello esterno)

ID-I

La iodotironina deiodinasi di tipo I è presente nel fegato, nel rene e nella tiroide. In particolare, è localizzata nel reticolo endoplasmatico delle cellule epatiche e nella membrana plasmatica delle cellule renali e di quelle tiroidee (Visser, 1988). Questo enzima richiede tioli quali il ditiotritolo (DTT) come cofattori in vitro, e il glutatione quale cofattore in vivo (Visser, 1990). Agisce sia sull'anello interno che su quello esterno delle iodotironine e, sebbene esibisca una preferenza per la rT_3 quale substrato, è importante per la produzione periferica di T_3 dalla T_4 . L'attività della ID-I è inibita dai tiouracili, ad es. il propiltiouracile (PTU), e dall'acido Iopanoico (IOPA). La sua espressione è regolata dall'ormone tiroideo, infatti, è ridotta in caso di ipotiroidismo ed è, invece, incrementata durante l'ipertiroidismo.

ID-II

La iodotironina deiodinasi di tipo II è presente soprattutto a livello del cervello, dell'ipofisi, del tessuto adiposo bruno (TAB) e della placenta. Nell'uomo si ritrova anche nella tiroide, nel cuore e nel muscolo scheletrico (Visser e coll., 1982). Questo enzima ha esclusivamente attività deiodinasi dell'anello esterno ed è quindi, importante per la produzione intracellulare della T_3 in questi tessuti (Leonard, 1990); la ID-II, inoltre, mantiene un livello costante di T_3 nel sistema nervoso centrale ed in caso di ipotiroidismo, la produzione dell'ormone, attraverso la conversione di T_4 mediante ID-II, può diventare una fonte importante di ormone circolante. L'attività enzimatica delle ID-II è alta nell'ipotiroidismo e bassa nell'ipertiroidismo. ID-II è insensibile al PTU, ma è inibita dall'acido iopanoico sia in vivo che in vitro (St. Germani, 1988).

ID-III

La iodotironina deiodinasi di tipo III è presente nel cervello, nella pelle, nella placenta e in alcuni tessuti fetali (*Kaplan e Yaskosky, 1980; Leonard e Larsen, 1985; Leonard e Visser, 1986*); ha soltanto attività deiodinasi dell'anello interno e permette, quindi, la produzione della rT3 a partire dalla T4. La sua attività è inibita dallo IOPA ed è insensibile al PTU.

Oltre che per deiodinazione, le iodotironine sono metabolizzate anche per solfatazione e glucuronidazione del gruppo ossidrilico fenolico (coniugazione) e mediante deaminazione ossidativa della catena laterale di alanina. Quest'ultima reazione converte T4 in acido tetraiodotiroacetico (TETRAC) e T3 in acido triiodotiroacetico (TRAC) (*Tomita e Lardy 1960*). TETRAC e TRAC si legano molto più avidamente di T4 e T3 alle proteine plasmatiche. ma sia nel ratto che nell'uomo la loro emivita è più breve di quelle delle corrispondenti iodotironine (*Andrea e coll. 1980*). Ciò spiega la bassa bioattività in vivo di TRAC sebbene i recettori nucleari, in particolare quelli di tipo β , mostrino una affinità maggiore per TRAC che per la T3.

La coniugazione del gruppo ossidrilico fenolico è una reazione che incrementa la solubilità dell'acqua delle iodotironine facilitandone, in questo modo, l'escrezione biliare e urinaria (*Dutton 1980*). Tuttavia, mentre le iodotironine glucuronidate sono escrete rapidamente nella bile, solo basse concentrazioni di iodotironine solfatate sono presenti nella bile e nel siero poiché esse vengono deiodinate rapidamente nel fegato. In particolare, la deiodinazione dell'anello interno di T₄S, T₃S e TA₃S è molto più rapida di quella delle relative molecole non solfatate suggerendo che la coniugazione con solfato è una tappa primaria per l'inattivazione dell'ormone tiroideo (*Rutgers e coll. 1987*).

Le iodotironine glucuronidate secrete nella bile vengono deconiugate nell'intestino ad opera delle β -glucuronidasi batteriche e parte delle iodotironine liberate vengono riassorbite. In questo modo si viene a costituire un circolo enteroepatico che rende il lume intestinale una fonte di rilascio di ormone tiroideo (*De Herder e coll 1986*).

Siti di legame per gli ormoni tiroidei

Siti di legame specifici per gli ormoni tiroidei sono presenti:

1. sulla membrana plasmatica
2. nel citosol
3. nel nucleo
4. sul mitocondrio

Siti di legame presenti sulla membrana plasmatica.

A livello della membrana plasmatica di differenti tipi cellulari sono state caratterizzate delle proteine di legame per l'ormone tiroideo con massa molecolare che varia da 37 a 70 KDa (*Garbi-Chini e Torresani 1981*). La presenza di tali siti è stata associata all'up-take di ormone all'interno della cellula che è un processo dipendente dalla disponibilità energetica, sensibile alla temperatura, agli inibitori della respirazione e al dinitrofenolo. Inoltre, il trasporto, dipendente dalla presenza di sodio e sensibile all'ouabaina, sembra essere mediato da una glicoproteina.

A causa della somiglianza degli ormoni tiroidei agli amminoacidi si è ipotizzato che essi potessero essere trasportati dallo stesso carrier. Negli eritrociti di ratto il legame della T_3 con la membrane plasmatica ed il suo successivi up-take sembra essere mediato dal sistema "T" di trasporto per il triptofano (*Samson e coll. 1992*). Nel fegato è stato evidenziato un trasporto specifico per entrambi gli ormoni tiroidei (*Krenning e coll. 1981*) coinvolgente una proteina di circa 52 KDa (*Mol e coll. 1986*).

Nel 2003, *Friesema* e collaboratori hanno clonato il gene MCT8 di ratto per valutare la sua funzione di trasportatore dell'ormone tiroideo in oociti di *Xenopus Laevis*. MCT8 appartiene alla famiglia dei trasportatori monocarbossilati, è localizzato sul cromosoma X ed è altamente espresso in fegato e cervello ma si trova largamente distribuito anche in altri tessuti. Tale ampia distribuzione si adatta bene con la sua funzione di trasportatore dell'ormone tiroideo poiché tale ormone è essenziale per la regolazione, lo sviluppo e i processi metabolici di molti tessuti. L'alta espressione di MCT8 in fegato e cervello, inoltre, è importante per la regolazione della conversione di T_4 a T_3 operata dagli enzimi deiodinasi IDI e IDII espressi rispettivamente nei suddetti tessuti. Gli studi di *Friesema* e collaboratori hanno dimostrato che MCT8 è capace di trasportare T_4 e T_3 con una K_m simile e che tale trasporto è Na^+ -indipendente.

Nell'ultimo decennio sono stati individuati una serie di effetti attribuibili agli ormoni tiroidei che risultano essere indipendenti dall'entrata degli ormoni all'interno della cellula. Di tali effetti sembra essere responsabile T_4 . Infatti, *Davis e collaboratori* (2003) hanno individuato diversi azioni, di cui è responsabile T_4 , che hanno inizio a livello della membrana plasmatica e supportano il suo ruolo come ormone e non solo come proormone. Il recettore presente sulla membrana plasmatica responsabile dell'attivazione di MAPK, mediata da T_4 , è un'integrina, $\alpha V\beta 3$. L'affinità di questo recettore risulta più alta per T_4 che per T_3 . Grazie a questo recettore T_4 può, inoltre, influenzare l'ingresso di proteine all'interno della cellula e modulare l'attività di canali e pompe ioniche.

Siti di legame citosolici.

Proteine citosoliche che legano l'ormone tiroideo sono state evidenziate in molti tessuti di diverse specie animali. Si caratterizzano tutte per avere un'affinità di legame per T_3 più bassa rispetto a quella dei recettori nucleari e l'ipotesi corrente è che esse fungano essenzialmente da riserva intracellulare di ormone (*Ichihawa e Hashizume, 1995*).

I meccanismi fisiologici che sottendono l'interazione di T_3 con le diverse proteine citosoliche (CTBP) fin ora individuate e caratterizzate hanno suggerito un coinvolgimento di tali proteine nella regolazione dei livelli intracellulari e/o nel trasporto subcellulare dell'ormone.

E' generalmente accettato che i principali effetti dell'ormone tiroideo siano innescati dalla sua interazione con i recettori nucleari. Tuttavia, non è ancora chiaro come l'ormone entri nel nucleo e quale sia il meccanismo responsabile del controllo della dinamica del trasferimento dell'ormone dal citoplasma al nucleo. Studi di cinetica hanno rivelato che proteine con caratteristiche di legame e meccanismi regolatori differenti potrebbero essere coinvolte in questa traslocazione.

Nel 1986, *Hashizume e coll.* hanno riportato che il trattamento di citoplasma di rene di ratto con charcoal abolisce l'attività di legame dell'ormone, mentre l'aggiunta di NADPH lo ripristina. La proteina NADPH-dipendente coinvolta mostra un legame specifico per i mitocondri e, in vitro, inibisce il legame con il nucleo, suggerendo un suo coinvolgimento nel trasporto di T_3 al mitocondrio e non al nucleo. La stessa proteina è, inoltre, attivata da NADP in presenza di DTT e in questa forma, in vitro, lega il nucleo. Questi dati hanno indotto a considerare la possibilità che il rapporto delle quantità cellulari NADPH/NADP possa controllare il destino funzionale del complesso T_3 -CTBP. La proteina legante T_3 NADPH-dipendente, purificata dal rene di ratto, ha una massa molecolare di 58 KDa, un coefficiente di

sedimentazione di 4,7 S ed un raggio di Stokes di 32,5 Å. Tale proteina lega T₃ con una costante di affinità di 2,4 · 10⁹ M⁻¹ ed una capacità massima di legame di 16.400 pmol T₃/mg proteine, indicando la presenza di un singolo sito di legame.

Lennon (1992) ha identificato, purificato e caratterizzato da cervello di ratto una proteina legante T₃ con caratteristiche di legame e massa molecolare simili alla proteina di Hashizume.

E' stata recentemente purificata da fegato di ratto una proteina con massa molecolare di 76 KDa e costante di affinità per T₃ pari a 10⁹ M⁻¹. Ciascuna unità di 76 KDa lega due molecole di T₃. Il legame è NADPH-dipendente e diversamente da quanto accade per la proteina di 58 KDa non è attivato da NADP e DTT. La proteina inoltre mostra una diversa specificità per gli analoghi della T₃.

Kato e coll. (1989) hanno identificato in cellule umane una proteina citosolica legante T₃ con massa molecolare di 58 KDa. La proteina è una subunità dell'enzima piruvato chinasi sottotipo M2. L'enzima completo in forma di tetramero non ha alcuna attività di legame per la T₃. La conversione di monomero a tetramero, e quindi l'attività di legame, è regolata da un intermedio della via glicolitica, il fruttosio 1,6-bisfosfato (*Ashizawa e coll. 1991*). E' stato riportato che questa proteina sia coinvolta nella regolazione della risposta trascrizionale mediata dai recettori nucleari della T₃, probabilmente intervenendo nel controllo delle quantità intracellulari di T₃ libera. Questa proteina sembra essere sostanzialmente diversa dalle CTBP NADPH-dipendenti.

Un'altra CTBP è stata identificata nel citosol di fegato di *Xenopus* (*Yamauchi e Tata, 1994*): si tratta di una proteina dalla massa molecolare di 59 KDa, in forma di monomero e della sequenza primaria omologa a quella dell'enzima aldeide deidrogenasi di mammifero. La sua attività di legame per la T₃ dipende dalla presenza di gruppi SH essendo invece

indipendente dai nucleotidi piridinici. Quest'ultima caratteristica la accomuna alla proteina di 58 KDa di cellule umane, anche essa associata ad un'attività enzimatica, e la differenzia dalle altre CTBP isolate da tessuti di ratto.

Un altro caso di proteina citosolica legante T_3 è stato riscontrato in cellule astrogliali di ratto in coltura (*Beslin e coll 1995*). La proteina identificata ha una massa molecolare di 65 KDa e contiene una subunità di 35 KDa cui è associata l'attività di legame con l'ormone. L'interazione è NADPH-dipendente e gli autori hanno dimostrato che l'ossidazione di NADPH non solo inibisce il legame con la T_3 ma promuove anche il rilascio dell'ormone legato suggerendo un ruolo importante per la CTBP-35 KDa nel sequestro e nel rilascio dell'ormone tiroideo in funzione dello stato ossidoriduttivo del compartimento cellulare astrogliale.

Vie e coll. (1996) hanno identificato in rene di uomo una proteina legante T_3 in presenza di NADPH, dalla massa molecolare di 38 KDa. La proteina nativa ha una massa di 50 KDa e la presenza di NADP non attiva il legame dell'ormone. La purificazione e la successiva sequenza hanno rivelato la presenza in questa proteina di regioni di omologia con due enzimi batterici: la lisina-ciclo-deaminasi e l'ornitina-ciclo-deaminasi (*Vie e coll. 1997*).

Recentemente *Moreno e collaboratori (2003)*, dall'analisi della frazione citosolica di fegato di ratto mediante marcatura per fotoaffinità e successiva elettroforesi su gel, hanno evidenziato la presenza di tre bande proteiche capaci di legare in modo specifico la 3,5- T_2 .

Il legame della diiodotironina con tali bande proteiche di circa 86, 66 e 36 KDa, è indipendente dalla presenza di NADPH, suggerendo che le proteine coinvolte non necessitano né di un attivatore allosterico, né di un cofattore coinvolto in una riduzione enzimatica attivante il legame. Le

stesse proteine, in presenza di NADPH, sono in grado di legare non solo la 3,5-T₂ ma anche la T₃.

Effettuando delle incubazioni in presenza di concentrazioni crescenti di NADPH si è cercato di chiarire il legame della T₃ NADPH-dipendente alle proteine di legame per la 3,5-T₂. esse hanno permesso di stimare le condizioni di stimolazione massimale e semimassimale del legame della T₃ che sono risultate corrispondere rispettivamente a concentrazioni di NADPH pari a 10⁻⁷ e 10⁻⁹ M.

Quanto detto suggerisce due ipotesi alternative, entrambe relativa alla presenza di NADPH. Secondo la prima ipotesi entrambe le iodotironine competono per lo stesso sito di legame. In base alla seconda, la T₃ può legarsi ad un sito differente da quello della 3,5-T₂ inducendo una modificazione conformazionale della proteina tale da impedire il legame della 3,5-T₂.

A tale proposito, sono stati effettuati esperimenti di fotoaffinità con [¹²⁵I]T₃ in presenza di NADPH. Poiché la marcatura è inibita sia dall'aggiunta di T₃ che da quella di 3,5-T₂ è stata confermata la prima ipotesi.

Da un punto di vista fisiologico, risultati ottenuti indicano che il legame delle iodotironine a componenti citoplasmatiche dipende dallo stato ossidoriduttivo della cellula, poiché il legame della 3,5-T₂ non è dipendente dal NADPH, contrariamente a quello della T₃.

Si potrebbe supporre che le proteine nel citosol siano sempre in grado di legare sia la T₃ che 3,5-T₂. Probabilmente altri fattori sono implicati *in vivo* nella discriminazione del legame delle due iodotironine alle proteine citoplasmatiche. Da studi effettuati *in vitro* risulta chiaro che se il rapporto NADPH/NADP è a favore del NADPH si ha traslocazione di T₃ al mitocondrio, invece si verifica traslocazione al nucleo se il rapporto è a favore del NADP ed è presente DTT nel mezzo di reazione.

Recettori nucleari per l'ormone tiroideo.

Gli effetti degli ormoni tiroidei a livello genomico sono mediati da recettori nucleari che legano la T₃ (TR). L'esistenza di recettori nucleari con alta affinità e specificità ma bassa capacità di legame è stata dimostrata da *Oppenheimer e collaboratori* (1974). Alcuni tessuti come l'ipofisi, il fegato, il rene, il cuore ed il cervello contengono in numero di recettori relativamente alto mentre altri tessuti, quali milza e testicoli, ne contengono una quantità di molto inferiore (*Oppenheimer e coll.* 1974).

Il numero di recettori nucleari per la T₃ non è costante potendo, in particolari condizioni fisiologiche, subire sensibili variazioni: nel fegato di ratti a digiuno, di ratti trattati con glucagone oppure in seguito ad epatoectomia parziale, il loro numero risulta ridotto (*De Groot e coll.* 1977; *Dillmann e coll.* 1978).

Il clonaggio del gene codificante per TR e l'analisi della sua sequenza hanno mostrato che esso è membro della superfamiglia dei geni dei recettori nucleari. Tali recettori possiedono tutti due domini conservati di 66 e 240 residui amminoacidici deputati rispettivamente al legame del DNA e all'interazione con l'ormone. E' presente una regione "cardine" che è coinvolta nella localizzazione del recettore nel nucleo. Il dominio N-terminale non è conservato e permette a ciascun recettore di interagire con altri regolatori della trascrizione. Il dominio di legame al DNA contiene motivi strutturali noti come "dita di zinco" la cui organizzazione è basata sulla sequenza consenso:

Cys-X2-Cys-X13-Cys-X2-Cys

E per questo indicati come dita di zinco Cys₂/Cys₂

La sequenza amminoacidica del dominio di legame al DNA di alcuni di tali recettori ha rivelato l'esistenza di due regioni zinc finger adiacenti, ciascuna delle quali contiene un atomo di zinco complessato, con

simmetria tetraedrica, ai gruppi tiolici dei quattro residui conservati di cisteina. Nella struttura tridimensionale, i due zinc finger sono intrecciati a formare un singolo dominio globulare, i cui unici elementi di struttura secondaria sono due α eliche, una per ciascun zinc finger. Nel più recente modello proposto per l'interazione di questa classe di recettori nucleari con il DNA, si ritiene che l' α elica del primo zinc finger funzioni incastrandosi nel solco maggiore del DNA, determinando la specificità di legame, mentre il secondo zinc finger sia responsabile della dimerizzazione .

La comparazione delle sequenze di TR clonato da una libreria di embrione di pollo e da placenta umana ha rivelato l'esistenza di due geni differenti ora noti come α e β , individuati nei genomi di tutte le specie di vertebrati fin ora esaminate. Nell'uomo questi geni sono localizzati rispettivamente sui cromosomi 7 e 3.

Il gene per la forma α , inoltre, codifica per un trascritto primario che in seguito a splicing alternativo genera due mRNA diversi tradotti nelle proteine $\alpha 1$ e $\alpha 2$. La sequenza aminoacidica di queste proteine è indentica fino al residuo 370 divergendo nelle regione C-terminale a valle di questo residuo. Poiché il dominio di legame dell'ormone tiroideo è situato al C-terminale, $\alpha 1$ è un recettore completamente funzionale, mentre $\alpha 2$, non essendo capace di legare l'ormone, non ne può mediare le azioni.

Anche il gene per la forma β codifica per due differenti proteine recettoriali denominate $\beta 1$ e $\beta 2$. La diversità in questo caso non è dovuta ad uno splicing alternativo del trascritto primario, bensì all'uso di due siti di inizio della traduzione differenti. Questo comporta la sintesi di due recettori per l'ormone tiroideo entrambi completamente funzionali e diversi solo per l'estensione della regione N-terminale.

Le varie isoforme dei TR sono espresse differentemente nei vari tessuti, risultando il loro rapporto diverso da tessuto a tessuto: i livelli di espressione, in particolare, sono influenzati in modo specifico da ormoni e da altri fattori di regolazione. Ciò può spiegare, almeno in parte, la responsività differenziale dei vari tessuti all'ormone tiroideo.

Negli ultimi dieci anni è stato dimostrato che TR si muove tra il citoplasma e il nucleo in cellule trattate con T_3 (*Cheng e collaboratori, 1998; Yen e collaboratori, 2001*). In particolare, *Paul Yen e collaboratori (2006)* hanno esaminato la distribuzione cellulare dei TRs in assenza e in presenza del ligando. A tale scopo essi hanno espresso recettori TR β wild type o mutanti TR β che non erano in grado di legare il DNA nelle cellule Hela e ne hanno osservato la distribuzione cellulare (*Baumann e coll. 2001*). Approssimativamente, il 90% dei TR β wild-type era presente nel nucleo sia in assenza che in presenza di T_3 . Quando si osservavano TR β mutati che non erano in grado di legare il DNA, essi, confrontati con i wild-type, presentavano solo una leggera alterazione nella loro distribuzione nucleo/citoplasma. Questo dimostra che il legame con il DNA non è necessario per il ritrovamento dei TR all'interno del nucleo.

Al contrario studi effettuati utilizzando TR β che non erano in grado di legare i co-repressori (N-CoR), mostrano una distribuzione dei TR β prevalentemente citoplasmatica in assenza di T_3 . Tale distribuzione diviene prevalentemente nucleare in presenza di T_3 . La co-trasfezione di RXR con TR β cambia la distribuzione di TR β libero da citoplasmatica a nucleare. Ciò dimostra che l'interazione proteina-proteina di TR β con co-fattori è un importante fattore per la distribuzione cellulare di TR β .

Recettori mitocondriali

Le prime ricerche effettuate per individuare la presenza di siti di legame per la T_3 a livello mitocondriale sono state effettuate da *Sterling e Milch (1975)*, i quali evidenziarono dei siti ad alta affinità per la T_3 . Tuttavia, in frazioni mitocondriali isolate dopo ripetute somministrazioni in vivo di T_3 non fu possibile evidenziare una saturazione dei suddetti siti. Le successive ricerche del gruppo di Sterling si sono avvalse di tecniche autoradiografiche basate sulla distribuzione dei granuli di argento (*Sterling e coll. 1984*). L'accumulo dei granuli di argento nei mitocondri ha rivelato la presenza di siti locati nella membrana mitocondriale interna 30 minuti dopo l'aggiunta di I^{125} - T_3 agli epatociti. Tuttavia l'accumulo degli stessi, verificatosi prevalentemente nei mitocondri e non nel nucleo, dove, invece è ben nota la presenza di siti di legame per la T_3 , è stata motivo di notevoli critiche. In seguito *Sterling e collaboratori (1984)* hanno purificato una proteina con massa molecolare di 28 KDa che mostra elevata affinità per la T_3 ($K_a=1 \times 10^{10} M^{-1}$) e per un suo analogo la 3,3'- T_2 ($K_a=1 \times 10^8 M^{-1}$). Successivamente è stato riportato che l'adenina nucleotide traslocasi, isolata da cuore bovino, lega la T_3 con un'alta affinità e una bassa capacità (*Sterling 1986*). Ciò ha indotto ad ipotizzare che l'adenina nucleotide traslocasi potesse essere determinante per il legame tra ormoni tiroidei e mitocondri. Tuttavia, la sequenza della proteina di 28 KDa che lega la T_3 nella membrana mitocondriale interna non presenta similitudine con la sequenza dell'adenina nucleotide traslocasi di 30 KDa. Inoltre, *Rasmussen e collaboratori (1989)*, in seguito a marcatura di mitocondri intatti di cuore di ratto con bromoacetil- T_3 (BrAc T_3), non sono stati in grado di evidenziare una forte marcatura, capace di essere spiazzata dalla T_3 e dai suoi analoghi, dell'adenina nucleotide traslocasi. Una tale

marcatura, tuttavia, fu evidenziata su due proteine con una massa molecolare di 48 e 49 KDa.

Goglia e collaboratori (1981) hanno isolato dei siti di legame per la T_3 da mitocondri di fegato di ratto. Il legame specifico della T_3 con i mitocondri era evidenziato solo se essi venivano “swellati” e trattati osmoticamente su una frazione che quindi risultava arricchita di membrane mitocondriali interne. Inoltre, i siti estratti dalla membrana mitocondriale interna presentano caratteristiche differenti dagli altri siti cellulari di legame per la T_3 ; i primi, al contrario dei siti nucleari, non mostrano dipendenza dagli agenti riducenti e presentano una differente affinità per gli analoghi, specialmente per la $3,3'$ - T_2 , verso cui i siti mitocondriali hanno una maggiore affinità.

Ricerche successive (*Adrail e coll. 1993*), effettuate con tecniche autoradiografiche, hanno dimostrato che, dopo 5 minuti dalla somministrazione in vivo, la T_3 radioattiva si lega ai mitocondri; questo legame è spiazzato dalla contemporanea somministrazione di eccessi di T_3 fredda. Gli stessi autori, mediante Western Blotting, hanno identificato due bande proteiche di 48 e 55 KDa in estratti mitocondriali che, precedentemente, erano già state identificate come recettori nucleari per l'ormone tiroideo. Gli mRNA che codificano per le suddette subunità dei recettori degli ormoni tiroidei (NTR), sono stati localizzati nella matrice citoplasmatica e vicino al reticolo endoplasmatico ma erano assenti nei mitocondri. E' quindi possibile che i recettori per la T_3 , codificati dal nucleo, possano venire da un pool di precursori polipeptidici citoplasmatici i quali potrebbero essere trasportati nei mitocondri. Questa ipotesi è abbastanza verosimile in quanto, delle centinaia di polipeptidi che fanno parte di un mitocondrio, solo 13 sono codificati dal genoma mitocondriale, la rimanente parte è codificata dal nucleo.

Il gruppo di *Wrutniak* (*Wrutniak e coll. 1994*), usando la marcatura per fotoaffinità della T₃, ha evidenziato la presenza di due siti di legame per la T₃ nella membrana interna (28KDa) e nella matrice (43KDa) di mitocondri molto puri. Il Western Blots e l'immunoprecipitazione con anticorpi hanno evidenziato che almeno la proteina di 43KDa era relativa al c-erbA1. Questa proteina, generata da un inizio alternativo della traduzione del codone AUG interno all'mRNA c-erbA1, non è presente in quei tessuti sprovvisti di recettori mitocondriali quali, ad esempio, alcune aree del cervello. La sua concentrazione è legata alla massa mitocondriale di tre tipici tessuti responsivi all'ormone tiroideo. In seguito a trasfezione delle cellule CV1 con cDNA codificante per una versione troncata della proteina c-erbA1 si verifica uno spiazzamento sia della sua localizzazione nucleare sia di quella mitocondriale.

L'espressione di questa proteina, inoltre, è stata associata ad un incremento della massa e delle attività mitocondriali determinate con misure enzimatiche .

Siti di legame specifici per la T₃ con K_a $0,5 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ sono stati identificati anche nella membrana mitocondriale esterna. Il legame "in vitro" è inibito dal calcio che induce un rilascio del recettore dalla membrana.

Meccanismi molecolari dell'azione dell'ormone tiroideo a livello nucleare

L'ormone tiroideo svolge un ruolo importante nello sviluppo e nelle funzioni di molti organi e tessuti.

Molti effetti degli ormoni tiroidei sono mediati da una famiglia di recettori ad alta affinità chiamati recettori per gli ormoni tiroidei (TR).

I recenti modelli che descrivono l'azione dell'ormone tiroideo, suggeriscono che la T₃ entra nelle cellule e migra al nucleo dove si lega al suo recettore.

Le isoforme di tali recettori hanno sequenza amminoacidica omologa a quella dei recettori per gli ormoni steroidei e quindi sono considerati membri della superfamiglia dei recettori nucleari, che include: i recettori per gli estrogeni, progesterone, glucocorticoidi, ac. retinico, vit. D3 e proliferatori perossisomali (*O'Malley, 1990*) (fig.3).

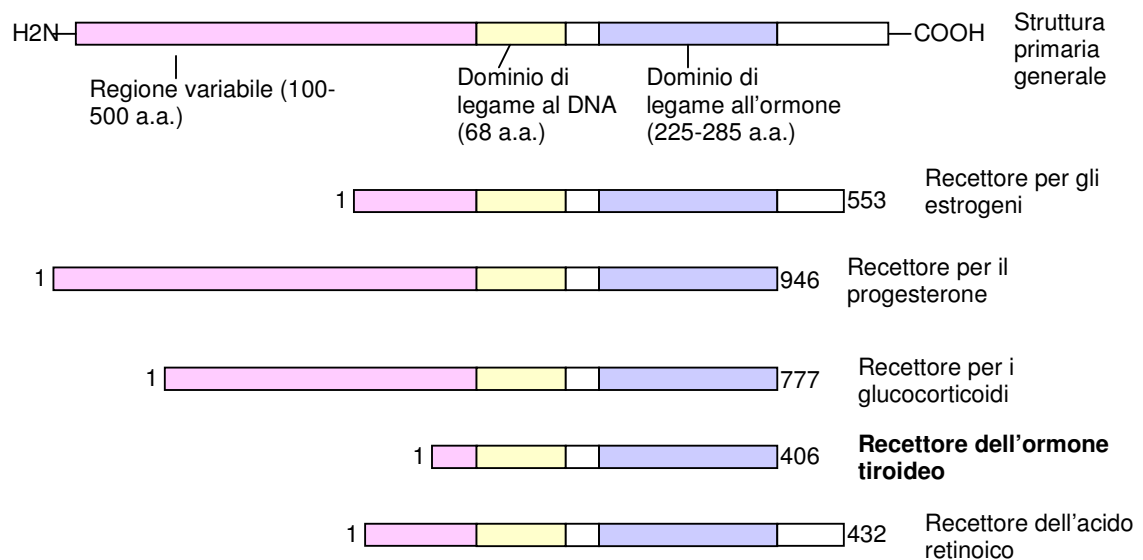


Fig. 3. Struttura di alcuni membri della superfamiglia dei recettori nucleari.

Tali recettori contengono una regione N-terminale molto variabile (in rosa); un dominio conservato di legame al DNA (in giallo); un dominio di legame con l'ormone (in celeste).

Quando la T₃ entra nelle cellule e migra al nucleo dove si lega al suo recettore, il complesso T₃-recettore che ne risulta regola l'attività di geni bersaglio interagendo con gli elementi responsivi all'ormone tiroideo (TRE) situati nelle sequenze regolatrici dei geni bersaglio di T₃. Sono stati identificati e sequenziati i TRE presenti in molti geni. Tutti contengono due copie di una sequenza generale abbastanza conservata: AGGTCA. I TR si legano agli elementi responsivi all'ormone sotto

forma di monomeri, omodimeri, dimeri $\alpha_1\text{-}\beta_1$ ed eterodimeri con proteine ausiliarie (TRAP) che incrementano il legame con i TRE (Murray e Towle, 1989; Sugawara e coll., 1993). I TR formano eterodimeri anche con il recettore dell'acido retinoico e con il recettore per il retinoide (RAR e RXR). Gli eterodimeri, rispetto agli omodimeri, hanno maggiore affinità per gli elementi responsivi e, probabilmente, hanno un ruolo nella trascrizione regolata dalla T_3 (Fig 4)

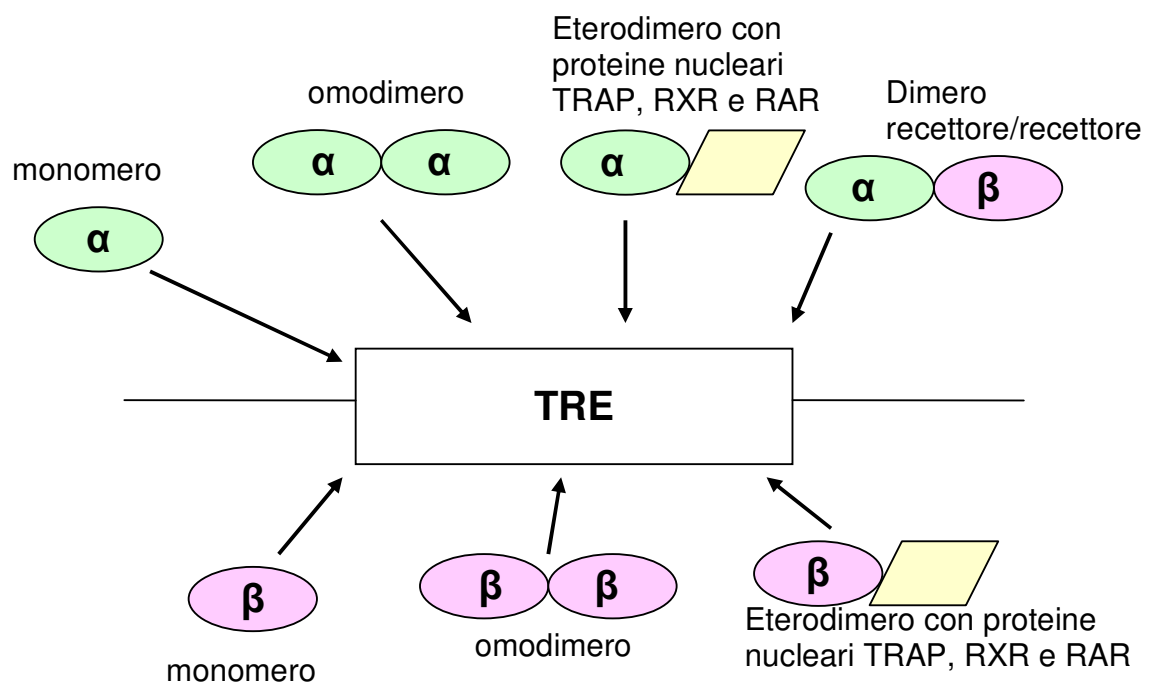


Fig. 4. I TR riconoscono i siti di legame sul DNA (TRE) in forma di monomeri, omodimeri ed eterodimeri.

Il legame dell'ormone tiroideo al suo recettore può portare ad una attivazione della trascrizione del gene target o alla sua repressione:

Regolazione positiva dell'espressione genica mediata dall'ormone tiroideo

Quando l'ormone tiroideo si lega al TRE contenuto nel promotore del gene target, agisce da "interruttore" tra stato attivato e stato represso.

La trascrizione di geni cui vanno a legarsi l'eterodimero TR/RXR o anche il solo TR, è repressa in assenza di ormoni tiroidei. La funzione di

repressore è localizzata nel dominio di legame al ligando C-terminale il quale si lega a molecole di co-repressori nucleari quali N-CoR e SMRT che si legano ad un largo numero di complessi multiproteici che possiedono attività di deacetilazione e mediano una repressione ligando-indipendente.

In presenza di ormoni tiroidei si verifica un cambiamento conformazionale che destabilizza il legame con il co-repressore e favorisce il legame con i co-attivatori della trascrizione genica, i quali possiedono attività di acetilazione dell'istone.

Regolazione negativa dell'espressione genica mediata dall'ormone tiroideo

Oltre a regolare positivamente l'espressione genica, l'ormone tiroideo è anche in grado di regolare in maniera negativa la trascrizione di un gene. Infatti, uno dei più importanti effetti fisiologici dell'ormone tiroideo è quello di regolare negativamente l'espressione del gene per la tireotropina a livello dell'ipofisi. Tale regolazione negativa è una fase importante per la normale funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide. Il meccanismo di regolazione negativa mediata dall'ormone tiroideo non è ancora molto chiaro e diverse sono le ipotesi che cercano di spiegare tale meccanismo.

Una di queste ipotesi prevede che il TR si leghi direttamente ad un TRE negativo (nTRE) e ciò si traduce in uno scambio tra co-attivatore e co-repressore (fig 5a). Ma quale è il meccanismo alla base di tale "switch"? In vitro, infatti, è chiaro che l'ormone tiroideo destabilizza il legame TR con il co-repressore mentre favorisce il legame con il co-attivatore. Una spiegazione potrebbe essere quella secondo la quale il legame al nTRE determini un'alterazione della conformazione del TR tale che il legame al co-repressore è favorito in presenza dell'ormone tiroideo.

In alternativa esistono una serie di co-attivatori e co-repressori che possono essere coinvolti nella repressione ligando-dipendente. La proteina RIP140 è un esempio di cofattore richiesto dal TR legato all'ormone tiroideo che inibisce la trascrizione (*Treutere e coll. 1998*).

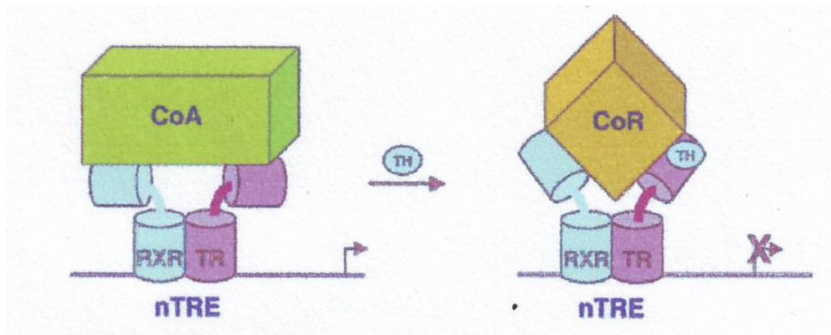
Esistono, inoltre, altri tre meccanismi mediante i quali l'ormone tiroideo potrebbe inibire l'espressione genica in maniera da non coinvolgere il dominio di legame TR/DNA. Uno di tali meccanismi coinvolge una proteina che lega il DNA, chiamata AP-1 la quale è in grado di interagire con TR. In questo modello l'interazione proteina-proteina (AP-1—TR/RXR), in presenza dell'ormone tiroideo, può alterare la conformazione allosterica del sito di legame presente sul TR e portare al reclutamento del repressore (invece che dell'attivatore) (fig 5b)

In un altro meccanismo il TR agirebbe nel nucleo per sottrarre co-attivatori e co-repressori (in presenza e in assenza di ormone tiroideo rispettivamente) da altri NR che utilizzano gli stessi attivatori e repressori (fig. 5c) .

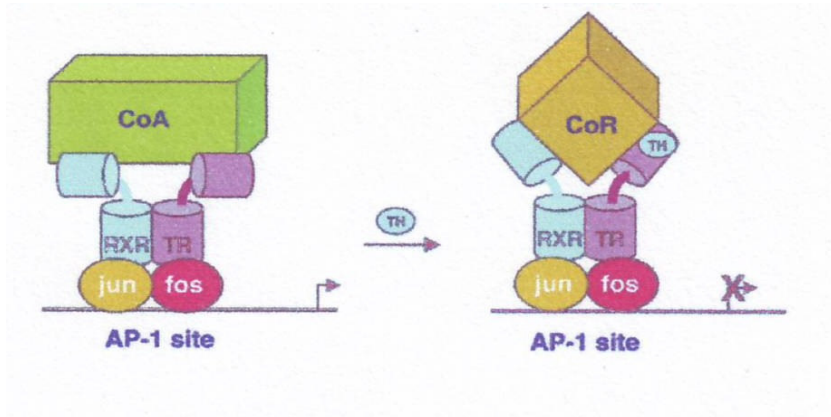
In ultimo il TR può avere effetti non nucleari portando all'attivazione di una cascata di chinasi che hanno un effetto sulla funzione di fattori di trascrizione (*Davis e coll.2000*).

Geni della catena respiratoria codificati nel nucleo

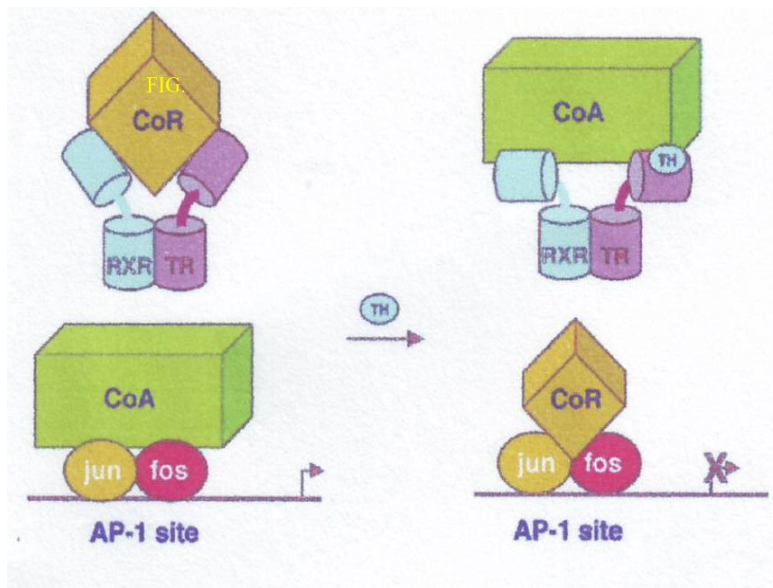
La T₃ attiva la trascrizione dei geni per la catena respiratoria dei mitocondri; questo ormone, legandosi ai propri recettori, stimola l'espressione di fattori di trascrizione: fattori respiratori nucleari (NRF), che inducono l'espressione di proteine mitocondriali, come quelle della catena di trasporto degli elettroni. La T₃ stimola l'espressione delle proteine del sistema della fosforilazione ossidativa, degli enzimi coinvolti nella loro sintesi. Un altro importante fattore di trascrizione è GABP/NRF-2 che è un attivatore dei geni che codificano per le subunità



a



b



c

Fig. 5. Regolazione negativa dell'espressione genica mediata dall'ormone tiroideo

della citocromo ossidasi (*Virbasius, Scarpulla, 1993*). Dunque la principale modalità d'azione dell'ormone tiroideo è quella nucleare: la T₃ è responsabile dell'aumento del metabolismo di riposo con un "effetto a lungo termine", mediato dalla sintesi proteica.

Meccanismi non trascrizionali

Gli ormoni tiroidei non influenzano solo la trascrizione ma anche altre tappe dell'espressione genica. Questa ultima coinvolge infatti una cascata di eventi che avvengono dopo la trascrizione e che comprende il turnover del trascritto primario (hmRNA), la formazione di mRNA maturo, il trasporto dell'mRNA al compartimento citoplasmatico, il turnover dell'mRNA, la traduzione, la modificazione post-trascrizionale, il turnover proteico e la stimolazione dei processi secretori.

La disponibilità di ormone a livello nucleare e tutti gli eventi che a livello cellulare sono in grado di regolarla possono rappresentare un altro livello di controllo regolatorio delle azione dell'ormone tiroideo. Il controllo tessuto-specifico della generazione della T₃ o del suo metabolismo possono, quindi, influenzare gli eventi nucleari. Un ruolo importante è svolto anche dalle proteine di membrana implicate nel trasporto degli ormoni tiroidei all'interno della cellula e dalle proteine citosoliche che legano T₄ e T₃ (CTBP) le quali controllano la loro accessibilità al nucleo e ad altri compartimenti (*Hashizume e coll 1986, 1991*).

Meccanismi molecolari della T₃ a livello mitocondriale

La dipendenza della struttura e della funzionalità mitocondriale dallo stato tiroideo è ben documentata. Molti parametri ne risultano influenzati tra cui velocità respiratoria, contenuto dei citocromi, numero dei

mitocondri, area della superficie interna mitocondriale, sintesi proteica. Tutti questi parametri sono ridotti dall'ipotiroidismo e sono incrementati in seguito alla somministrazione di ormone. La maggior parte delle azioni dell'ormone tiroideo riscontrate a livello mitocondriale sono il risultato dell'induzione dell'espressione genica nucleare i cui effetti sono riscontrabili solo dopo molte ore dal suo inizio.

Per quanto riguarda la velocità respiratoria mitocondriale è stato dimostrato che l'ormone tiroideo è in grado di influenzarne sia lo Stato 4 (respirazione basale) che lo Stato 3 (respirazione in presenza di una concentrazione saturante di ADP). Nonostante l'ormone tiroideo sia in grado di incrementare la concentrazione di alcuni componenti della catena di trasporto elettronica (*Van Stallie 1990*), il suo effetto sullo Stato 3 sarebbe dovuto alla stimolazione dei processi che coinvolgono la respirazione e l'esporto dell'ATP (*Hafner e coll. 1990, Dummler e coll. 1996*), grazie all'induzione dell'adenina nucleotide traslocasi (*Mowbray e coll. 1984*). Per quanto riguarda l'effetto sullo Stato 4 della velocità respiratoria esso sembra essere dovuto ad un incremento della perdita protonica attraverso la membrana mitocondriale interna ("proton leak") (*Hafner e coll. 1988*), probabilmente dovuta ad una variazione della sua composizione lipidica.

Le modifiche indotte dall'ormone destano molto interesse per la relazione che esiste tra il funzionamento mitocondriale e il metabolismo di base; la M.M.I. è la sede della sintesi di ATP a partire da ADP + Pi (Fig.6).

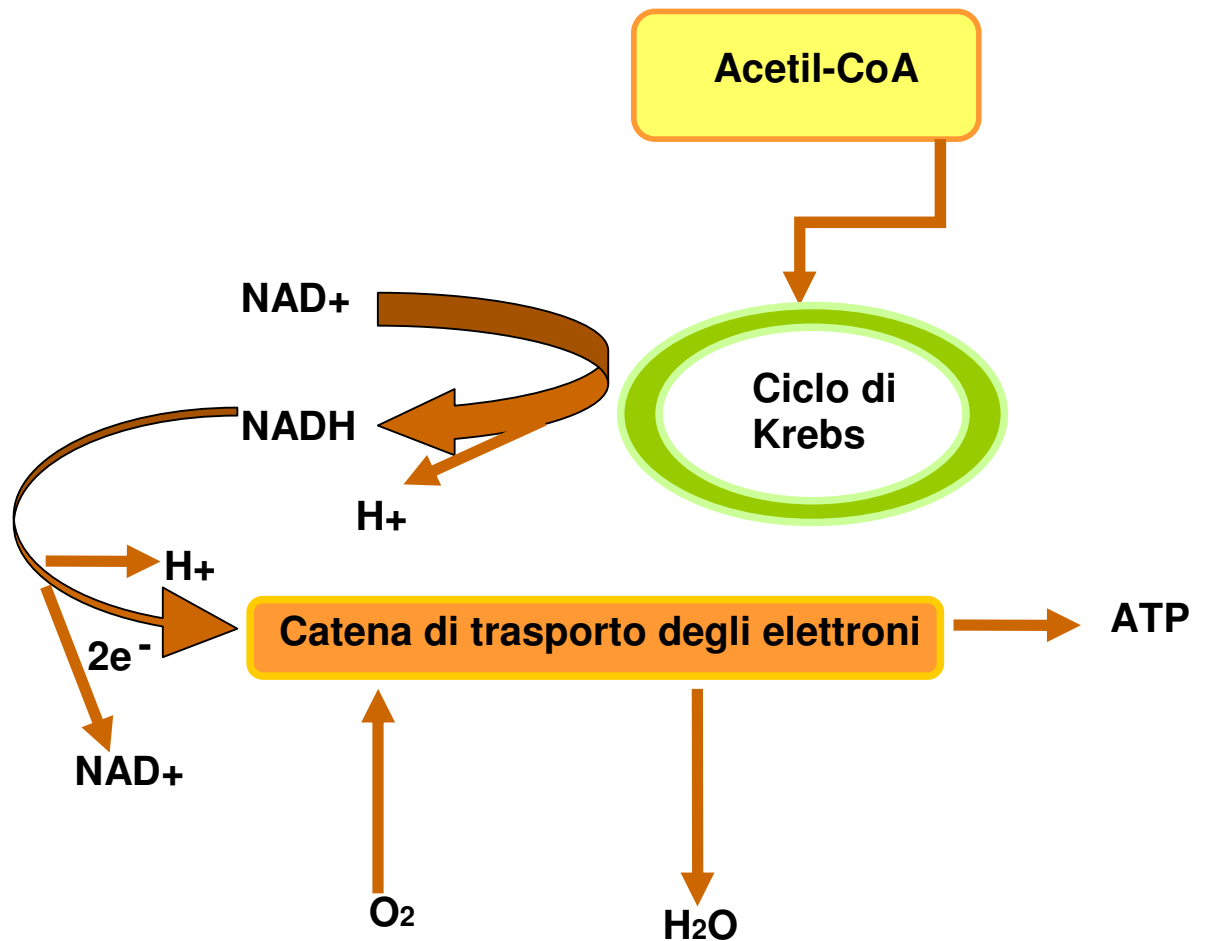


Fig 6. Schema dei più importanti processi mitocondriali.

Secondo la teoria chemiosmotica di Mitchell, il trasporto degli elettroni e la sintesi di ATP sono accoppiati da un gradiente di protoni attraverso la M.M.I.: i complessi enzimatici, che costituiscono la catena respiratoria, trasportano gli elettroni dal NADH e FADH₂ fino all'ossigeno con formazione di H₂O; alcune proteine della catena respiratoria hanno la capacità di funzionare come pompe protoniche, trasportando i protoni dalla matrice allo spazio intermembrana, utilizzando l'energia liberatasi nel passaggio degli elettroni lungo la catena. Questa espulsione di cariche positive produce un gradiente elettrochimico ai due capi della membrana, detto forza protonmotrice ($\Delta\Psi$). Il $\Delta\Psi$ tende a far rientrare questi H⁺ verso la matrice, generando un flusso che tende a dissipare lo stesso. I protoni rientrano nella matrice grazie ad una ATP-sintasi,

liberando energia e fornendola all'enzima che la usa per produrre ATP a partire da ADP e Pi. Tuttavia la M.M.I. presenta una perdita protonica passiva, chiamata proton leak, che provoca il ritorno degli H⁺ alla matrice, facendo sì che la fosforilazione non sia completamente accoppiata. Per bilanciare questa perdita protonica, non associata a sintesi di ATP, le cellule consumano più ossigeno: nel muscolo scheletrico in contrazione c'è un consumo aumentato del 35%, nel muscolo a riposo, del 50%.

Gli ormoni tiroidei e l'efficienza della fosforilazione ossidativa

Il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa è stato ipotizzato, per la prima volta negli anni 50, per spiegare l'aumento di calore nell'uomo e negli altri mammiferi indotto dalla T₃. Gli ormoni tiroidei aumentano il consumo di ossigeno disaccoppiando il trasporto degli elettroni dalla produzione di ATP. È stato dimostrato che lo Stato 4 (senza sintesi di ATP) e lo Stato 3 (con sintesi di ATP) di animali ipotiroidei sono più bassi di quelli di animali eutiroidei, che, a loro volta, presentano valori di Stato 4 e Stato 3 minori di quelli di animali ipertiroidei. È stato tra l'altro dimostrato che la proton leak influenza significativamente lo Stato 4 della respirazione (*Hafner e coll. 1988*). La T₃ influenza l'entità della perdita protonica: essa è ridotta nei mitocondri isolati da fegato di animali ipotiroidei, e incrementata nei mitocondri isolati da animali ipertiroidei (*Horrum, Tobin, Ecklund, 1990*). Tale disaccoppiamento dovrebbe coinvolgere la presenza di proteine localizzate nella M.M.I. tra cui le proteine disaccoppianti o UCPs (Fig.7).

UCP1: è espressa nei mitocondri del tessuto adiposo bruno (TAB). Tale proteina è fondamentale per la termogenesi perché dissipa completamente il gradiente protonico al livello della membrana mitocondriale, dissipando tutta l'energia sotto forma di calore. Sono poi

state scoperte altre proteine disaccoppianti chiamate UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5 (proteina carrier mitocondriale detta pure BMCP1).

Spazio intermembrana

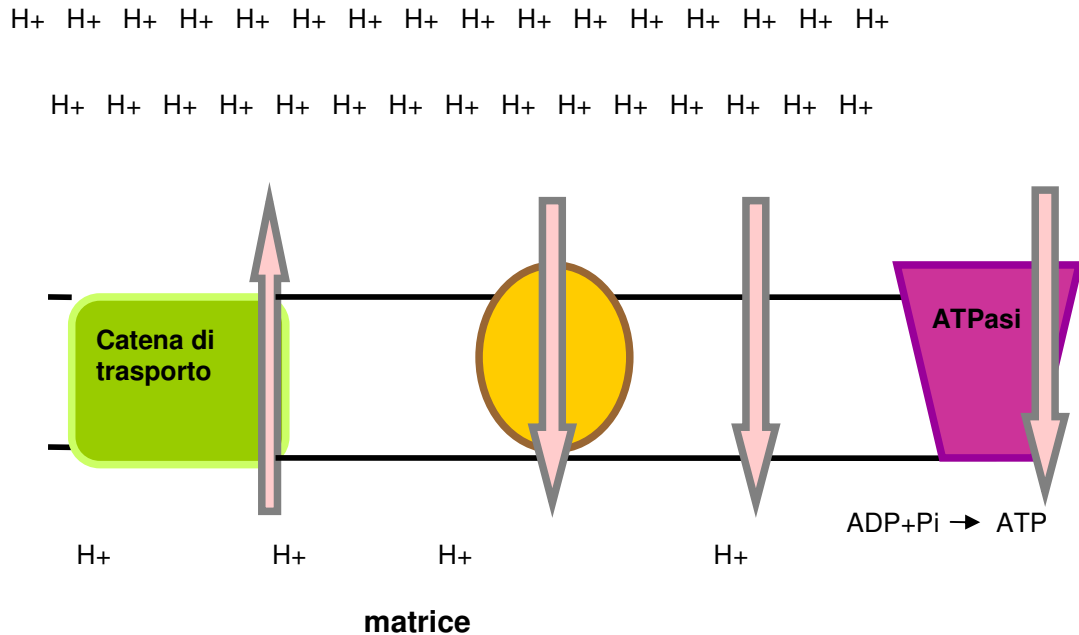


Fig 7. Inefficienza della fosforilazione ossidativa.

I protoni, pompato nello spazio intermembrana dalla catena di trasporto degli elettroni, tendono a tornare nella matrice attraverso l'ATPasi o permeano la membrana attraverso il doppio strato fosfolipidico o attraverso specifiche proteine.

Ormoni tiroidei e proteine che mediano il disaccoppiamento

L'espressione del gene dell'UCP1 è regolata dalla noradrenalina e da segnali generati dalla T3 (*Bianco e coll., 1988*); l'ormone stimola la trascrizione del gene dell'UCP1 attraverso i TRs. La somministrazione di T3 ai roditori è in grado di incrementare l'espressione di UCP2 e UCP3 nel cuore e nel muscolo scheletrico (*Lanni e coll., 1997; Larkin e coll., 1997; Lanni e coll., 1999*). Altri ricercatori hanno confermato che la somministrazione dell'ormone tiroideo a ratti ipotiroidei determina il disaccoppiamento mitocondriale nel muscolo (*Juker e coll., 2000*). Gli acidi grassi hanno la capacità di indurre l'espressione dell'UCP3 nel muscolo e dell'UCP2 nel tessuto adiposo. È, infatti, stato dimostrato che

nei roditori e nell'uomo agli alti livelli di acidi grassi plasmatici sono associati alti livelli di mRNA per UCP3 (*Boss e coll. 2000*). E' ben noto che la T3 induce la lipolisi e che l'ipertiroidismo è associato ad un alto livello di FFA. Ciò suggerisce che gli FFA potrebbero mediare gli effetti che gli ormoni hanno sull'induzione della trascrizione dell'mRNA per UCP3. Gli FFA sarebbero capaci di regolare l'espressione di UCP3 tramite l'interazione con fattori trascrizionali come i recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi (PPARs). È inoltre stato evidenziato che, in presenza di BSA (chelante degli FFA), non è evidenziabile il cambiamento netto nella cinetica di proton leak che accompagna la transizione ipo-ipertiroidismo (*Lanni e coll. 1999*). È riconosciuto infatti il ruolo di disaccoppianti naturali degli FFA; però è stata pure avanzata l'ipotesi che gli FFA siano importanti cofattori per l'attività disaccoppiante di UCP3. *Lombardi e collaboratori (2002)* hanno dimostrato che entrambe le suddette possibilità si verificano:

- i mitocondri di animali ipertiroidei hanno un contenuto di acidi grassi liberi maggiore di quello degli animali eutiroidei o ipotiroidei.
- l'incremento del contenuto mitocondriale di UCP3 che si verifica nel passaggio ipo-ipertiroidismo è legato ad un maggiore disaccoppiamento mediato dagli acidi grassi.

Una serie di esperimenti condotti nei mitocondri di fegato ha evidenziato un possibile coinvolgimento di AdNT nel disaccoppiamento (*Skulachev e coll. 1991*): probabilmente AdNT lavora come carrier che trasporta gli anioni degli acidi grassi. Questi si formano poiché gli acidi grassi, arrivando nella matrice attraverso la membrana interna per flip flop, dato il pH, si trovano in forma anionica e quindi non sono capaci di attraversare la M.M.I.. L'AdNT espelle gli anioni dalla matrice verso lo spazio intermembrana. I dati ottenuti sono avvalorati dal fatto che, in

mitocondri di fegato, in seguito alla somministrazione della T_3 si verifica un incremento del contenuto di AdNT (*Schonfeld, 1997*).

CAPITOLO 2

Ruolo della T₂ nel controllo del metabolismo energetico

La maggior parte degli studi effettuati sugli ormoni tiroidei sono stati focalizzati solo su T₃ e T₄ dando poca importanza ai prodotti del metabolismo periferico.

Oggi è noto che, oltre alla T₃ e alla T₄, altre iodotironine, da sempre considerate solo molecole inattive prodotte dal metabolismo periferico della T₃, possono controllare il metabolismo di riposo. Tra queste emergono le diiodotironine ed in particolare la T₂.

Sebbene molti degli effetti diretti mitocondriali degli ormoni tiroidei restino incerti e controversi, è concepibile che i loro effetti nucleari e non nucleari siano temporalmente coordinati e sinergici, e che essi possano essere mediati, oltre che dalla T₃, anche dalle altre iodotironine. Circa 25 anni fa è stato riportato che in una frazione mitocondriale arricchita di membrane interne isolate da fegato, queste presentavano siti di legame per la T₃. Tali siti mostravano elevata affinità per la 3,3'-diiodotironina (*Goglia e coll., 1981*). Circa dieci anni dopo fu evidenziato che la T₂, come la T₃, a concentrazione pari a 1pM, provoca una rapida stimolazione (pochi minuti) del consumo di ossigeno in fegato perfuso ottenuto da ratti ipotiroidei (*Horst e coll., 1989*). Tuttavia l'effetto della T₃, ma non quello della T₂, era abolito dalla presenza di un inibitore dell'attività della deiodinasi di tipo 1 suggerendo che gli effetti della T₃ fossero il risultato della conversione a T₂.

Successivamente furono condotti molti studi per comprendere gli effetti della T₂ sul metabolismo energetico, sulla respirazione cellulare e su quella mitocondriale. La somministrazione di una singola dose di T₂ ha un effetto più rapido sulla respirazione mitocondriale rispetto alla T₃, in quanto l'effetto della T₂ è evidente già dopo un'ora, mentre quello della

T₃ si manifesta dopo 24 ore (*Lanni e coll., 1992*). Inoltre, l'effetto della T₂ è indipendente dalla sintesi proteica in quanto è evidente anche in presenza di cicloesimide (*O'Reilly e Murphy, 1992*). Ciò ha suggerito che gli effetti della T₂ fossero mediati da una interazione diretta con i mitocondri mentre quelli della T₃ fossero il risultato della sua azione a livello nucleare (*Moreno e coll. 1997*).

L'effetto della T₂ sulla velocità del consumo di ossigeno mitocondriale ha suggerito che la stessa iodotironina potesse avere un effetto sul metabolismo energetico dell'intero animale. Tale ipotesi fu confermata da risultati ottenuti da *Lanni e coll. (1997)*. Tali autori iniettarono una singola dose di diiodotironina a ratti ipotiroidei che presentavano l'attività degli enzimi deiodinasi bloccata ed esaminarono i cambiamenti nella velocità del metabolismo di riposo (RMR). In effetti l'RMR degli animali ipotiroidei che, era significativamente ridotto rispetto a quello degli animali eutiroidei, rispondeva in maniera differente in seguito alla somministrazione di T₃ o T₂ (entrambe alla dose di 25 µg/100g pc). La T₃, infatti, induceva un incremento nel RMR di quasi il 35% che iniziava 25-30 ore dopo la somministrazione della iodotironine, raggiungeva un massimo valore a 50-75 ore e si prolungava fino a 5-6 giorni dopo la somministrazione. L'iniezione della T₂ alla stessa dose, induceva una risposta diversa con incremento dell'RMR (di quasi il 40%) che iniziava tra 6 e 12 ore dopo la somministrazione, raggiungendo un picco a 24-30 ore e terminando quasi dopo 48 ore. Inoltre se le iodotironine venivano somministrate simultaneamente all'actinomicina D, la stimolazione dell'RMR da parte di T₃ era quasi completamente abolita, mentre quella indotta dalla T₂ non causava alcuna attenuazione della stimolazione rilevata (*Lanni e coll. 1996; Moreno e coll.1997*). Tali dati sostengono l'ipotesi di un meccanismo di azione della T₂ indipendente dal nucleo

(Fig. 8). La rapida capacità eccito metabolica della T2, indipendente dalla trascrizione, ha suggerito che essa potesse essere coinvolta in

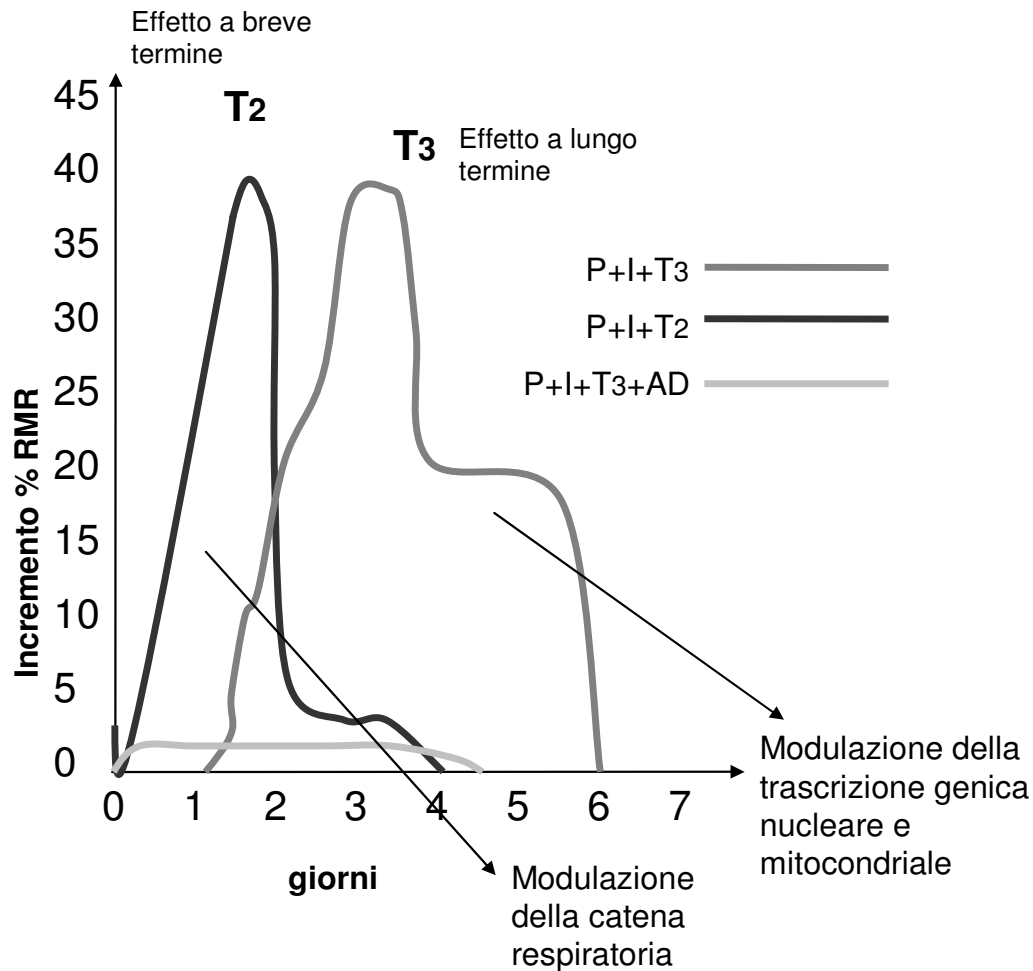


Fig 8. Descrizione generale dei meccanismi proposti per gli effetti di T3 e T2 sull'RMR.

Sono stati misurati gli effetti sull'RMR di una singola iniezione di T2 o T3 in animali resi ipotiroidei in seguito al trattamento con PTU e IOPA. In queste condizioni la T2 e la T3 incrementano l'RMR sebbene i loro effetti differiscano in termini di time course e di dipendenza dalla sintesi proteica. La T3 agisce tramite un pathway mediato dal nucleo: il suo massimo effetto si rileva dopo 2-3 giorni e il suo effetto viene completamente bloccato dalla simultanea somministrazione di actinomicina D. Al contrario, la 3,5-T2 stimola l'RMR in modo rapido: il suo massimo effetto si rileva già dopo 1 giorno ed è insensibile all'actinomicina D.

situazioni in cui è richiesta una rapida produzione di calore quale ad esempio l'esposizione al freddo. In effetti sia T3 sia T2 migliorano la tolleranza al freddo ma attraverso differenti meccanismi (Lanni e coll., 1998); in ratti ipotiroidei esposti ad una temperatura di 4°C sia la T3 che

la T₂ (somministrate cronicamente) aumentano la spesa energetica dell'animale e stimolano l'attività della citocromo ossidasi (COX) di tessuti metabolicamente molto attivi come il cuore, il muscolo scheletrico, il fegato e il BAT. Un importante esperimento sull'effetto metabolico esercitato in vivo dalla T₂ fu condotto da *Cimmino e coll.* (1996) che monitorarono la spesa energetica giornaliera, attraverso la misura del consumo di ossigeno e la produzione di biossido di carbonio, dell'animale in toto.

Tali autori evidenziarono che la somministrazione di T₃ o di T₂ a ratti ipotiroidei ripristinava il valore della spesa energetica caratteristica degli animali. Lo stesso studio indicava che la T₂ è in grado di stimolare significativamente la β -ossidazione lipidica. Nonostante gli effetti in vivo della T₂ su animali ipotiroidei siano chiari e riproducibili, la somministrazione della stessa, a ratti eutiroidei, non provoca alcun cambiamento nell'RMR. Più fenomeni potrebbero essere alla base del mancato effetto della 3,5-T₂ negli animali eutiroidei: a) La T₂ viene velocemente metabolizzata; b) La diiodotironina non entra adeguatamente nelle cellule; c) Per raggiungere i bersagli cellulari la diiodotironina ha bisogno di essere formata da un precursore come la T₃; d) Lo stato metabolico degli animali (composizione della dieta) può avere un ruolo nel permettere agli effetti metabolici di T₂ di essere rilevati. In particolare il punto c è stato chiarito dagli studi di *Moreno e coll.* (2002). Tali autori hanno esaminato il cambiamento nell'RMR dopo somministrazione di T₃ a ratti eutiroidei (N) ed hanno comparato i risultati con quelli ottenuti dopo iniezione acuta della stessa iodotironina in ratti resi ipotiroidei, che presentavano le deiodinasi bloccate (P+I), e in ratti eutiroidei che presentavano una inibizione delle deiodinasi. I risultati hanno mostrato che 1) l'iniezione acuta della T₃ a ratti eutiroidei ha un evidente effetto sull'RMR che precede di circa 25 h

l'effetto osservato nei ratti P+I. 2) La simultanea somministrazione di actinomicina D inibiva completamente l'ultima parte dell'effetto indotto da T₃ sull'RMR di animali eutiroidei ma non ne aboliva l'effetto precoce. 3) La somministrazione di T₃ e di actinomicina D ad animali ipotiroidei con le deiodinasi bloccate (P+I) confermava la completa perdita dell'effetto della T₃ già osservato in precedenza dagli stessi autori (*Moreno e coll. 2002*). 4) In ratti normali l'inibizione acuta delle deiodinasi (4 ore prima della somministrazione della T₃) risultava in una riduzione nella parte precoce dell'effetto della T₃ (che era anche indipendente dall'actinomicina D), indicando che la deiodinazione della T₃ era una tappa metabolica necessaria per produrre il suo effetto. 5) Il massimo incremento nell'RMR che, risultava essere actinomicina D insensibile, coincideva con il massimo della concentrazione epatica di T₂, fenomeno che si verificava circa 25 h dopo l'iniezione di T₃ a ratti eutiroidei (N). Questi risultati indicavano che la parte iniziale dell'incremento dell'RMR che si verificava dopo somministrazione di T₃ in ratti N era dovuto alla sua conversione in T₂ il cui effetto è noto essere indipendente dall'actinomicina D; che la T₃ è il precursore, in vivo, della T₂ e che le deiodinasi sono coinvolte in tale processo. Questa ultima evidenza è di notevole importanza in quanto in vitro non è stata mai messa in evidenza la genesi di 3,5-T₂ a partire dalla T₃.

Bersagli cellulari della T₂

L'idea dell'esistenza di una proteina citoplasmatica di legame (CTBP) che potesse mediare l'effetto della diiodotironina fu avanzata in seguito alla scoperta, attraverso marcatura per fotoaffinità, di siti di legame per la T₂ nel citosol di cellule di fegato di ratto. Furono identificate tre proteine: una di 86, una di 66 e la terza di 38 KDa (*Moreno e coll. 2003*); quest'ultima mostrava una maggiore affinità per la T₂, legandola in

assenza di NADPH; mentre la stessa proteina era anche in grado di legare la T3 ma solo in presenza di NADPH. Siti specifici di legame per la T2 sono stati anche evidenziati nei mitocondri di fegato di ratto. Essi mostrano un'alta affinità (dell'ordine di 10^8 M^{-1}) ed una bassa capacità di legame (0.4-0.6 pmoli/mg proteine) (*Goglia e coll. 1994*). Le analisi di competizione hanno mostrato che i suddetti siti sono altamente specifici per la T2 e che altre iodotironine, quali 3,3'-T₂, T3 e T4, sono in grado di competere significativamente soltanto quando sono presenti ad un'elevata concentrazione (10^{-5}). Per ottenere delucidazioni sulla natura biochimica di questi siti mitocondriali, *Lombardi e coll. (1998)* hanno effettuato studi nei quali l'analisi top-down dell'elasticità era applicata ai mitocondri isolati da ratti in cui era iniettata la diiodotironina in maniera acuta. I risultati hanno mostrato che, 1h dopo la sua somministrazione, la T2 ha effetto sulle cinetiche di reazioni coinvolte nell'ossidazione dei substrati. La diiodotironina agisce su due blocchi di reazioni della catena respiratoria: il complesso IV (COX) e il blocco delle reazioni coinvolte nella riduzione del citocromo C (*Lombardi e coll. 1998*). La scoperta che l'aggiunta di T2 al complesso della COX isolato dai mitocondri di cuore bovino stimolava la sua attività indica che il complesso della COX può essere uno dei bersagli della T2 (*Goglia e coll. 1994*). *Arnold e coll. (1998)* usando procedure di marcatura per fotoaffinità, identificarono la subunità Va del complesso della COX come sito di legame per la T2 (Fig.9). La natura specifica del legame è stata confermata utilizzando un anticorpo monoclonale contro la subunità Va, in presenza del quale veniva impedito il legame della diiodotironina alla subunità stessa (*Arnold e coll., 1998*).

Altre azioni indirettamente coinvolgenti i mitocondri potrebbero costituire parte dell'effetto biologico della T2. Infatti, *Hummerich e coll. (1989)* suggerirono un'influenza della diiodotironina sull'attività

mitocondriale che potrebbe essere mediata da un incremento nella captazione di calcio che si traduce in un'incrementata attività dei mitocondri dovuta all'aumento dell'attività delle deidrogenasi mitocondriali; questo dovrebbe portare a un incremento nella quantità di substrati ridotti disponibili per la catena respiratoria (Denton, McCormac, (1985).

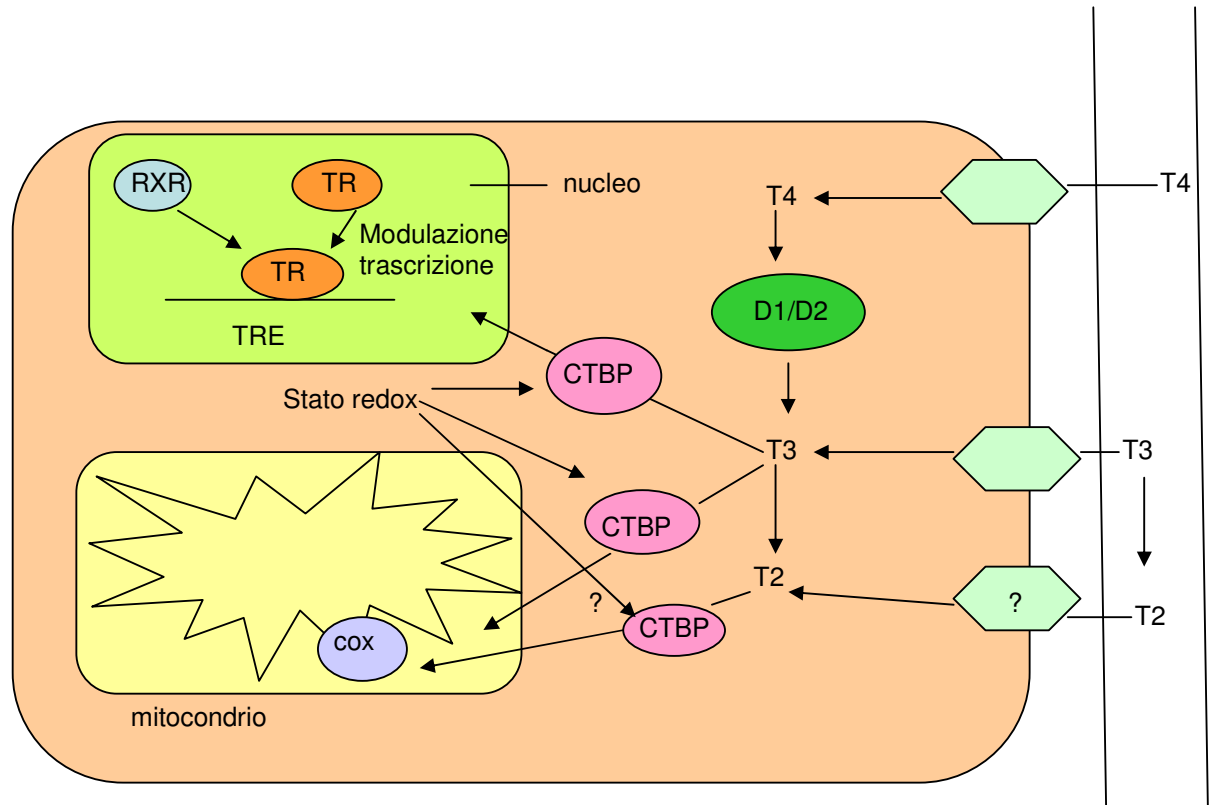


Fig 9. Schematica rappresentazione dell'azione degli ormoni tiroidei (T3 e T2) a livello del nucleo e del mitocondrio.

Le deiodinasi mitocondriali possono generare la T₃ ma anche la T₂. Il mitocondrio contiene specifici siti di legame per la T₂, come la subunità Va del complesso COX, attraverso cui la diiodotironina modula l'attività della catena respiratoria. La T₂ viene formata all'interno della cellula ma può anche provenire dal plasma; tuttavia, specifici trasportatori per la T₂ sulla membrana plasmatica non sono stati identificati. Gli effetti della T₂ sul mitocondrio dipendono dal legame della T₂ con le CTBP e sono indipendenti dallo stato redox della cellula.

È stato evidenziato che la T2 è in grado di agire su alcuni importanti enzimi bersaglio dell'ormone tiroideo come quelli lipogenici (enzima malico e glucosio-6-fosfato-deidrogenasi). La T2 è 3-5 volte più potente della T3 a stimolare l'attività della G6PD (il suo effetto non è né influenzato da inibitori della sintesi proteica, né induce cambiamenti nell'espressione dell'mRNA di G6PD) (*Lombardi e coll. 2000*).

Importanza della T2 nel ridurre l'adiposità nei ratti

L'obesità, che è definita come aumento della massa del tessuto adiposo, comporta un più alto rischio di incorrere in malattie cardiovascolari e metaboliche come diabete, steatosi epatica, dislipidemia e malattie coronariche. Fino ad ora ci sono stati pochi trattamenti per curare l'obesità e le sue relative complicazioni.

Gli ormoni tiroidei causano riduzione di peso attraverso un'incrementata velocità metabolica e una riduzione delle LDL tramite sia un up-regulation dei recettori delle LDL che un incremento nel metabolismo del colesterolo. Nonostante ciò, la concomitante induzione dello stato tiro tossico (incremento della massa della tiroide e del cuore, tachicardia, fibrillazione atriale, riduzione della massa muscolare) ha limitato l'utilizzo degli ormoni tiroidei e/o dei loro agonisti come agenti con attività anti-obesità. I tentativi per eliminare gli effetti collaterali (soprattutto quelli cardiovascolari) mediante la somministrazione dei bloccanti β -adrenergici non prevenivano l'eccessivo decremento nella massa corporea magra. L'utilizzo di analoghi (essendo privi di effetti tiro tossici) dovrebbe rappresentare un progresso terapeutico potenzialmente valido. La T2 può indurre inefficienza metabolica, stimolando la perdita di energia mediante meccanismi che coinvolgono l'apparato mitocondriale piuttosto che i recettori nucleari per la T3. Una

tale azione potrebbe risultare nella riduzione dell'adiposità e del peso corporeo senza indurre una sindrome clinica relazionata allo stato tireotossico. Recenti ricerche suggeriscono che la somministrazione della T2 a ratti che ricevono una dieta iperlipidica (HFD) è in grado di ridurre l'adiposità e il peso corporeo senza indurre cambiamenti nei livelli serici di T3 e T4. I ratti che ricevono T2 (HFD+ T2), quando paragonati ai ratti che ricevono solo una dieta iperlipidica, consumavano circa il 6% di cibo in più e mostravano un peso corporeo più basso del 13% (i loro pesi corporei non erano diversi da quelli dei ratti normali nutriti con una dieta standard). Inoltre, i ratti HFD+ T2 avevano circa il 50% di massa grassa in meno, mentre la loro massa magra non era variata, e mostravano una completa scomparsa della steatosi epatica caratteristicamente indotta dalla dieta iperlipidica. L'effetto anti-steatosico della T2 sui fegati di ratti HFD era accompagnato da un incremento (42%) del tasso di ossidazione degli acidi grassi e da una riduzione dei livelli serici di trigliceridi e colesterolo (-52% e -18%, rispettivamente). Tale incremento nell'ossidazione degli acidi grassi coinvolge la regolazione dei principali componenti della via del malonil-CoA quali 1) Acetil-CoA-carbossilasi (ACC) che è l'enzima limitante nella sintesi di malonil-CoA, 2) Il citrato citosolico (un attivatore allosterico di ACC e il precursore del suo substrato, l'acetil-CoA citosolico) e 3) La proteina chinasi attivata dall'AMP (AMPK), un enzima attivato dalla riduzione nello stato energetico della cellula riflesso dall'aumento del rapporto AMP/ATP. In effetti quando l'AMPK è nella sua forma attiva ossia fosforilata (P-AMPK) fosforila e inattiva ACC, riducendo la concentrazione cellulare del malonil-CoA, un inibitore allosterico di CPT1 (enzima esterno del sistema della carnitina palmitoil transferasi) che è limitante per il trasporto degli acidi grassi nella matrice mitocondriale (e perciò per l'ossidazione degli acidi grassi). Ridotti livelli di malonil-CoA portano

all'attivazione di CPT1 e quindi ad un aumento nel trasporto degli acidi grassi nella matrice. È stato verificato il coinvolgimento di questo pathway negli effetti della T2 sulla β -ossidazione del fegato (misurando l'attività di CPT e ACC come pure la fosforilazione di AMPK nel fegato di ratto). In effetti i dati hanno dimostrato che la T2 è in grado di incrementare la β -ossidazione e l'uptake di acidi grassi attivati nei mitocondri (attraverso l'attivazione del sistema CPT) senza alcuna inibizione dell'attività di ACC ma con una forte attivazione di AMPK. Ciò ha suggerito che la T2 potrebbe incrementare il flusso di acidi grassi nei mitocondri regolando CPT1 con una modalità dipendente da P-AMPK ma allo stesso tempo indipendente da ACC-malonil-CoA.

La T2, stimolando l'ossidazione degli acidi grassi, può indurre una utilizzazione meno efficiente dei substrati lipidici stimolando un meccanismo termogenico come il disaccoppiamento mitocondriale (proton leak). Infatti, la proton leak (portando a una ridotta sintesi di ATP e ad un aumento nel consumo dei grassi) risultava maggiore nei ratti HFD+ T2 rispetto a quella dei ratti HFD (*Lanni e coll. 2005*). Questo suggerisce che la perdita protonica gioca un ruolo determinante negli effetti esercitati dalla 3,5- T2 sull'efficienza dell'utilizzazione dei substrati e quindi sull'adiposità.

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi 15 anni, molte ricerche sono state finalizzate all'identificazione del ruolo biologico e del meccanismo d'azione della 3,5-T₂, per molti anni ritenuto solo un metabolita inattivo degli ormoni tiroidei T₄ e T₃. Tuttavia, varie osservazioni hanno permesso di rivedere tale idea.

Gli studi relativi al ruolo fisiologico della 3,5-T₂ hanno mostrato che essa ha un ruolo importante nella regolazione delle funzioni bioenergetiche cellulari (*Lanni e coll. 2001*). La 3,5-T₂, infatti, stimola rapidamente l'attività mitocondriale (*Lanni e coll. 1993; O'Reilly e coll. 1992; Lombardi e coll. 1998*) interagendo direttamente con tali organelli a livello dei quali sono stati evidenziati dei siti di legame specifici per la iodotironina stessa (*Moreno e coll. 1997*).

L'effetto rapido e diretto della 3,5-T₂ a livello mitocondriale si riflette in un incremento del metabolismo di riposo (MR) dell'animale in toto (*Lanni e coll. 1996*). Il meccanismo mediante il quale la 3,5-T₂ incrementa il MR sembra essere diverso da quello mostrato dalla T₃. La prima, quando somministrata a ratti ipotiroidei che allo stesso tempo presentano l'attività degli enzimi deiodinasi bloccati, induce un incremento del MR che si avvale di un meccanismo di azione indipendente dalla trascrizione genica. Infatti gli effetti della 3,5-T₂ si manifestano anche quando viene somministrata in presenza di actinomicina D, un ben noto inibitore della trascrizione genica. Invece, gli effetti della T₃ sul MR sono aboliti dall'actinomicina D e se paragonati a quelli indotti dalla 3,5-T₂ risultano essere tardivi. Infatti, la T₃ induce un incremento del MR che risulta evidenziabile dopo circa 24-36 ore dalla somministrazione della iodotironina mentre gli effetti indotti dalla 3,5-T₂ risultano evidenziabili già dopo sole 6-12 ore (*Lanni e coll. 1997*). Un dato molto interessante è che agli effetti 3,5-T₂, rapidi e diretti a livello mitocondriale, non sono associati fenomeni di

iperplasia dei tessuti metabolicamente molto attivi, fenomeno che invece risulta associato alla somministrazione cronica di T_3 (*Lanni e coll. 2005*).

L'effetto eccito metabolico della 3,5- T_2 ha suggerito che essa potesse indurre una riduzione dell'adiposità e dell'incremento del peso corporeo quando somministrata cronicamente a ratti alimentati con una dieta iperlipidica (*Lanni e coll. 2005*). I risultati ottenuti da *Lanni e coll. (2005)* dimostrano che i ratti trattati simultaneamente con dieta iperlipidica e 3,5- T_2 mostrano un incremento del peso corporeo e dell'adiposità viscerale simile a quello dei ratti sottoposti a dieta standard. Inoltre, anche l'insorgenza di ipertrigliceridemia e statosi epatica, fenomeni patologici associati ad una prolungata dieta ricca di grassi, sembra essere prevenuta dalla somministrazione di questa iodotironina (*Lanni e coll. 2005*). I suddetti effetti esercitati dalla 3,5- T_2 sembrano essere il risultato di un incremento dell'ossidazione degli acidi grassi a livello dei mitocondri epatici, e da una contemporanea riduzione dell'efficienza della trasduzione energetica mitocondriale. L'attivazione dei due processi rende inefficiente l'utilizzo degli acidi grassi stessi.

E' di notevole importanza l'evidenza che la T_2 , quando somministrata a ratti sottoposti per un lungo tempo a dieta iperlipidica, come già detto, previene alcune delle patologie associate al suddetto regime alimentare (ipertrigliceridemia, ipercolesterolemia, statosi epatica), senza però indurre una sindrome clinica correlata ad uno stato tireotossico (*Lanni e coll. 2005*). Tale capacità rende questo ormone un farmaco potenzialmente utilizzabile nella cura dell'obesità e delle patologie ad essa associate ed è perciò di notevole importanza indagare sui meccanismi alla base degli effetti esercitati dalla 3,5- T_2 .

In base a quanto presente finora in letteratura è stato possibile suggerire che la 3,5- T_2 , influenzando in maniera coordinata il metabolismo lipidico e l'efficienza mitocondriale, può incrementare il metabolismo energetico

dell'animale. Tuttavia, bisogna tener presente che la maggior parte degli effetti della 3,5-T₂ sono stati evidenziati a livello dei mitocondri di fegato di ratto. Tale tessuto, tuttavia, contribuisce a circa il 10% del metabolismo dell'animale "in toto" e quindi sembra plausibile che anche altri tessuti siano coinvolti nell'effetto della 3,5-T₂ nel prevenire l'insorgenza dell'obesità e nello stimolare il metabolismo energetico. Tra i vari tessuti il muscolo scheletrico contribuisce per circa il 30% al mantenimento dell'omeostasi energetica dell'animale, infatti esso rappresenta la maggior parte della massa corporea metabolicamente attiva e allo stesso tempo è caratterizzato da una significativa capacità ossidativa mitocondriale. Ho ritenuto quindi interessante analizzare l'effetto della 3,5-T₂ sui mitocondri di muscolo scheletrico in modo da poter avere un quadro più completo di come tale iodotironina possa influenzare il metabolismo energetico.

Ho scelto quindi di analizzare sia effetti cronici che acuti della 3,5-T₂ su animali trattati simultaneamente con propiltiouracile (PTU) ed acido iopanoico (IOPA). Il PTU inibisce la produzione ghiandolare di ormone tiroideo e l'attività della deiodinasi di tipo I mentre l'acido iopanoico inibisce l'attività di tutte le deiodinasi note.

E' stato scelto di somministrare 3,5-T₂ a tale modello animale in quanto esso presenta dei bassi livelli serici e tissutali di 3,5-T₂ (*Moreno e coll. 2002*). Infatti, in tali animali, sia la via che porta alla sintesi dei precursori della 3,5-T₂ quali T₄ e T₃, sia la via che porta alla genesi di 3,5-T₂ a partire dagli stessi precursori, è inibita.

In particolare è stato analizzato l'effetto della 3,5-T₂ sui parametri respiratori di mitocondri isolati da muscolo scheletrico in modo da evidenziare se i mitocondri di tale tessuto siano bersaglio della iodotironina stessa e se la 3,5-T₂ possa influenzare l'efficienza della trasduzione energetica a livello di tali organelli.

Inoltre è stato valutato se gli acidi grassi liberi potessero mediare parte degli effetti della 3,5-T₂ sull'efficienza della trasduzione energetica mitocondriale e se un eventuale incremento dell'utilizzo di lipidi come substrati per le ossidazioni mitocondriali, indotto sempre dalla 3,5-T₂ potesse portare ad un'inefficienza della suddetta trasduzione.

Sempre a livello mitocondriale ho ritenuto interessante studiare anche il meccanismo a breve termine dell'azione della 3,5-T₂ in grado di indurre un incremento della velocità respiratoria. Questi studi sono stati effettuati usando un particolare approccio cinetico: la "top-down elasticity analysis" (*Harper e Brand 1995; Brand 1996; Brand 1997*) che permette l'identificazione di siti di azione di un effettore (nel nostro caso la 3,5-T₂) all'interno di una complessa via metabolica quale la fosforilazione ossidativa.

.

PARTE TEORICA

Trattazione teorica dell'analisi "top-down" dell'elasticità

La "top down elasticity analysis" è un approccio cinetico che permette l'identificazione di siti d'azione di un effettore (3,5-T₂) all'interno di una complessa via metabolica quale, ad esempio, la fosforilazione ossidativa. Essa, contrariamente alla tradizionale analisi bottom-up (metodo che analizza i singoli enzimi di una via metabolica) considera un intero sistema metabolico semplificato in pochi blocchi di reazioni ed analizza le eventuali variazioni cinetiche globali dei blocchi stessi, in seguito all'azione di effettori esterni. Si analizzano in dettaglio solo quei blocchi di reazioni la cui attività risulta essere alterata dall'azione di tali effettori. A questo punto il sistema metabolico in considerazione viene diviso in blocchi di reazioni: quelle che producono un dato intermedio della via metabolica e le reazioni che lo consumano. L'intermedio, in effetti, risulta essere il prodotto metabolico delle reazioni che lo generano e il substrato di quelle che lo consumano; in più, esso costituisce l'unica connessione tra i vari blocchi di reazione. Su tali blocchi viene determinata l'elasticità che essi mostrano alla concentrazione dell'intermedio metabolico (dove per elasticità viene intesa la cinetica della variazione del flusso del sistema metabolico attraverso un blocco di reazione al variare dell'intermedio metabolico del sistema in considerazione). Solo i blocchi di reazione che mostrano una variazione della risposta cinetica, contengono i siti d'azione dell'effettore che sono in grado di far variare il flusso attraverso l'intermedio. In questo modo, l'analisi della risposta cinetica dei singoli blocchi del sistema alla concentrazione dell'intermedio comune permette l'identificazione di quei blocchi di reazioni la cui attività è significativamente alterata dall'effettore esterno.

Se l'effettore stimola il blocco che produce l'intermedio, allora la rappresentazione grafica della concentrazione dell'intermedio in funzione della velocità di reazione del blocco, ottenuta in assenza dell'effettore, non sarà sovrapponibile a quella ottenuta in presenza dell'effettore stesso. Ad ogni velocità di reazione, la concentrazione dell'intermedio sarà maggiore in presenza dell'effettore che in sua assenza. Se l'effettore stimola il blocco che consuma l'intermedio, le suddette rappresentazioni grafiche, ottenute in presenza dell'effettore ed in sua assenza, ancora una volta non risulteranno sovrapponibili: ad ogni velocità del blocco di reazione, infatti, la concentrazione dell'intermedio risulterà minore in presenza dell'effettore che in sua assenza. L'elasticità di un blocco di reazioni può essere misurata in maniera relativamente semplice, attraverso piccole inibizioni o stimolazioni di una delle branche del sistema metabolico e misurando, poi, la dipendenza del flusso del sistema dal metabolita di connessione, senza aver bisogno di fare assunzioni sul tipo e sul meccanismo d'inibizione delle varie branche (*Brown e coll. 1990*).

Approccio sperimentale alla "top down elasticity analysis"

Nel caso della respirazione mitocondriale in mitocondri isolati, l'intermedio metabolico considerato è la differenza del potenziale elettrico misurato ai capi della MMI ($\Delta\Psi$).

I mitocondri producono il $\Delta\Psi$ pompando i protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrane attraverso la MI durante il trasporto degli elettroni. Il $\Delta\Psi$ è quindi prodotto dalle vie metaboliche che ossidano il substrato, mentre è consumato dalla proton leak (insieme delle reazioni che comprendono il passaggio dei protoni attraverso la membrana interna ed il ciclo dei cationi) e dal sistema di fosforilazione (cioè le reazioni coinvolte nella sintesi e nell'esporto dell'ATP); la

inibitori delle deidrogenasi specifiche o della catena di trasporto elettronica (*Hafner e coll., 1988*). Per determinare la cinetica del sistema di fosforilazione bisogna permettere ai mitocondri di effettuare la fosforilazione di ADP ad ATP (aggiungendo nel mezzo ADP) e inibendo l'attività di ossidazione dei substrati con inibitori delle deidrogenasi specifiche o della catena di trasporto elettronica.

Discriminazione tra proton leak e redox slip

Quando in condizioni sperimentali, si effettua una titolazione dello stato 4 della respirazione, con un inibitore della catena di trasporto elettronica, si ottiene una relazione non lineare tra la velocità respiratoria e la forza proton motrice $\Delta\Psi$ (fig.10)

Osservando la figura si nota la presenza di una relazione lineare per intervalli di $\Delta\Psi$ compresi tra 0 e 120 mV circa, e quindi la membrana interna mitocondriale si comporta come un conduttore che segue la legge di Ohm.

La relazione diventa invece, non lineare, per valori di $\Delta\Psi$ superiori a 120 mV (regione non Ohmica del grafico).

Per spiegare questa non linearità sono stati proposti 4 modelli, ognuno dei quali sottende differenze radicali nel meccanismo della traslocazione protonica:

- Il primo modello ipotizza un aumento della conduttanza protonica mitocondriale (proton leak) ad alti valori del $\Delta\Psi$, mentre il numero dei protoni pompato dalla catena respiratoria, per ossigeno consumato (H^+/O), rimane costante.
- Il secondo modello propone, invece, un aumento della redox slip ad alti valori del $\Delta\Psi$, assumendo costante la proton leak.

Per redox slip si intende il flusso di elettroni lungo la catena di trasporto, non accoppiato al pompaggio dei protoni dalla matrice allo spazio intermembrane. Ciò comporta una diminuzione del rapporto (H^+/O).

- Il terzo modello ipotizza un incremento delle proton leak quando la velocità del trasferimento elettronico diventa elevata, quindi ad alti valori del consumo di ossigeno.
- Il quarto modello propone un aumento della redox slip quando i complessi della catena respiratoria presentano un'attività elevata.

Brand e collaboratori (1994) hanno creato un modello che permette di valutare se la respirazione mitocondriale basale (Stato4) dipende dalle proprietà fisiche della membrana come conduttore protonico, o dall'efficienza delle pompe protoniche in essa contenute. La logica sperimentale è la seguente.

La molecola di FCCP, agendo da traslocatore protonico attraverso la membrana, disaccoppia la fosforilazione ossidativa. Aggiungendo FCCP ai mitocondri isolati si ottiene un aumento della conduttanza protonica della membrana mitocondriale interna. Tale aumento dipende solo dalla concentrazione del disaccoppiante ed è indipendente dal $\Delta\Psi$, qualunque sia il suo valore. In altre parole, il flusso protonico catalizzato dall'FCCP, dipende linearmente dal potenziale, è perciò di natura Ohmica.

E' possibile valutare la relazione tra la velocità respiratoria J_o e il $\Delta\Psi$ in mitocondri isolati, in cui è inibita la capacità fosforilante, sia in assenza che in presenza di basse concentrazioni di FCCP.

In effetti, in presenza del disaccoppiante si riscontra un incremento della respirazione (ΔJ_o), atto a bilanciare l'extra flusso protonico diretto verso la matrice e catalizzato dall'FCCP stesso (Fig.11)

Se la leak o la slip endogena dipendono solo dal $\Delta\Psi$ (modello 1 e 2), tutta l'extra respirazione (ΔJ_o), misurata in presenza di FCCP, ad un dato valore di $\Delta\Psi$, deve riflettere il flusso protonico catalizzato dal disaccoppiante e quindi la relazione ΔJ_o in funzione di $\Delta\Psi$ deve essere di tipo Ohmico (modello 1).

Una relazione non lineare, invece, indica una diminuzione del rapporto (H^+/O) e quindi una redox slip (modello 2).

Si può anche valutare l'eventuale dipendenza della leak e dalla slip dal trasferimento elettronico (modelli 3 e 4), valutando l'incremento della respirazione ai vari $\Delta\Psi$ utilizzando diverse concentrazioni di FCCP.

Allo stato stazionario, il flusso dei protoni verso la matrice ΔI_{H+in} , risulta essere uguale al flusso verso lo spazio intermembrane, ΔI_{H+out} .

Il valore di ΔI_{H+out} può essere ricavato conoscendo la variazione del consumo di ossigeno ΔJ_o , dovuto alla presenza di FCCP ed il valore del rapporto (H^+/O), ossia dei protoni pompati verso lo spazio intermembrane per ogni atomo di ossigeno consumato.

$$\Delta I_{H+in} = \Delta I_{H+out}$$

$$\Delta I_{H+out} = \Delta J_o \cdot H^+/O$$

Poiché il flusso protonico catalizzato dall'FCCP è di natura Ohmica, potremo scrivere:

$$\Delta I_{H+} = \Delta\Psi \cdot C^{FCCP}$$

Da cui:

$$\Delta J_o \cdot H^+/O = \Delta\Psi \cdot C^{FCCP}$$

Riarrangiando si ottiene:

$$\Delta J_o = \frac{\Delta\Psi \cdot C^{FCCP}}{H^+/O}$$

La conduttanza indotta dall'FCCP (C^{FCCP}) non è un valore noto, ma dipende linearmente dall'FCCP presente, cioè, il rapporto $C^{FCCP}/[FCCP]$ è costante.

Quando vengono usate diverse concentrazioni di FCCP, i risultati possono essere paragonati dopo normalizzazione con FCCP. Ciò si ottiene dividendo entrambi i membri dell'equazione (1) per $[FCCP]$. Si otterrà:

$$\frac{\Delta J_o}{[FCCP]} = \frac{\Delta \Psi \cdot C^{FCCP}}{[FCCP] H^+/O}$$

Cioè

$$\frac{\Delta J_o}{[FCCP]} = \frac{\Delta \Psi \cdot \text{costante}}{H^+/O}$$

Rappresentando su assi cartesiani, la relazione $\Delta J_o/[FCCP]$ in funzione di $\Delta \Psi$, si otterrà un grafico che passerà per l'origine con pendenza inversamente proporzionale ad H^+/O .

Se il rapporto H^+/O rimane costante al variare del $\Delta \Psi$, cioè se la relazione iniziale $\Delta J_o/\Delta \Psi$ è dovuta interamente ad un cambiamento della conduttanza protonica (modello1), il grafico ΔJ_o in funzione del $\Delta \Psi$ darà una linea retta passante per l'origine.

Se il rapporto H^+/O varia, in particolare diminuisce al variare del $\Delta \Psi$ (modello 2), il grafico risultante sarà una curva la cui pendenza aumenta all'aumentare del $\Delta \Psi$.

Si può perciò sperimentare l'ipotesi che leak e slip dipendono solo da $\Delta \Psi$ e sono indipendenti dal turnover delle pompe.

Se la proton leak dipende da J_o (modello 3), la conduttanza protonica totale sarà più alta di quella tipica ad una data concentrazione di FCCP e le pendenze delle curve aumenteranno con la concentrazione di FCCP. Se la redox slip dipende da J_o (modello 4), il rapporto H^+/O sarà più basso che ad alte concentrazioni di FCCP e le curve saranno più ripide.

Perciò, l'ipotesi che leak o slip dipendano solo da $\Delta \Psi$ sarà convalidata se i risultati ottenuti con concentrazioni diverse di FCCP si sovrapporranno.

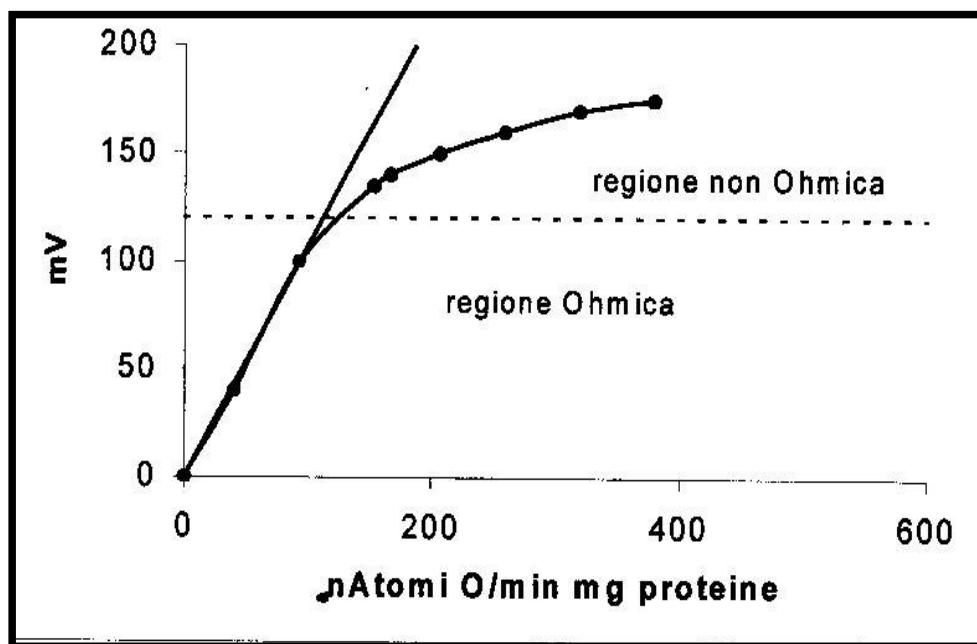


Fig. 10. Titolazione con malonato dello stato 4 della respirazione mitocondriale. Per intervalli di $\Delta\Psi$ compresi tra 0 e 120 mV circa la relazione risulta lineare (regione Ohmica) e quindi la MMI si comporta come un conduttore che segue la legge di Ohm. Per valori di $\Delta\Psi > 120\text{mV}$ la relazione diventa non lineare (regione non Ohmica)

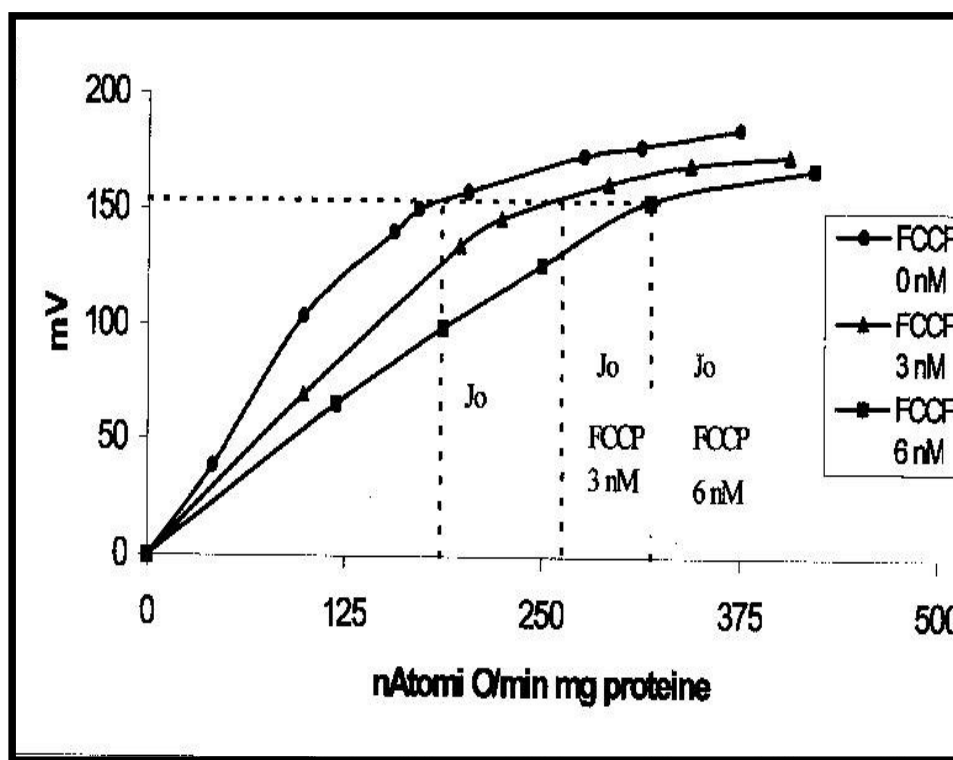


Fig. 11. Titolazione con malonato dello stato 4 della respirazione mitocondriale ottenuta in assenza e in presenza di 3 nM FCCP e 6 nM FCCP.

PARTE SPERIMENTALE

Animali

Gli esperimenti sono stati compiuti utilizzando ratti Wistar maschi di peso corporeo di circa 250-300 g, alimentati con mangime commerciale (Charles River, Lecco Italia) ad libitum, stabulati a 28°C con un ciclo di luce artificiale di 12 ore e tenuti uno per gabbia.

Per i nostri esperimenti gli animali sono stati divisi in quattro differenti gruppi:

- 1) ratti normali (N);
- 2) ratti resi ipotiroidei mediante la somministrazione giornaliera di PTU (1mg/100g di peso corporeo) e iniezione settimanale di IOPA (6mg/100g di peso corporeo) per quattro settimane (P+I);
- 3) ratti ipotiroidei a cui veniva iniettata T₂ (25µg/100g di peso corporeo) durante l'ultima settimana di trattamento (P+I+T₂).
- 4) ratti ipotiroidei ai quali è stata somministrata 3,5-T₂ alla dose di 25 mg-3,5-T₂/100g peso corporeo, un'ora prima del sacrificio (P+I+T₂ 1h).

Prima di essere sacrificati mediante decapitazione, gli animali sono stati anestetizzati tramite somministrazione di cloralio idrato (40mg/100g peso corporeo).

Preparazione dei mitocondri

I mitocondri sono stati isolati dal muscolo scheletrico (tibiale anteriore e gastrocnemio).

I tessuti, precedentemente sminuzzati, sono stati omogeneizzati con un potter Evehjem (4 colpi al minuto) in 10 volumi di soluzione di isolamento a pH 7.4, composta da: mannitolo 220mM, saccarosio 70mM, Tris-HCl 20mM, EDTA 1mM, EGTA 5mM. All'omogenato è stata aggiunta protease (Nagarse) (1mg/g tessuto), che è stata fatta agire

per 4 minuti, al termine dei quali l'omogenato è stato centrifugato a 700 x g per 10 min ed il supernatante ottenuto è stato trasferito in un tubo pulito e centrifugato a 8000 x g per 10 min. Il pellet mitocondriale risultante è stato, infine, lavato due volte e risospeso nel minimo volume di soluzione di isolamento. Tutti i passaggi sopra descritti sono stati eseguiti ad una temperatura di 4°C, in modo da impedire la degradazione dei mitocondri.

Determinazione del contenuto proteico mitocondriale

Per questa determinazione è stato utilizzato il metodo di *Hartree (1972)* che consiste in una modifica del metodo di Lowry, ossia in un aumento della concentrazione di tartato sodio-potassico e delle temperature utilizzate, in modo da ottenere una curva di taratura che si approssima ad una retta. Questo metodo, inoltre, combina la reazione di biureto con quella di Folin-Ciocalteu per ottenere una maggiore sensibilità. Il colore che si sviluppa dipende dagli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico, che si riducono a blu di tungsteno e di molibdeno per opera del complesso Cu^{2+} proteina, dalla tirosina e dal triptofano in ambiente alcalino. Le preparazioni mitocondriali sono state diluite 1:25 con acqua distillata e a 100µl di ciascuna diluizione sono stati aggiunti 0,9ml di soluzione "A". Tale soluzione è costituita da 2g di Tartrato sodio-potassico + 100g di NaCO_3 sciolti in 500ml di NaOH 1N e portati ad 1 litro con acqua distillata. I campioni così ottenuti sono stati incubati a 50°C per 10 minuti, quindi, sono stati prelevati e lasciati raffreddare a temperatura ambiente. Ad ognuno di essi sono stati, poi, aggiunti 0,1ml di soluzione "B" (2g di Tartrato sodio-potassico + 1g di $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sciolti in 90ml di acqua distillata aggiungendo 10ml di NaOH 1N) ed è stata effettuata un'incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti. Infine sono stati aggiunti 3 ml di soluzione "C" (1ml di Folin-Ciocalteu diluito con 15ml

di acqua distillata) ed i campioni sono stati reincubati a 50°C sotto agitazione per 10 minuti. Una volta raffreddati è stata letta la loro assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 650 nm contro il relativo bianco contenente tutte le soluzioni escluso la diluizione della preparazione mitocondriale. Come standard è stata usata albumina di siero bovino alla concentrazione di 40µg / ml.

Determinazione delle variabili respiratorie

La determinazione del consumo di ossigeno della sospensione mitocondriale è stata misurata polarograficamente mediante l'elettrodo ad ossigeno di Clark. Le misure sono state condotte a 37°C in un volume finale di 0,5ml di una soluzione composta da: KCl 80mM, Hepes 50mM (pH 7.0), EGTA 1mM, K₂HPO₄ 5mM, MgCl₂ 5mM, rotenone 4µM. Si incubano i mitocondri con questa soluzione e si aggiunge successivamente succinato 6mM e ADP 120mg/ml, per determinare rispettivamente la velocità dello stato 4, o stato non fosforilante della respirazione, e dello stato 3, o stato fosforilante della respirazione. Il Rapporto del Controllo Respiratorio (RCR, velocità dello stato 3 diviso velocità dello stato 4) è stato calcolato in accordo con il metodo di Estabrook.

Determinazione delle risposte cinetiche della proton leak, del sistema di ossidazione dei substrati e del sistema di fosforilazione in funzione del $\Delta\Psi$

Per la determinazione della variazione cinetica della proton-leak e del sistema di ossidazione dei substrati in funzione di una variazione del $\Delta\Psi$, il potenziale di membrana e la velocità di respirazione sono stati misurati simultaneamente nella stessa sospensione mitocondriale alla temperatura di 37°C in un buffer di respirazione a pH 7 composto da:

KCl 80mM, HEPES 50mM (pH 7.0), EGTA 1mM, K₂HPO₄ 5mM, MgCl₂ 5mM con aggiunta di rotenone 4μM, oligomicina 1μg /ml e nigericina 80 ng / ml. Come substrato per la respirazione è stato utilizzato succinato (5mM). La presenza di oligomicina nel mezzo consente l'inibizione dell'ATPasi e quindi del flusso protonico attraverso di esso. La presenza di rotenone permette l'inibizione del complesso I della catena di trasporto degli elettroni; ciò permette lo scorrimento degli elettroni donati dal FADH₂ (prodotto dall'ossidazione del succinato nel ciclo di Krebs) al secondo sito della catena verso l'ossigeno. La nigericina è uno scambiatore K⁺/H⁺; la sua presenza permette di annullare la differenza di pH ai capi della membrana mitocondriale interna. Ciò consente di esprimere l'intera forza protonmotrice (Δp) che agisce sui protoni stessi (Δp= ΔΨ+ΔpH) come ΔΨ.

La determinazione del consumo di ossigeno per la misurazione della proton-leak è stata eseguita polarograficamente con l'elettrodo ad ossigeno di Clark, mentre il ΔΨ è stato misurato mediante un elettrodo sensibile al trifenilmetilsolfonio (TPmP⁺). L'elettrodo sensibile al TPmP⁺ permette di misurare in una soluzione l'attività dello ione stesso. Quando il TPmP⁺ è aggiunto ad una sospensione mitocondriale, essendo carico, si distribuisce all'interno e all'esterno del mitocondrio secondo il valore del ΔΨ. Allo stato stazionario, quando il valore del ΔΨ risulta essere costante, il TPmP⁺ si distribuisce in modo tale che il potenziale elettrochimico dello ione all'interno ed all'esterno della matrice sia uguale. In questa situazione, quindi, il TPmP⁺ segue la legge dell'equilibrio di Nerst:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{nF} \ln \frac{TPmP^+_{int}}{TPmP^+_{out}}$$

dove il $TPmP^{+int}$ rappresenta la concentrazione dello ione all'interno della matrice che è libero di diffondere, mentre $TPmP^{+out}$ rappresenta la concentrazione dello ione all'esterno dei mitocondri. In effetti, l'elettrodo è in grado di misurare il valore del $TPmP^{+out}$. Il $TPmP^{+int}$ può facilmente essere ricavato sottraendo dalla quantità totale dello ione aggiunto alla sospensione mitocondriale il $TPmP^{+out}$. La sensibilità dell'elettrodo al $TPmP^{+}$ è stata calibrata aggiungendo progressivamente, ad 1ml di soluzione, 1 μ l di $TPmP^{+}$ per quattro volte (volume finale di 4 μ l). Poiché solo il 40% del $TPmP^{+}$ è in grado di disporsi liberamente all'equilibrio, è stato applicato un fattore di correzione 0,4.

Per la determinazione della risposta cinetica del sistema di ossidazione dei substrati al $\Delta\Psi$, questo veniva variato incrementando l'attività delle reazioni che comportano la sua dissipazione. A tale scopo, la respirazione è stata titolata con successive aggiunte di un disaccoppiante quale FCCP (0-6 nM) al mezzo di incubazione.

Per la determinazione della risposta cinetica della proton leak al $\Delta\Psi$, il $\Delta\Psi$ stesso è stato variato inibendo l'attività delle reazioni che comportano la sua genesi. A tale scopo, la respirazione è stata titolata con successive aggiunte di malonato, un inibitore della succinico deidrogenasi, competitore con il succinato. In tal modo viene variata la disponibilità degli elettroni per la catena di trasporto e quindi si ha una riduzione del $\Delta\Psi$.

Per valutare la risposta cinetica mostrata dal sistema di fosforilazione a cambiamenti del $\Delta\Psi$ nei mitocondri fosforilanti, al mezzo di incubazione è stata aggiunta una quantità saturante di ADP (600 μ M). La velocità di respirazione dello stato 3 è stata inibita da aggiunte sequenziali di malonato (fino a 0,25 mM) ed è stato sottratto il valore della velocità di respirazione per la proton leak.

Determinazione della velocità di β -ossidazione mitocondriale

La velocità dell'ossidazione degli acidi grassi è stata misurata polarograficamente mediante l'utilizzo dell'elettrodo di Clark alla temperatura di 30°C in un volume finale di 0.5 ml di una soluzione contenente: 80 mM di KCl, 50 mM di Hepes (pH 7), 1mM di EGTA, 5mM di K₂HPO₄, BSA (1%), 2.5 mM di malato e 40 μ M di palmitoil-carnitina in presenza di ADP (120 μ g/ml).

Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio-dodecilsolfato (SDS-PAGE)

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide è eseguita secondo il metodo di Laemmli per la realizzazione di gel discontinui (*Laemmli 1970*).

Questa metodica prevede la preparazione di due tipi di gel:

- *stacking gel* (per il caricamento dei campioni);
- *separating gel* (per la separazione delle proteine).

La preparazione dello stacking gel è eseguita utilizzando:

- TRIS 0.125 M
- SDS 0,1 % pH 6.8
- miscela di acrilammide 4%, TEMED 0,1%, ammonio persolfato 0.05%.

Il separating gel è preparato utilizzando:

- TRIS 0.375 M
- SDS 0,1 % pH 8.8
- miscela di acrilammide 13%, TEMED 0,1%, ammonio persolfato 0.05%.

La preparazione di questi gel prevede che venga versata prima la miscela di separating gel per la separazione delle proteine, e, dopo la sua polimerizzazione, si effettua il versamento della miscela di stacking gel per il caricamento dei campioni.

I campioni proteici (costituiti da 30 µg di lisato mitocondriale) che sono caricati nei pozzetti, sono diluiti nella soluzione costituita da:

- TRIS 50 mM
- DTT 10 mM
- Glicerolo 10%
- SDS 2 %
- Blu di bromofenolo 0.001% pH 6.8

Prima di essere caricati sul gel i campioni sono riscaldati a 95° C per 5 minuti.

La corsa è effettuata a 200V per 1h, utilizzando come tampone una soluzione costituita da:

- TRIS 25 mM
- Glicina 192 mM
- SDS 0.1 % pH 8.6

Analisi delle proteine mediante Western blot.

Utilizzando un voltaggio di 100 V per 45 minuti il materiale proteico risultante dalla separazione mediante elettroforesi è stato trasferito su una membrana di nitrocellulosa in un tampone di trasferimento contenente: TRIS 16.5mM, glicina 150 mM pH 8.3, metanolo 20%. Al termine del trasferimento, la membrana è stata asciugata all'aria per 15 minuti al fine di rimuovere il metanolo.

La membrana è stata lavata per 5 minuti nel tampone PBS-tween così composto: PBS 1x, Tween 20 0.1%. (il PBS 1X si ottiene diluendo 1:10 il PBS 10X: NaCl 1.37M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 0.1 M, KH₂PO₄ 18mM). Per ottenere il blocco di siti aspecifici tra la nitrocellulosa e le proteine, la membrana è stata incubata a temperatura ambiente per 1 ora in una soluzione

di PBS-tween e agente bloccante (latte 5%). Successivamente il filtro è stato incubato tutta la notte a 4°C con 1µg/ml di anticorpo primario (anticorpo policlonale rabbi anti-Human UCP 3; Chemicon International, Inc) nel tampone che contiene PBS-tween-latte 2%. In seguito per allontanare l'anticorpo legato in modo aspecifico, la membrana è stata sottoposta a 4 lavaggi di 15 minuti ognuno, col tampone PBS-tween. Terminati i lavaggi, il filtro è stata incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario appropriato (Goat anti rabbit), coniugato con l'enzima perossidasi (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) diluito 1:5000 in PBS-tween e latte 5%. Anche questa volta, per allontanare l'anticorpo secondario legato in modo aspecifico, la membrana ha subito quattro lavaggi da 15 minuti ognuno con PBS-tween.

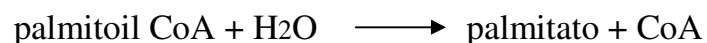
Per rilevare il segnale della proteina è utilizzata la reazione di chemiluminescenza effettuata con un mix di incubazione composto da:

- 5 ml di luminoso 1,25 mM
- 50 µl di acido cumarico 6.8.mM
- 15 µl di H₂O₂ 3%.

Il filtro incubato con questo mix per 1 minuto e successivamente esposto con una lastra per autoradiografia in cassette radiografiche a temperatura ambiente.

Determinazione dell'attività dell'Acil-CoA tioesterasi mitocondriale di tipo I (MTE-I) e del sistema della carnitina palmitoil transferasi (CPT)

MTE-I è un enzima mitocondriale specifico per i tioesteri degli acidi grassi, a lunga catena, con attività massima per il palmitoil-CoA. Essa converte il palmitoil CoA in palmitato secondo la seguente reazione:



La sua attività è stata misurata con il metodo spettrofotometrico, che è basato sul rilascio di CoA dai tioesteri dell'acil-CoA, che, inducendo la riduzione dell'acido 5,5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB) ad acido 5-tio-2-nitrobenzoico, determina lo sviluppo del colore giallo. La reazione è stata eseguita secondo la metodica di *Alexson e Nedergaard (1988)*, incubando mitocondri trattati con triton X-100 in: Hepes 75mM pH 7.5, EDTA 10mM, BSA 10mg/ml, palmitoil-CoA 2,5mM, DTNB 3mM. Tutte le provette contenenti le soluzioni sono state incubate per almeno 3 minuti a 35°C prima di aggiungere il palmitoil-CoA. La concentrazione dei tioli rilasciati viene calcolata dal coefficiente di estinzione molare, $E_{412nM} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dopo aver corretto per la reazione aspecifica dei gruppi sulfridilici di proteina con DTNB e per l'idrolisi non specifica del palmitoil-CoA.

La stessa incubazione sopra descritta se effettuata in presenza di carnitina (5mM) permette di valutare il rilascio di CoA dipendente sia dall'attività di MTE I sia dal sistema carnitina palmitoil transferasi. A tale scopo il rilascio di CoA è stato valutato sia in assenza che in presenza di carnitina. Sottraendo dal rilascio di CoA ottenuto in presenza di carnitina (CPT + MTE) quello ottenuto in assenza di carnitina (MTE) si ottiene l'attività del sistema CPT.

Analisi statistiche

L'analisi statistica è stata ottenuta mediante l'analisi della varianza seguita da Student-Newman-Keuls, test per la multicomparazione dei dati.

RISULTATI

Attività della deiodinasi di tipo I e di tipo II

Il trattamento con PTU e IOPA è risultato efficiente nell'indurre un severo stato di ipotiroidismo come evidenziato dai livelli serici di T₃ e dall'attività degli enzimi deiodinasi (tabella 1) che risultano inibiti rispetto agli animali eutiroidei. La somministrazione di 3,5-T₂ ad animali ipotiroidei non ha effetto significativo sui livelli serici di T₃, ed allo stesso tempo non influenza l'attività degli enzimi deiodinasi.

Tabella 1

	N	P+I	P+I+T₂
T₃ (nM)	0.91±0.24*	0.12±0.06	0.13±0.02*
D1 (pmol I/min mg prot)	210±10*	22±2	23±3*
D2 (fmol I/h mg prot)	45±5*	13±1	14±1*

Livelli serici di T₃ ed attività delle deiodinasi di tipo I e di tipo II.

I valori riportati sono la media ± ES di 5 differenti esperimenti. *P<0,05 vs P+I.

Effetto della somministrazione cronica di T₂ ad animali ipotiroidei sui parametri respiratori dei mitocondri di muscolo scheletrico.

La tabella 2 mostra l'effetto della somministrazione cronica della T₂ ad animali ipotiroidei sui parametri respiratori mitocondriali. I mitocondri isolati da animali ipotiroidei (P+I) mostrano una velocità respiratoria più bassa rispetto a quella degli animali di controllo. La somministrazione di T₂ a ratti ipotiroidei (P+I+T₂) riporta la velocità respiratoria a valori non significativamente differenti da quella dei ratti di controllo. Le percentuali di variazione sono simili sia quando i mitocondri respirano in Stato 4 (respirazione in cui non si verifica la fosforilazione di ADP ad ATP) sia quando respirano in Stato 3 (respirazione in cui la fosforilazione di ADP ad

ATP si verifica alla massima velocità). Infatti i mitocondri isolati da animali P+I+T₂ mostrano un incremento in entrambi gli stati della respirazione di circa il 72% rispetto ai mitocondri isolati dai ratti P+I.

Conseguentemente il rapporto di controllo respiratorio (RCR), ottenuto appunto dal rapporto tra stato 3 e stato 4 della respirazione mitocondriale, non risulta influenzato dalla T₂.

Tabella 2

	N	P+I	P+I+T₂
Stato 4 (nmoli O/min mg proteine)	100±5*	64±2	110±4*
Stato 3 (nmoli O/min mg proteine)	400±12*	250±15	430±10*
RCR	4±0,2	3,9±0,2	3,9±0,2

Parametri respiratori di mitocondri di muscolo scheletrico di animali isolati da ratti eutiroidi (N) ipotiroidei (P+I) ed ipotiroidei trattati con T₂ (25 µg/100 g pc per 1 settimana).

I valori riportati sono la media ± ES di 5 differenti esperimenti. *P<0,05 vs P+I

Effetto della somministrazione cronica di T₂ ad animali ipotiroidei sull'efficienza di trasduzione energetica mitocondriale e coinvolgimento degli acidi grassi: valutazione della cinetica della perdita protonica ai capi della membrana mitocondriale interna.

L'effetto della T₂ sull'efficienza della trasduzione energetica mitocondriale è stata determinata in diverse condizioni sperimentali: in presenza di acidi grassi endogeni, in assenza di acidi grassi ed a parità di acidi grassi. Come rappresentato in figura 1, la somministrazione cronica di T₂ a ratti ipotiroidei induce una riduzione della efficienza della traduzione energetica dei mitocondri di muscolo scheletrico, in quanto determina una stimolazione della cinetica della proton-leak. Infatti, mitocondri isolati dal muscolo di ratti

ipotiroidici trattati con T_2 , devono respirare di più rispetto a quelli isolati dal muscolo scheletrico di animali ipotiroidici per mantenere lo stesso potenziale di membrana.

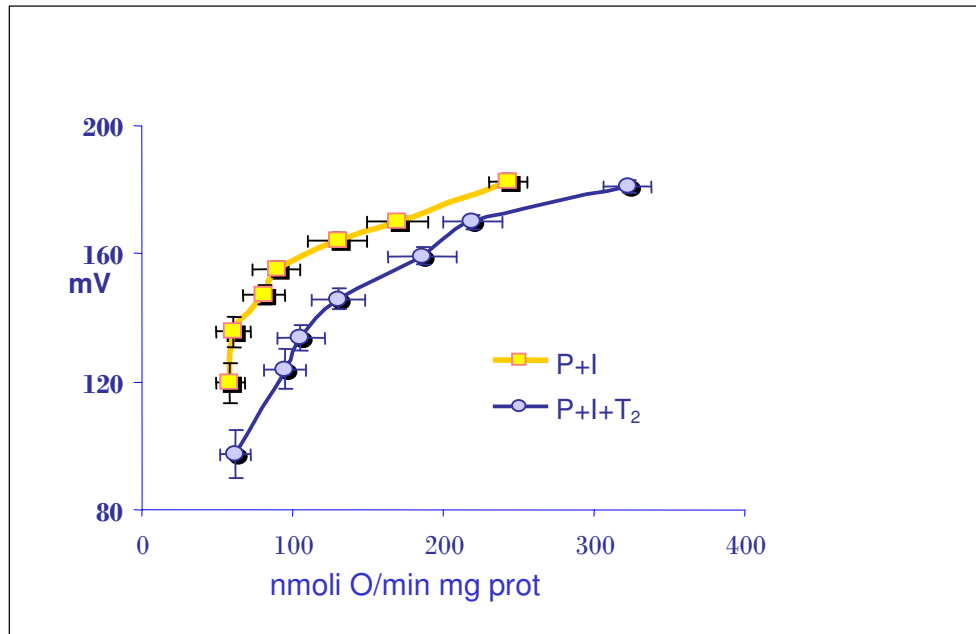


Figura 1. Risposta cinetica della Proton-leak alla variazione del potenziale della membrana mitocondriale interna in assenza di BSA in mitocondri di muscolo scheletrico (i valori sono la media \pm ES di cinque differenti esperimenti).

Quando gli acidi grassi endogeni sono chelati dalla presenza di BSA, non si osservano più differenze nella cinetica della proton leak tra mitocondri di muscolo scheletrico isolati da ratti ipotiroidici e quelli isolati da ratti ipotiroidici trattati con T_2 (fig. 2). Questo indica il coinvolgimento degli acidi grassi nell'effetto della T_2 sull'efficienza mitocondriale.

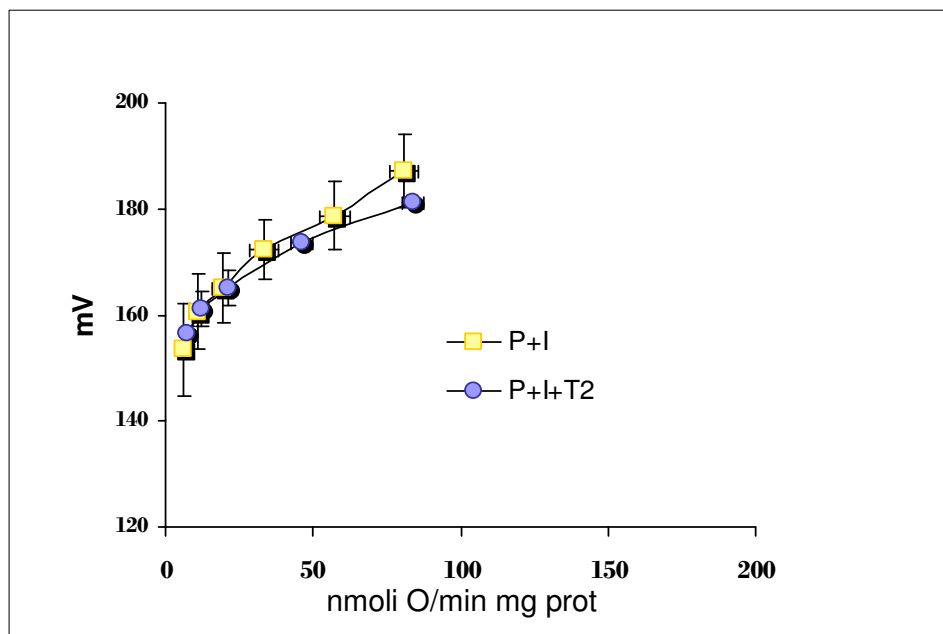


Figura 2. Risposta cinetica della Proton-leak alla variazione del potenziale della membrana mitocondriale interna in presenza di BSA in mitocondri di muscolo scheletrico (i valori sono la media \pm ES di cinque differenti esperimenti).

Quando gli acidi grassi endogeni sono chelati dalla presenza di BSA e viene contemporaneamente aggiunto un acido grasso come l'acido arachidonico, i mitocondri di ratti ipotiroidei trattati con T_2 mostrano un incremento della proton leak rispetto a quelli ipotiroidei (fig. 3). Questo sostiene l'ipotesi di un possibile coinvolgimento degli acidi grassi liberi nell'effetto della T_2 sull'efficienza mitocondriale.

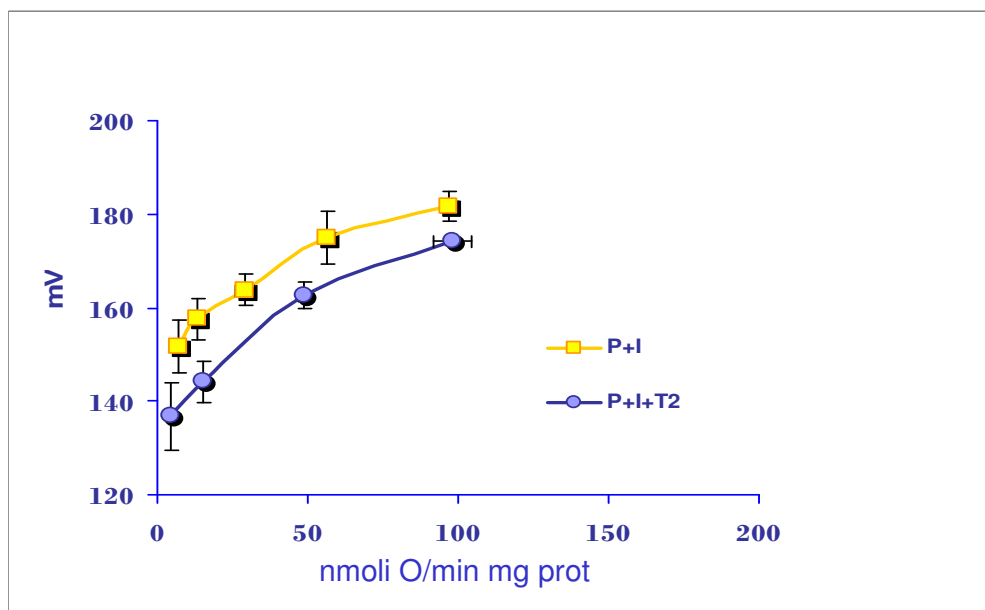


Figura 3. Risposta cinetica della Proton-leak alla variazione del potenziale della membrana mitocondriale interna in presenza di BSA ed acido arachidonico in mitocondri di muscolo scheletrico (i valori sono la media \pm ES di cinque differenti esperimenti).

Livelli proteici di UCP3.

Per determinare se nell'effetto cronico della 3,5- T₂ sulla trasduzione energetica mitocondriale potesse essere coinvolta la proteina disaccoppiante di tipo 3 sono stati esaminati i livelli mitocondriali di tale proteina. Dall'analisi dei livelli di UCP3, determinati mediante Western-blot, nella condizione di ipotiroidismo si riscontra una significativa riduzione della proteina rispetto ai controlli eutiroidei. La somministrazione di 3,5- T₂ ad animali ipotiroidici comporta un incremento dei livelli proteici dell'UCP3 suggerendo che tale proteina sia realmente coinvolta nel disaccoppiamento mitocondriale indotto dalla T₂ (fig. 4).

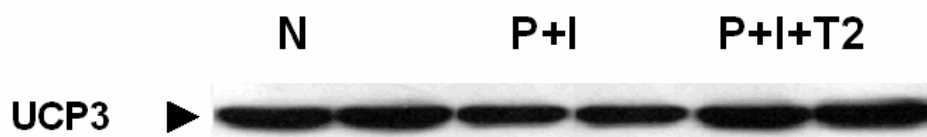


Fig4. livelli proteici mitocondriali di UCP3, determinati mediante Western-blot, in muscolo gastrocnemio di ratti.

Effetto della T₂ sul metabolismo lipidico mitocondriale: valutazione della β -ossidazione mitocondriale dell'attività del sistema di trasporto degli acidi grassi attivati e della tioesterasi mitocondriale.

Poiché generalmente i livelli di UCP3 sono up-regolati in condizioni fisiologiche in cui si verifica un incremento dell'utilizzo di lipidi come substrati per le ossidazioni mitocondriali., è stato valutato l'effetto della T₂ su parametri marker del metabolismo lipidico mitocondriale.

Per quanto riguarda la capacità mitocondriale di utilizzare gli acidi grassi come substrati è stata valutata la velocità massima del consumo di ossigeno, ottenuta quindi in presenza di ADP, quando viene utilizzato come substrato palmitoil-carnitina. I mitocondri isolati dal muscolo gastrocnemio di ratti ipotiroidei mostrano una più bassa capacità di ossidare gli acidi grassi rispetto a quelli di controllo (75 ± 5 nmolO/min mg prot e 100 ± 6 nmoliCoA/min mg prot rispettivamente) (Fig. 5). La somministrazione di T₂ a ratti ipotiroidei induce un significativo incremento dell' 80 % della velocità di ossidazione degli acidi grassi che raggiunge, nel gruppo P+I+T₂, il valore di 134 ± 10 nmoliO/min mg prot.

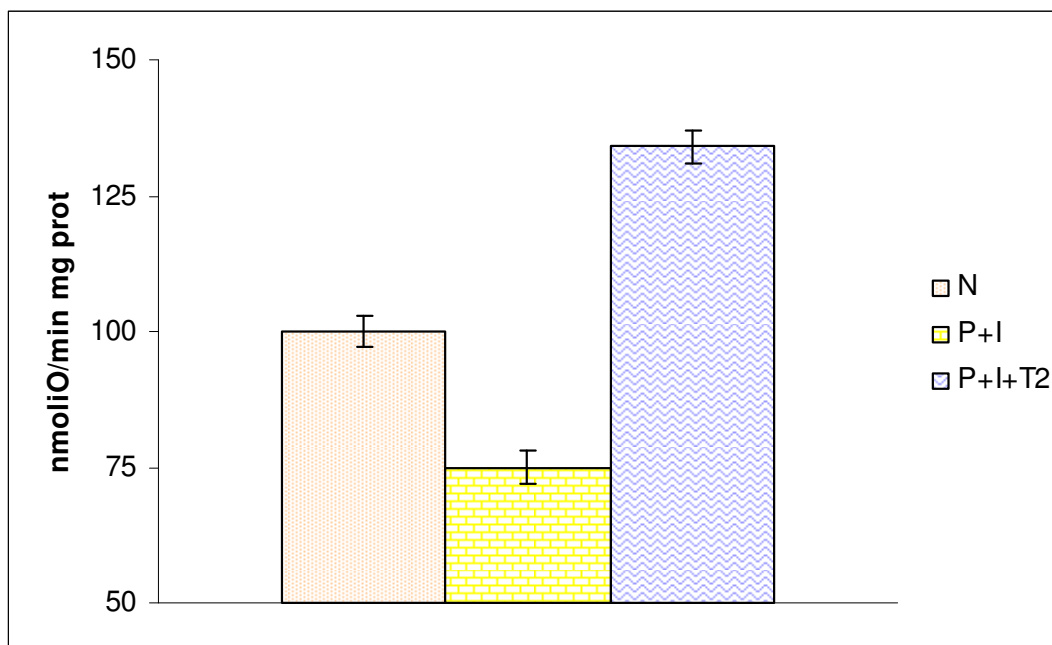


Figura 5. Misura della β -ossidazione dei mitocondri isolati dal muscolo gastrocnemio di ratti. I valori rappresentano la media \pm ES ottenuti utilizzando cinque animali per ogni gruppo sperimentale. Le barre di errore rappresentano l'errore standard e le colonne contrassegnate con l'asterisco indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$.

L'attività del sistema di trasporto degli acidi grassi attivati (Acil-CoA) a lunga catena all'interno dei mitocondri è stata determinata dall'attività del sistema Carnitina-Palmitoil-Transferasi. Come mostrato in figura 6, tra i mitocondri isolati da muscolo di ratti N, P+I, e P+I+ T₂ si evidenzia una differenza significativa dell'attività di CPT: l'ipotiroidismo induce un decremento del 30% nell'attività di CPT rispetto alla condizione eutiroidea. I valori, infatti, risultano essere 15 ± 1 e 20 ± 2 nmoliCoA/min mg prot. rispettivamente negli animali ipotiroidici ed eutiroidici. La somministrazione cronica di T₂ agli animali ipotiroidici riporta tale attività ai valori di controllo.

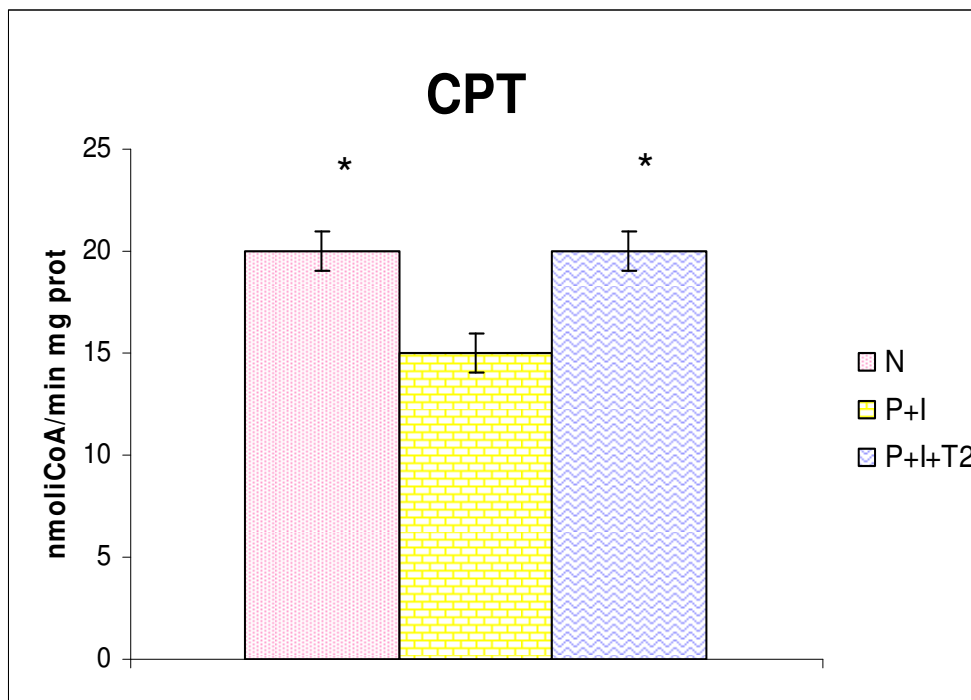


Figura 6. Attività totale della CPT in mitocondri isolati dal muscolo gastrocnemio di ratti. I valori rappresentano la media \pm ES ottenuti utilizzando cinque animali per ogni gruppo sperimentale. Le barre di errore rappresentano l'errore standard e le colonne contrassegnate con * indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$.

Per quanto riguarda l'attività della tioesterasi mitocondriale (MTE-I), un enzima coinvolto nel cosiddetto handling lipidico mitocondriale, esso non è influenzato dall'ipotiroidismo; infatti non sono state riscontrate differenze significative nell'attività enzimatica mitocondri di ratti eutiroidei di controllo e quelli di ratti ipotiroidici (4.7 ± 2 e 4.20 ± 3 nmoliCoA/min mg prot, rispettivamente). L'attività dell'enzima risulta, tuttavia, influenzata dalla somministrazione cronica di T₂ a ratti ipotiroidici che ne determina un incremento dell'84%. Nel gruppo P+I+T₂, infatti, l'attività di MTE-I raggiunge il valore di 7.72 ± 2 nmoliCoA/min mg prot (fig.7).

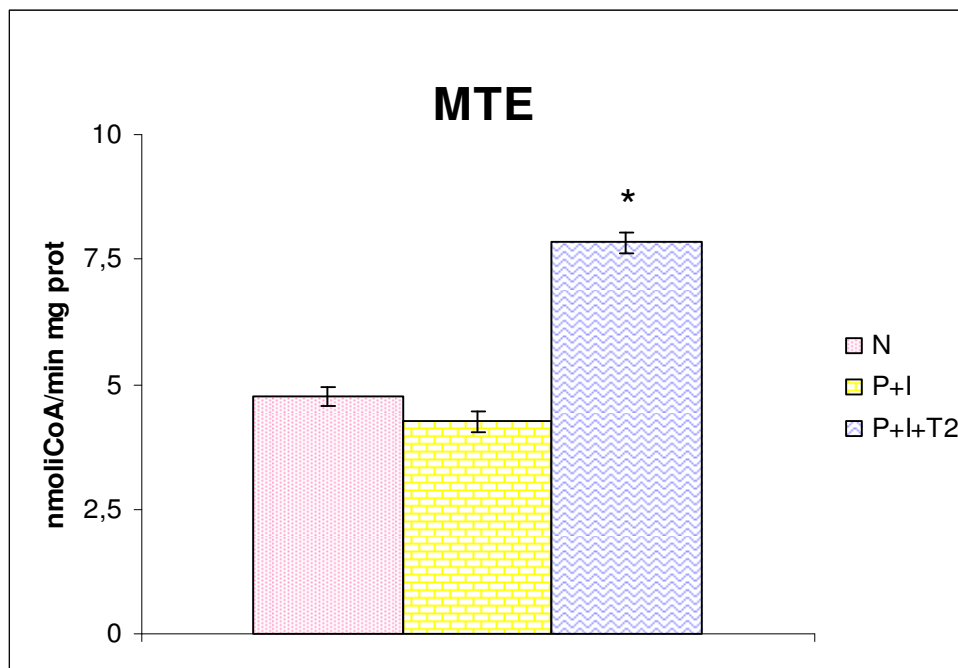


Figura 7. Attività di MTE in mitocondri isolati dal muscolo gastrocnemio di ratti. I valori rappresentano la media \pm ES ottenuti utilizzando cinque animali per ogni gruppo sperimentale. Le barre di errore rappresentano l'errore standard e le colonne contrassegnate con l'asterisco indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$.

Effetto della somministrazione acuta di T_2 ad animali ipotiroidei sui parametri respiratori dei mitocondri di muscolo scheletrico.

Per valutare se la T_2 potesse avere degli effetti rapidi sui mitocondri di muscolo scheletrico, le velocità respiratorie sono state misurate in mitocondri isolati da animali ipotiroidei (P+I) ed animali ipotiroidei che avevano ricevuto, un'ora prima di essere sacrificati, una singola somministrazione T_2 (25 $\mu\text{g}/100$ g bw) (P+I+ T_2 1h).

Le velocità del consumo di ossigeno sono state misurate sia in assenza sia in presenza di acidi grassi endogeni per valutare il loro eventuale coinvolgimento nell'effetto rapido della T_2 sui mitocondri di muscolo scheletrico. A tale scopo, le misure sono state effettuate sia in presenza che in assenza di BSA che, come già precedentemente detto, chela gli acidi grassi endogeni.

Come si può osservare dalla tabella 3, quando i mitocondri dei ratti P+I sono stati incubati in presenza di BSA, le velocità dello Stato 3 e dello Stato 4 erano rispettivamente 405 ± 58 e 85 ± 12 nmoli O/min mg di proteine (RCR=4,8). Quando i mitocondri dei ratti ipotiroidei sono stati incubati in assenza di BSA, la velocità dello stato 3 è di poco modificata, mentre quella dello stato 4 è significativamente più alta, confermando che la presenza di acidi grassi è in grado di stimolare la velocità in cui non si verifica la fosforilazione di ADP ad ATP. Tale fenomeno si riscontra anche nei mitocondri P+I+T₂.

Per quanto riguarda l'effetto rapido della T₂ sui mitocondri di muscolo, in assenza di BSA, ossia in presenza di acidi grassi endogeni, entrambe le velocità del consumo di ossigeno sono incrementate nei ratti P+I+T₂ 1h rispetto ai P+I . Gli incrementi osservati risultano essere del 42% e del 27%, rispettivamente per lo Stato 4 e lo Stato 3. In virtù del simultaneo incremento dei due stati, i valori di RCR non sono significativamente modificati dal trattamento con la diiodotironina.

In presenza di BSA, la T₂ esercita effetti simili sulle velocità dello Stato 3 ma ha un effetto più basso e non significativo sullo Stato 4. Il maggior effetto che la diiodotironina esercita sullo stato 4 in assenza di albumina è indicativo del coinvolgimento degli acidi grassi nell'azione della T₂ sull'inefficienza della trasduzione energetica mitocondriale, in quanto durante lo stato 4 non si verifica la fosforilazione di ADP ad ATP.

Tabella 3

	P+I (-BSA)	P+I (+BSA)	P+I+T₂ 1h (-BSA)	P+I+T₂ 1h (+BSA)
Stato 4 nmoli O/min mg prot	154±17	85±12	218±17	100±16*
Stato 3 nmoli O/min mg prot	360±30	405±58	514±60	514±60*
RCR	2,33±0,1	4,8±0,1	2,35±0,2	5,1±0,1

Effetto della somministrazione acuta di T₂ sui parametri respiratori di mitocondri di muscolo scheletrico valutati in presenza ed assenza di BSA.

I valori riportati sono la media ± ES di 5 differenti esperimenti. *P<0,05 vs P+I

Risposte cinetiche del sistema di ossidazione dei substrati, del sistema di fosforilazione e del sistema di proton leak ai cambiamenti nel potenziale di membrana in mitocondri di muscolo scheletrico isolati da ratti ipotiroidei e ipotiroidei trattati in maniera acuta con 3,5-T₂

Per determinare i sottosistemi possibili bersagli della T₂ dalla cui variazione di attività risulta un incremento della respirazione mitocondriale è stata effettuata l'analisi top-down dell'elasticità descritta nei metodi.

In figura 8 è rappresentata la titolazione con FCCP dello stato 4 della respirazione, cioè la cinetica delle reazioni coinvolte nell'ossidazione dei substrati. Le curve della velocità del consumo di ossigeno a diversi valori del $\Delta\Psi$, ottenute per gli animali ipotiroidei (P+I) e per i ratti ipotiroidei trattati con T₂ (P+I+T₂ 1h) non sono sovrapponibili. Ad ogni potenziale di membrana, infatti, il valore del consumo di ossigeno risulta maggiore in presenza della T₂ rispetto al controllo (P+I). Ciò indica che la iodotironina stimola l'attività dei produttori della forza protonmotrice.

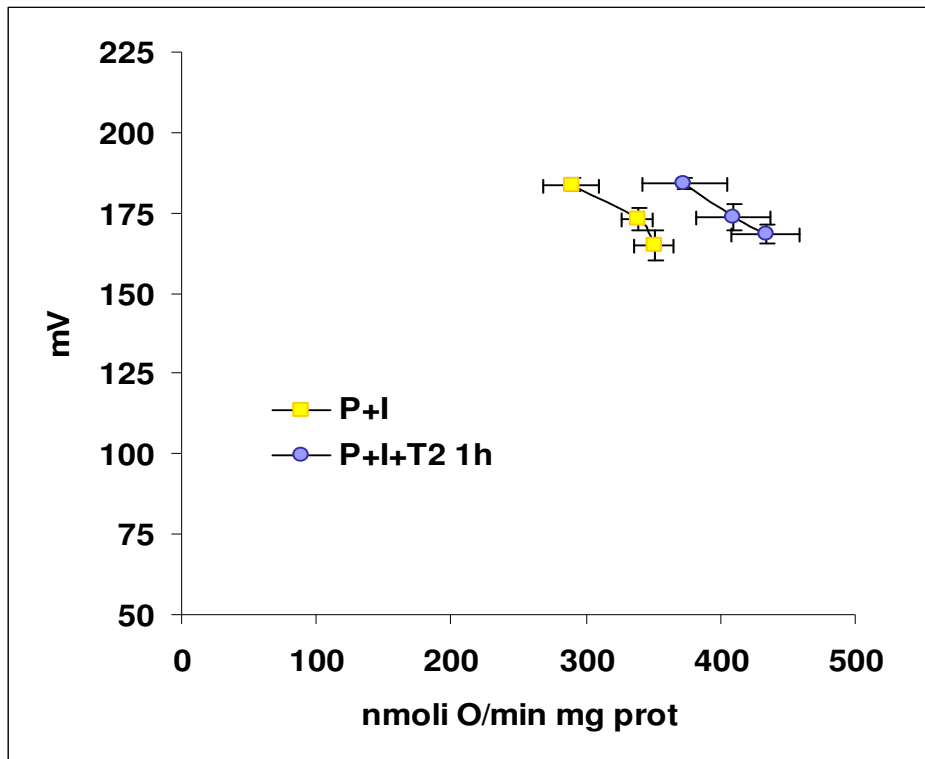


Fig. 8. *Risposta cinetica del sistema di ossidazione dei substrati in funzione delle variazioni del potenziale di membrana in mitocondri di muscolo scheletrico isolati da ratti ipotiroidei e ipotiroidei trattati con T2.*

I valori sono la media \pm ES di 3 differenti esperimenti.

Per quanto riguarda l'attività del sistema di fosforilazione, rappresentato in fig. 9, esso mostra un comportamento diverso dall'attività del sistema di ossidazione dei substrati, infatti le curve relative ai ratti P+I e P+I+T2 1h risultano sovrapposte. Questo suggerisce che il sistema di fosforilazione non è influenzato dalla somministrazione di T2 (Fig. 9).

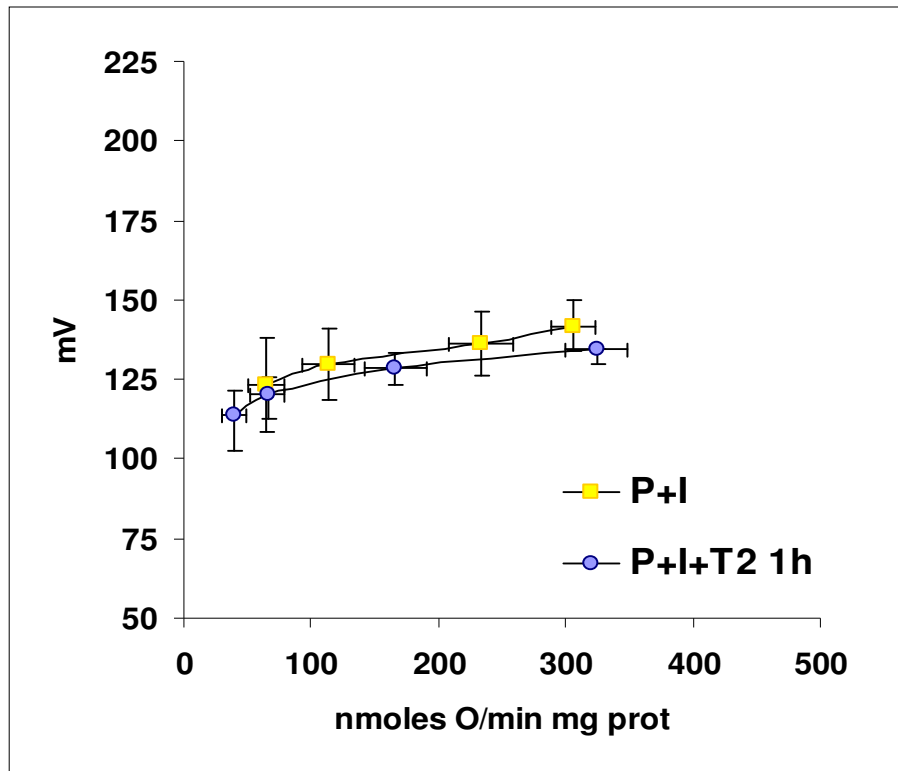


Fig. 9. Risposta del sistema di fosforilazione al variare del $\Delta\Psi$, in mitocondri di ratti ipotiroidei e ipotiroidei trattati con T_2
 I valori sono la media \pm ES di 4 differenti esperimenti.

nmol O/min mg prot

Per determinare se la T_2 induce inefficienza della trasduzione energetica mitocondriale, è stata effettuata la titolazione con malonato dello stato 4 della respirazione mitocondriale sia in animali ipotiroidei sia in animali ipotiroidei trattati con $3,5-T_2$. Tale titolazione, mostrata in figura 10, rappresenta la cinetica delle reazioni che consumano il $\Delta\Psi$ senza che a tale processo sia associata la sintesi di ATP. Le due curve ottenute con la titolazione con malonato non sono sovrapponibili, in particolare la curva relativa ai ratti P+I+ T_2 1h è spostata verso destra rispetto alla curva relativa agli animali ipotiroidei.

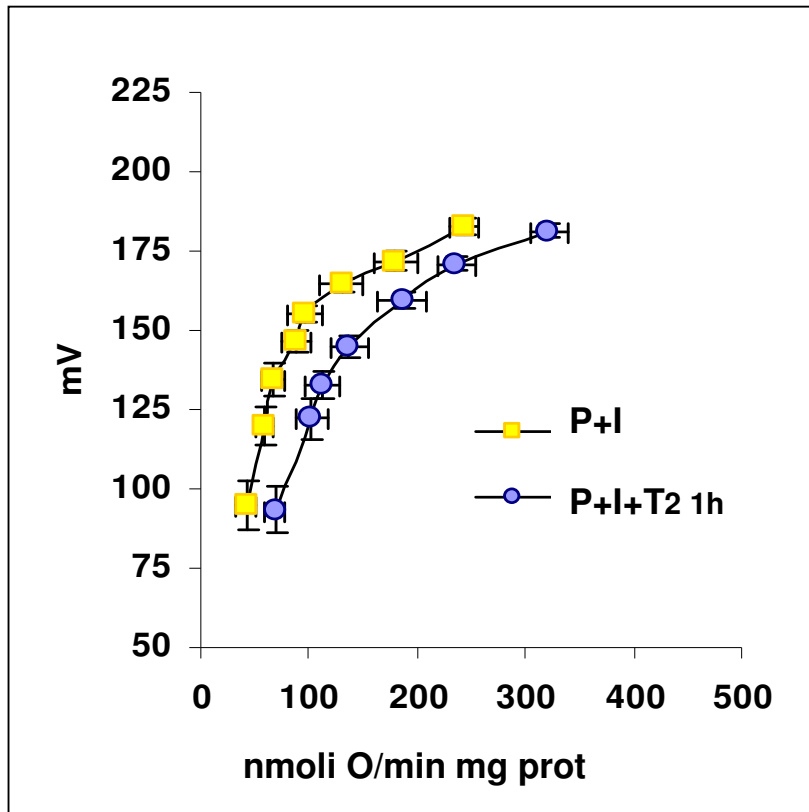


Fig. 10. Risposta cinetica della proton leak alla variazione del potenziale della membrana mitocondriale interna in mitocondri di muscolo scheletrico prelevato da ratti ipotiroidei e ipotiroidei trattati con T₂.

I valori sono la media \pm ES di 9 differenti esperimenti.

Tale risultato indica che la T₂ induce inefficienza della fosforilazione ossidativa. In realtà, due meccanismi alternativi potrebbero essere alla base di questo fenomeno:

- 1) Per mantenere uno stesso potenziale di membrana i mitocondri di animali trattati con T₂ devono respirare di più per bilanciare il flusso di protoni dallo spazio intermembrane verso la matrice; ciò porta ad affermare che la T₂ induce inefficienza della fosforilazione ossidativa attivando i processi di dispersione del gradiente elettrochimico protonico ossia la cosiddetta “proton-leak”
- 2) Per mantenere uno stesso potenziale di membrana i mitocondri trattati con T₂ devono respirare di più in quanto durante il trasferimento di elettroni lungo la catena si verifica un fallimento nel pompaggio protonico cioè un processo che porta ad un decremento del numero di

protoni pompati per molecola di ossigeno consumato (rapporto H+/O). La T₂ quindi potrebbe indurre inefficienza della fosforilazione ossidativa attivando il cosiddetto “redox slip”.

Discriminazione tra il processo di proton leak e di redox slip

Come sopra descritto nonostante i dati ottenuti dalla titolazione con malonato dello stato 4 della respirazione indicano chiaramente che esiste una inefficienza della fosforilazione ossidativa, essi non permettono di asserire se tale processo è il risultato di un incremento della proton leak o del redox slip. Per determinare i meccanismi molecolari che sottendono l'effetto della T₂ sul disaccoppiamento mitocondriale di muscolo scheletrico è stata quindi effettuata una discriminazione tra i due suddetti processi applicando un metodo ideato da *Brand e coll.* (1994) e descritto della parte sperimentale. In effetti tale metodo permette di valutare se durante la titolazione con malonato dello stato 4 si verifica o meno una variazione del pompaggio protonico (misurata come variazione del rapporto H+/O) e se la T₂ possa indurre una variazione di tale rapporto. Tale metodo consiste nel misurare ad ogni potenziale di membrana il valore dell'extrarespirazione indotta dalla presenza di una quantità submassimale di disaccoppiante in modo da ottenere la relazione. $\Delta J_o/FCCP = \Delta p \text{ cost}/H+/O$ [1] (per ulteriori dettagli si rimanda alla parte sperimentale)

La figura 11 mostra la relazione tra respirazione inibita con oligomicina e potenziale di membrana quando viene effettuata una titolazione con malonato realizzata sia in assenza sia in presenza di una piccola quantità submassimale di disaccoppiante FCCP (3 o 6 nM). I dati rappresentati in figura 11A sono relativi ai mitocondri isolati da animali P+I, quelli rappresentati in figure 11B sono relativi ad animali P+I+T₂1h.. Per ottenere la relazione $\Delta J_o/FCCP = \Delta \Psi \text{ cost}/H+/O$ dai suddetti grafici, ad ogni dato potenziale di

membrana ($\Delta\Psi$) è stato estrapolato il valore della extra-respirazione indotta dalla presenza di FCCP (ossia il valore $\Delta J_o/[FCCP]$).

La relazione [1] ottenuta per i mitocondri P+I e P+I+T₂1h è illustrata rispettivamente in figura 11C ed 11D.

Per ogni preparazione mitocondriale i grafici sono lineari ($r = 0.84$ and 0.91 rispettivamente per P+I e P+I+T₂ 1h, $P < 0.0001$) e le due rette mostrano praticamente lo stesso coefficiente angolare (ossia $\text{cost}/\text{H}^+/\text{O}$) che risulta essere 0.38 nei mitocondri P+I e 0.39 nei mitocondri P+I+T₂ 1h. La linearità dei grafici indica che non si verificano variazioni del rapporto H⁺/O durante la titolazione con malonato dello stato 4 sia nei mitocondri P+I sia nei P+I+T₂1h. Inoltre, l'assenza di cambiamenti del coefficiente angolare delle due rette indica che la T₂ non induce alcuna variazione del rapporto H⁺/O.

Questo risultato indica che la somministrazione di T₂ induce inefficienza nella trasduzione energetica mitocondriale senza che venga alterata l'efficienza del pompaggio protonico globale della catena di trasporto elettronico. L'inefficienza mitocondriale indotta dalla T₂ sarebbe quindi il risultato di una incrementata proton leak.

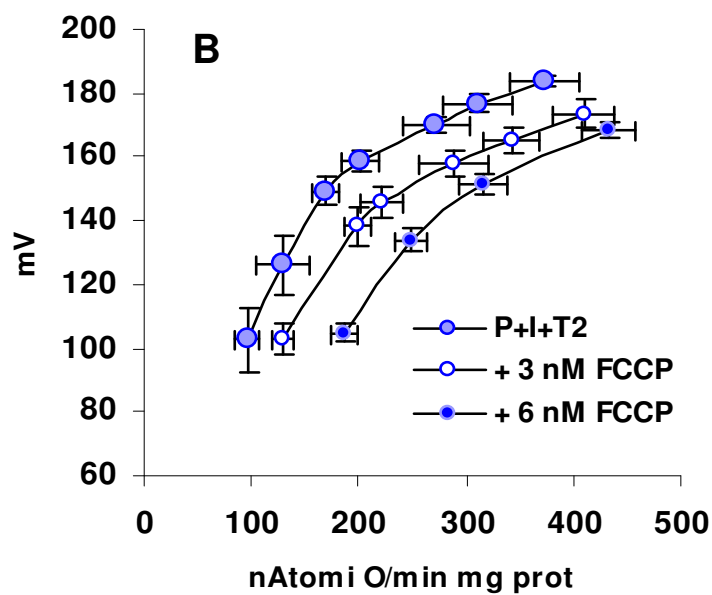
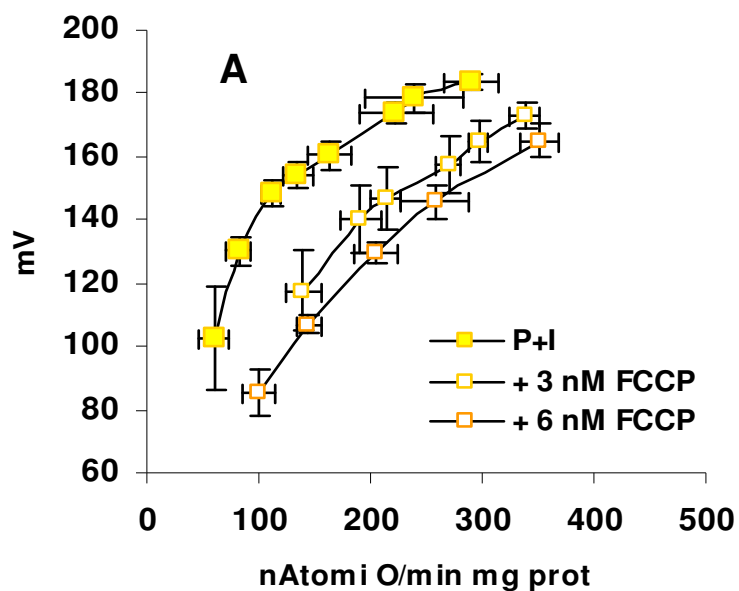


Fig.11 *Titolazione con malonato dello stato 4 della respirazione in mitocondri isolati da muscolo scheletrico di animali P+I (A) e P+I+T2 1h (B) in assenza e in presenza di FCCP.*

I dati riportati sono la media \pm ES di 4 differenti esperimenti.

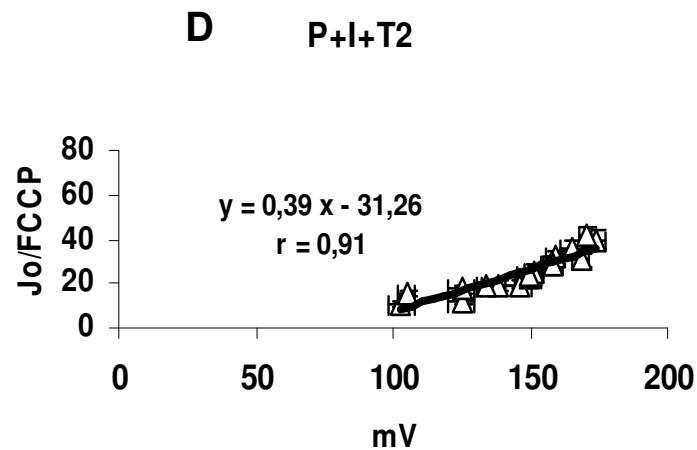
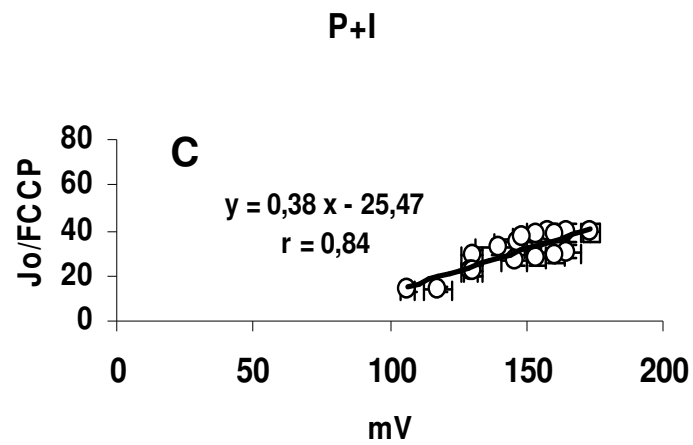


Fig.11 Rappresentazione grafica della relazione $\Delta Jo/FCCP = \Delta \Psi_{cost/H+O}$ ottenuta da mitocondri isolati dal muscolo scheletrico di animali P+I (C) e P+I+T2 1h (D).

I dati riportati sono la media \pm ES di 4 differenti esperimenti.

I valori di $\Delta Jo/FCCP$ ottenuti ad ogni $\Delta \Psi$ sono stati calcolati dai dati presentati in figura.

Cinetica della proton leak in mitocondri di muscolo scheletrico isolati da animali P+I e P+I+T2 1h misurata in presenza e in assenza di BSA, carbossiatractiloside (CAT) o GDP.

Per valutare se gli acidi grassi fossero coinvolti nell'induzione della proton leak da parte della T₂ anche in un effetto a breve termine, le cinetiche della proton leak sono state valutate in presenza di BSA. La BSA inibisce significativamente la cinetica di proton leak sia nei ratti P+I che in quelli P+I+T₂1h, abolendo le differenze tra i due gruppi di animali. Infatti dalla figura si può chiaramente osservare che le due curve ottenute da animali P+I e P+I+T₂1h, in presenza di BSA, sono sovrapponibili; ciò indica il ruolo cruciale degli acidi grassi liberi nell'indurre disaccoppiamento mediato da T₂ (Fig. 12).

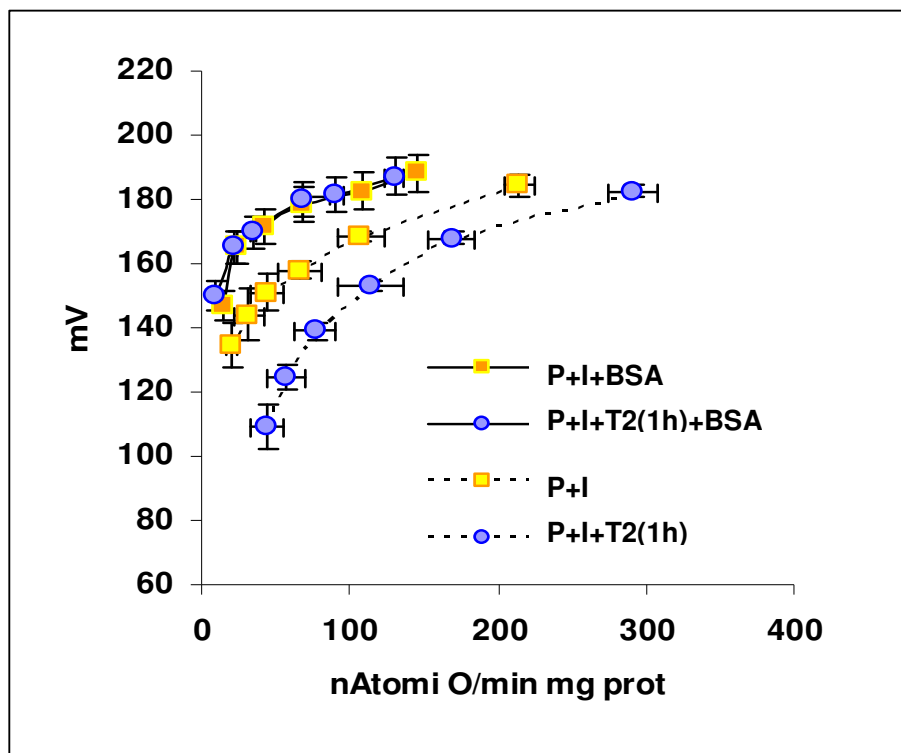


Fig. 12. Risposta cinetica della proton leak alla variazione del potenziale della membrana mitocondriale interna in mitocondri di muscolo scheletrico, in presenza o assenza di BSA 1% (chelante degli acidi grassi liberi)

I valori sono la media \pm ES di 4 differenti esperimenti.

Successivamente è stato determinato se la T_2 fosse in grado di indurre disaccoppiamento attivando UCP3 e ANT in quanto è ben noto il contributo di tali proteine al disaccoppiamento mitocondriale indotto da acidi grassi.

Per stabilire se il disaccoppiamento indotto da T_2 somministrata acutamente è mediato da ANT o da UCP3, abbiamo aggiunto al mezzo di incubazione il CAT e il GDP che in presenza di acidi grassi liberi inibiscono selettivamente ANT e UCP3 (Echtay e coll. 2003) in presenza di acidi grassi (Khailova e coll. 2006 e Parker e coll. 2006).

Come si può osservare dalla figura 13a, il CAT induce una significativa inibizione della proton leak sia nei mitocondri di muscolo scheletrico di animali P+I sia nei mitocondri isolati dal muscolo scheletrico proveniente da ratti P+I+ T_2 1h. L'effetto del CAT risulta maggiore nei mitocondri P+I+ T_2 , ciò comporta che le differenze tra la cinetica della proton leak tra mitocondri P+I e P+I+ T_2 scompaiono.

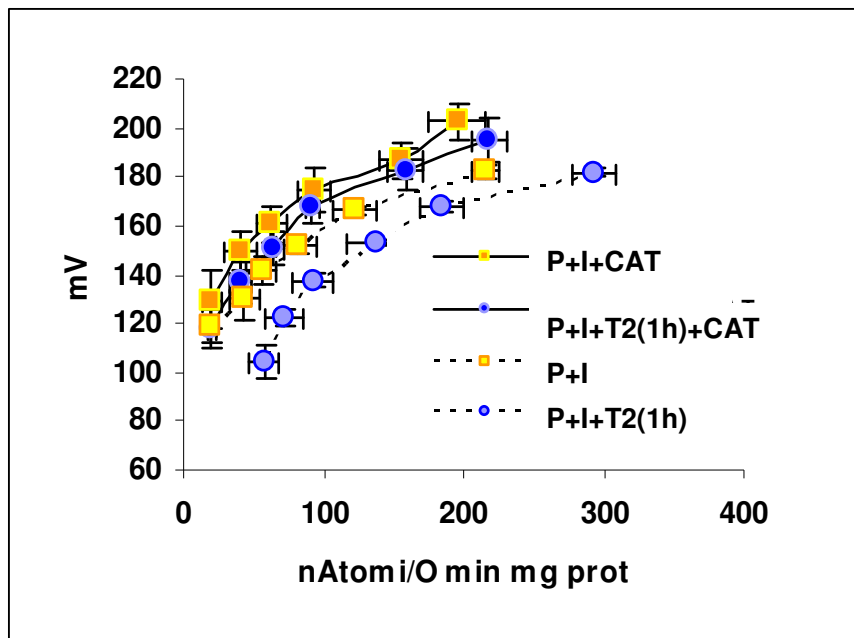


Fig. 13a. Risposta cinetica della proton leak alla variazione del potenziale della membrana mitocondriale interna in mitocondri di muscolo scheletrico, in presenza o assenza di CAT (15 μ g/mg).

I valori sono la media \pm ES di 4 differenti esperimenti.

Il GDP, invece, ha un leggero effetto inibitorio sulla cinetica della proton leak di mitocondri P+I. Infatti, come si può notare dalla figura 13b, l'inibizione è presente solo ad alti valori del potenziale. L'effetto inibitorio del GDP è più pronunciato sui mitocondri isolati da ratti P+I+T₂, ciò comporta che la maggior parte delle differenze tra la cinetica della proton leak tra mitocondri P+I e P+I+T₂ scompare.

I dati ottenuti eliminando selettivamente il contributo di ANT e UCP3 alla proton leak di mitocondri di muscolo scheletrico suggeriscono che entrambi i carriers sono coinvolti nel disaccoppiamento mitocondriale indotto dalla T₂.

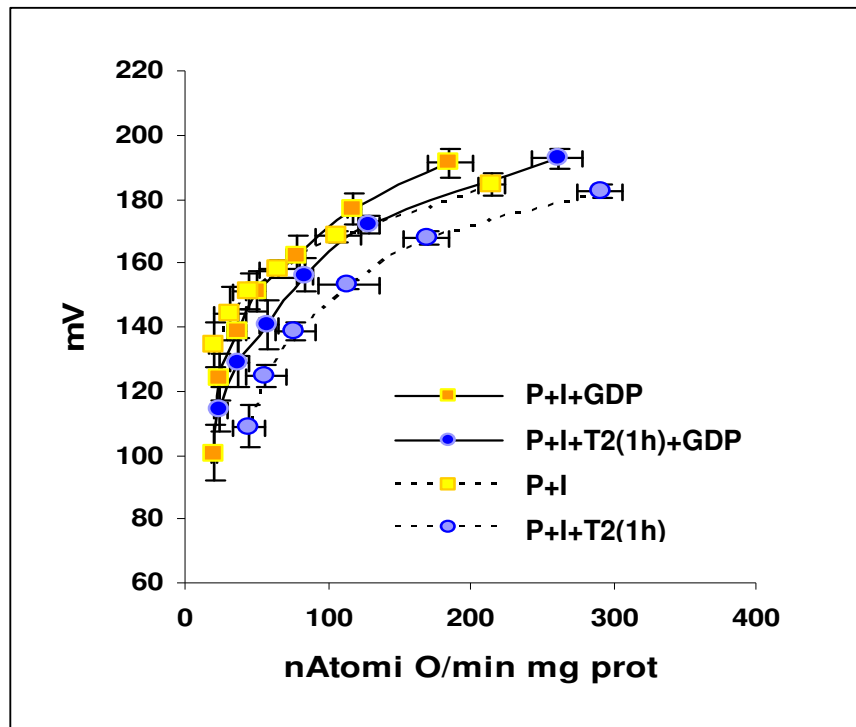


Fig. 13b. Risposta cinetica della proton leak alla variazione del potenziale della membrana mitocondriale interna in mitocondri di muscolo scheletrico, in presenza o assenza di GDP (0.5mM).

I valori sono la media \pm ES di 4 differenti esperimenti.

Effetto acuto della 3,5-T₂ sull'attività di CPT ed MTE di animali ipotiroidici.

Sono stati studiati gli effetti della T₂ sull'attività del sistema CPT, che come già è stato precedentemente descritto è la tappa limitante per

l'importo degli acidi grassi a lunga catena a livello mitocondriale, e di MTE-I, l'enzima chiave nel modulare l'utilizzazione degli acidi grassi mitocondriali permettendo il taglio dell'acil-CoA nel relativo acido grasso e CoA. L'attivazione rapida e simultanea dei due sistemi potrebbe spiegare il ruolo degli acidi grassi nel disaccoppiamento mitocondriale indotto dalla T_2 . Tali attivazioni porterebbero infatti ad un incremento degli acidi grassi liberi a livello della matrice mitocondriale ove potrebbero agire come attivatori e/o substrati di UCP3 ed ANT. E' stato riscontrato che il trattamento acuto con la 3,5- T_2 , come già visto per il trattamento cronico, incrementa sia l'attività di CPT che di MTE-I. Quando paragonata agli animali P+I, infatti, la somministrazione acuta di T_2 induce un incremento di CPT di circa il 32% e di MTE di circa il 57%.

I dati relativi all'effetto della T_2 su CPT sono riportati in figura 14 mentre quelli relativi a MTE-I sono riportati in figura 15.

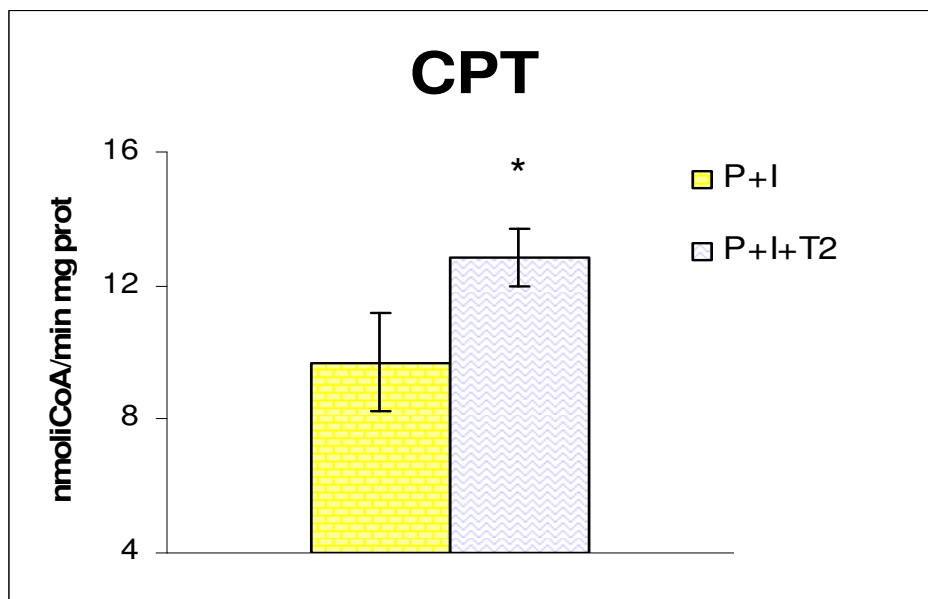


Fig14. Attività enzimatica di CPT, determinata spettrofotometricamente, in mitocondri isolati da muscolo scheletrico di ratti ipotiroidici (P+I) e ipotiroidici trattati con 3,5- T_2 (P+I+ T_2).

I dati sono riportati come valori medi \pm ES.

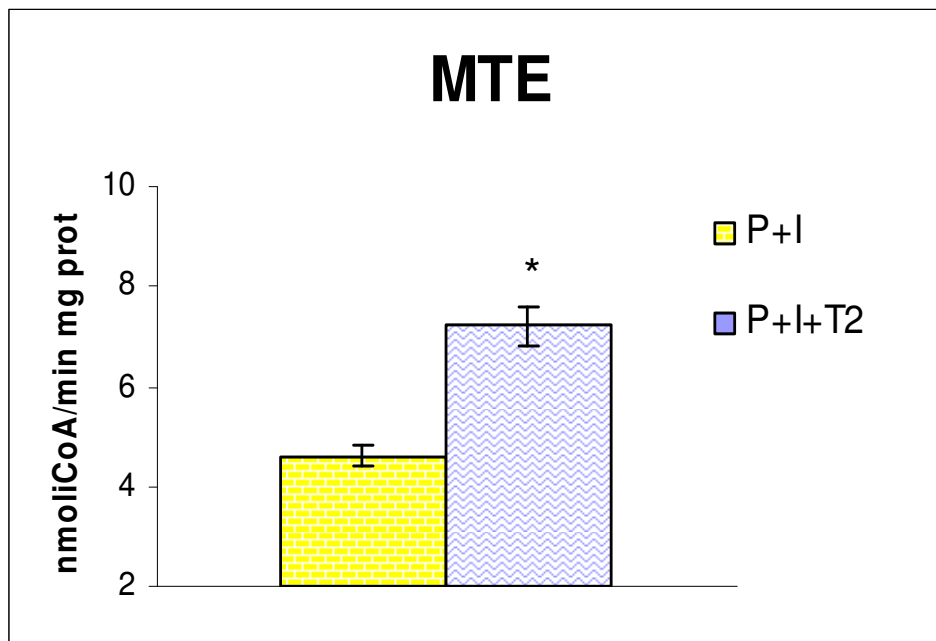


Fig. 15. Attività enzimatica di MTE-I, determinata spettrofotometricamente, in mitocondri isolati da muscolo scheletrico di ratti ipotiroidei (P+I) e ipotiroidei trattati con 3,5-T₂ (P+I+T₂).

I dati sono riportati come valori medi \pm ES.

DISCUSSIONE

In letteratura sono presenti numerosi studi relativi agli effetti cellulari e molecolari degli ormoni tiroidei, in virtù dell'importanza di questi ormoni nel regolare il metabolismo energetico degli organismi.

I mitocondri rappresentano il principale sito in cui si verificano i processi ossidativi cellulari. Tali organelli possono subire notevoli variazioni in risposta agli ormoni tiroidei e a differenti condizioni fisiologiche quali l'esposizione al freddo e lo stato nutrizionale che di per sé inducono modifiche nell'attività della ghiandola tiroidea. Il controllo del metabolismo energetico si esplica attraverso il coinvolgimento di diversi meccanismi biochimici e molecolari e interessa più compartimenti cellulari. Infatti, oltre al nucleo ed ai meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali anche i mitocondri sono bersaglio preferenziale degli ormoni tiroidei (*Goglia e coll. 1994*).

Gli effetti dell'ormone tiroideo sui parametri respiratori mitocondriali sono distinti in: a) effetti a breve termine, rilevabili in pochi minuti od ore dalla somministrazione in vivo o dall'aggiunta in vitro dell'ormone tiroideo e b) effetti a lungo termine, rilevabili in diverse ore o giorni (*Lanni e coll. 1997*).

Da recenti studi, effettuati principalmente dal gruppo con cui ho collaborato durante il triennio del dottorato di ricerca, è emerso che la 3,5-T₂ in realtà è la iodotironina che media gli effetti a breve termine. Infatti, è stato riscontrato che la 3,5-T₂ induce un incremento rapido della velocità del consumo di ossigeno mitocondriale di fegato di ratto e dell'attività della citocromo ossidasi (*Lanni e coll. 1992; 1993; 1996; Lombardi e coll. 1998*). Tale incremento si verifica grazie ad una interazione diretta della iodotironina con i mitocondri ove sono stati evidenziati siti di legame specifici per la 3,5-T₂ stessa (*Goglia e coll. 1994*). A livello dell'animale "in toto" tale effetto si riflette in un incremento del metabolismo di riposo dell'animale (*Lanni e coll. 1997*). Infatti, è stato evidenziato che la 3,5-T₂ ha la stessa capacità della T₃ di incrementare il metabolismo di riposo di animali ipotiroidei. Tuttavia il

meccanismo d'azione delle due iodotironine è completamente differente. La 3,5-T₂ è in grado di indurre rapide variazioni del metabolismo energetico agendo direttamente a livello mitocondriale ed in maniera indipendente dalla trascrizione genica, tanto è vero che il suo effetto non scompare in presenza di actinomicina D, noto inibitore della trascrizione genica. La T₃, invece, agisce prevalentemente a livello nucleare e la sua azione dipende dalla trascrizione genica, per questo i suoi effetti si manifestano tardivamente rispetto a quelli della 3,5-T₂ e sono aboliti dall'actinomicina D (*Lanni e coll. 1996; Moreno e coll. 1997*).

La capacità eccito-metabolica della 3,5-T₂ la rende capace di prevenire l'insorgenza dell'obesità (*Lanni e coll. 2005*).

Per quanto riguarda questo ultimo aspetto, il gruppo con cui ho collaborato ha recentemente evidenziato che la somministrazione di 3,5-T₂ a ratti alimentati per lungo tempo con una dieta iperlipidica ne comporta un ridotto guadagno del peso corporeo e dell'adiposità viscerale rispetto a ratti trattati con la sola dieta iperlipidica. Tali fenomeni sembrano essere il risultato di una incrementata ossidazione degli acidi grassi a livello epatico e della simultanea riduzione dell'efficienza della trasduzione energetica mitocondriale, da cui ne consegue un utilizzo inefficiente dei substrati.

Poiché gli effetti eccito-metabolici della 3,5-T₂ non risultano essere associati a quei fenomeni di tireotossicità che invece si riscontrano in seguito a somministrazione cronica di T₃ (*Lanni e coll 2005*), è plausibile l'utilizzo della 3,5-T₂ come farmaco anti-obesità. Nasce quindi l'esigenza di individuare i tessuti e gli organuli bersaglio di questa iodotironina e di studiare i meccanismi molecolari alla base degli effetti di tale ormone.

Ho ritenuto, quindi, importante estendere gli studi relativi all'effetto della 3,5-T₂, la maggior parte dei quali erano stati effettuati a livello del fegato di ratto, su un tessuto quale il muscolo scheletrico che rappresenta la maggior parte

della massa corporea metabolicamente attiva ed allo stesso tempo è caratterizzato da una notevole capacità mitocondriale .

I risultati presentati in questa tesi dimostrano che i mitocondri di muscolo scheletrico sono bersaglio della T₂. Infatti, tale iodotironina è in grado di stimolare sia la velocità del consumo di ossigeno mitocondriale, sia l'utilizzo di acidi grassi come substrati per le ossidazioni mitocondriali. Entrambi i processi si manifestano sia in seguito a somministrazione cronica che acuta di 3,5-T₂ ad animali ipotiroidei.

L'incrementato utilizzo di acidi grassi come substrati per le ossidazioni mitocondriali indotto dalla 3,5-T₂ è il risultato dell'attivazione simultanea di più processi. La iodotironina, infatti, induce un aumento significativo dell'attività del sistema di trasporto della carnitina-palmitoil-transferasi (CPT) che consente un maggiore ingresso di acidi grassi attivati all'interno del mitocondrio. All'aumentato uptake di acidi grassi segue anche un incremento della loro ossidazione. Infatti, la velocità della β -ossidazione, che risulta inibita nello stato ipotiroideo rispetto allo stato eutiroideo, viene significativamente incrementata in seguito alla somministrazione di 3,5-T₂ ad animali ipotiroidei. E' da tener presente che in condizioni di elevato metabolismo lipidico, a livello della matrice mitocondriale, il pool di CoA disponibile per l'importo degli acidi grassi attivati, per la β -ossidazione e per il ciclo di Krebs, diviene limitante, e quindi l'insorgenza di tale fenomeno rallenterebbe la velocità dell'ossidazione dei grassi. Tuttavia, il trattamento con 3,5-T₂ comporta l'attivazione della tioesterasi mitocondriale (MTE-I), un enzima il cui ruolo risulta fondamentale in condizioni di elevato metabolismo lipidico (*Himms-Hagen e Harper 2001*). Infatti, parte delle molecole di Acil-CoA che non sono sottoposte a β -ossidazione possono divenire substrati per MTE che catalizza l'idrolisi degli Acil-CoA in acidi grassi in forma anionica (FFA) e CoA. Quest'ultimo ritorna ad essere disponibile per le reazioni della β -ossidazione e del ciclo di Krebs. La simultanea attivazione del sistema CPT

e di MTE-I, indotto dalla somministrazione di T₂, determina, tuttavia, una maggiore disponibilità di FFA a livello della matrice mitocondriale. Gli FFA sono in effetti ritenuti i disaccoppianti naturali mitocondriali in quanto sono in grado di ridurre l'efficienza della fosforilazione ossidativa. L'eccesso di FFA dovuto all'attivazione del sistema CPT ed MTE sarebbe responsabile dell'inefficienza della fosforilazione ossidativa che si riscontra in seguito a somministrazione di 3,5-T₂.

I risultati ottenuti sostengono tale ipotesi in quanto ho verificato che 1) mitocondri di muscolo scheletrico di ratti ipotiroidei trattati con 3,5-T₂ presentano un'incrementata cinetica della proton leak rispetto a quelli di ratti ipotiroidei. 2) Affinché l'effetto disaccoppiante della 3,5-T₂ possa manifestarsi, è richiesta la presenza di FFA. Infatti, quando gli FFA mitocondriali endogeni vengono rimossi (perché chelati dalla BSA), non è più possibile evidenziare variazioni della cinetica della proton leak tra mitocondri ipotiroidei e mitocondri ipotiroidei trattati cronicamente con 3,5-T₂. Il coinvolgimento degli FFA è confermato anche dal fatto che l'aggiunta esogena di un acido grasso libero (quale l'acido arachidonico) a mitocondri trattati con BSA permette di ripristinare le differenze nella cinetica della proton leak indotta dalla 3,5-T₂.

L'inefficienza della trasduzione energetica mitocondriale, che si genera in seguito a somministrazione cronica di 3,5-T₂, sembra essere mediata dalla proteina disaccoppiante di tipo 3 (UCP3). UCP3 è una proteina localizzata nella membrana mitocondriale interna ed è in grado di disperdere il gradiente elettrochimico protonico presente ai capi della suddetta membrana senza che a tale processo sia associata la sintesi di ATP. I livelli di UCP3 risultano generalmente incrementati in condizioni in cui si riscontra un maggior utilizzo di lipidi come substrati per le ossidazioni mitocondriali. L'attività disaccoppiante di UCP3 inoltre è regolata dalla presenza di acidi grassi liberi (*Lanni e coll. 1999; Echtay e coll. 2002*).

I risultati ottenuti relativi alla capacità della 3,5-T₂ di indurre un incremento dei livelli di tale proteina, quando somministrata cronicamente a ratti ipotiroidei, sostiene il ruolo di UCP3 nel mediare l'inefficienza mitocondriale indotta da 3,5-T₂ e modulata dalla presenza di acidi grassi liberi.

In base a quanto detto finora è possibile asserire che la 3,5-T₂, quando somministrata cronicamente a ratti ipotiroidei, sarebbe quindi in grado di attivare un insieme di processi che comportano una incrementata ossidazione degli acidi grassi associata ad una riduzione dell'efficienza della trasduzione energetica di mitocondri di muscolo scheletrico, da cui ne consegue un utilizzo inefficiente dei substrati.

Come già detto, gli effetti della 3,5-T₂ sulla respirazione mitocondriale e sul metabolismo lipidico sono evidenti sia in seguito a trattamento cronico con la iodotironina, sia già dopo 1 ora dalla somministrazione in vivo della stessa. Questi ultimi effetti, essendo molto rapidi, non sembrano coinvolgere la sintesi proteica e sarebbero quindi il risultato dell'attivazione di proteine pre-esistenti. Utilizzando come approccio cinetico la "top-down elasticity analysis" sono stati individuati i siti bersaglio della 3,5-T₂ che sono alla base dell'effetto a breve termine di tale iodotironina sulla respirazione mitocondriale.

In effetti, la 3,5-T₂ è in grado di incrementare in modo rapido sia lo Stato 3, ossia la respirazione mitocondriale in cui si verifica la fosforilazione di ADP ad ATP, sia lo Stato 4, ossia la respirazione in cui tale processo non si verifica. Stato 3 e Stato 4 della respirazione sono sotto il controllo di fattori differenti. Lo Stato 3 della respirazione è controllato principalmente dall'insieme di reazioni che comportano l'ossidazione dei substrati e dall'attività del sistema di fosforilazione; la dispersione del gradiente protonico non associato a sintesi di ATP (proton leak) invece non ha controllo sullo Stato 3. Lo Stato 4 della respirazione mitocondriale, invece, è controllato principalmente dalla proton leak e dall'insieme di reazioni che portano all'ossidazione dei substrati; il

sistema di fosforilazione, invece non ha nessun controllo sullo Stato 4. I risultati riportati nella presente tesi evidenziano che la 3,5-T₂ è in grado di indurre sia un incremento delle reazioni che comportano l'ossidazione del substrato (reazioni che generano il $\Delta\Psi$), sia di quelle che dissipano il $\Delta\Psi$ non associato a sintesi di ATP, ossia la proton leak e/o il redox slip, ma non influenza l'attività del sistema di fosforilazione. Da quanto riportato è evidente che l'incremento dello Stato 3 della respirazione indotto da T₂ è attribuibile unicamente all'attività delle reazioni coinvolte nell'ossidazione dei substrati, mentre l'effetto sullo Stato 4 della respirazione è il risultato di un concomitante incremento delle reazioni coinvolte nell'ossidazione del substrato e di quelle coinvolte nella dispersione del gradiente elettrochimico protonico non associato a sintesi di ATP. L'incremento nelle attività dei produttori del $\Delta\Psi$ può essere dovuto a vari fattori quali l'alterata attività delle deidrogenasi mitocondriali, l'aumento nel trasporto dei substrati e l'incremento nelle attività dei complessi della catena respiratoria (*Brand e coll. 1994*). Data la rapida azione della T₂, il suo effetto sui produttori del $\Delta\Psi$ è maggiormente dovuto all'alterazione nelle loro proprietà cinetiche piuttosto che all'incremento della concentrazione dei componenti molecolari. Per quanto riguarda l'effetto della T₂ sulle vie che portano alla dispersione del gradiente elettrochimico protonico non associato a sintesi di ATP ossia all'inefficienza della trasduzione energetica mitocondriale, la discriminazione tra il processo di "redox slip" e "proton leak" ha permesso di escludere che la somministrazione di 3,5-T₂ potesse alterare l'efficienza del pompaggio protonico globale della catena di trasporto elettronico e quindi di asserire che l'inefficienza mitocondriale indotta da questo ormone è il risultato di una incrementata dispersione del gradiente elettrochimico protonico attraverso la membrana mitocondriale interna dovuto ad una incrementata conduttanza protonica. Anche per quanto riguarda gli effetti rapidi della 3,5-T₂ sull'efficienza della trasduzione energetica mitocondriale, gli acidi grassi liberi

hanno un ruolo cruciale nel mediare gli effetti. Infatti, come già visto nel caso dell'effetto cronico della 3,5-T₂, in presenza di BSA la iodotironina perde la sua capacità di indurre inefficienza della trasduzione energetica. Tra le proteine mitocondriali coinvolte nel suddetto processo sono state individuate ANT e UCP3 (la cui attività disaccoppiante dipende dalla presenza di FFA) quali determinanti molecolari dell'effetto della 3,5-T₂ sul disaccoppiamento mitocondriale (*Skulachev e coll. 1991; Brand e coll. 2005*). Infatti, escludendo selettivamente il contributo che ANT e di UCP3 forniscono alla conduttanza protonica mitocondriale, ottenuto mediante l'aggiunta dei rispettivi inibitori selettivi carbossiatractiloside (CAT) e GDP, la 3,5-T₂ perde la sua capacità disaccoppiante. Ciò indica che nei mitocondri di ratti ipotiroidei trattati con T₂, ANT e UCP3 sono entrambe coinvolte nel meccanismo responsabile dell'effetto disaccoppiante di tale iodotironina.

BIBLIOGRAFIA

- Adrail D., Lerme F., Puymirat J., Morel G. . *Eur.J.Cewll.Biol.* 1993 Oct; . **62**(1):105-13.
- Alexon S.E.H., Nedergaard J.P. 1988 *J. Biol. Chem.* 263(27): 13564-13571.
- Andrea T.A., Cavalieri R.R., Goldfine I.D. Jorgensen E.C. 1980 Jan 8 *Biochem.* 19, 55.
- Arnold S., Goglia F., and Kadenbach B. *Eur.J.Biochem*; 1998 Mar 1; **252**(2):325-30.
- Ashizawa K., Mcphie P., Lin K.H., Cheng S-Y, 1991 Jul 23 *Biochem.* 29, 7105.
- Baumann, C.T., Maruvada, P., Hager, G.L., Yen, P.M. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 11237.
- Beslin A., Vie M.P., Blondeau J.P., Francon J. 1995 Feb 1 *Biochem. J.* 3, 729.
- Bianco A.C., Sheng X. and Silva J.E. *J. Biol. Chem.* 1988 Dec 5; **263**(34):18168-75.
- Boss O., Hagen T., Lowell B.B. *Diabetes*, 2000 Feb; **49**(2):143-56. Review.
- Brand M.D., Chien L.F., Diolez P. *Biochem. J.* 1994 Jan 1; 297(Pt1): 27-9.
- Brand M.D. *J. Theor. Biol.* 1996 Oct 7;182(3):351-60
- Brand M.D. 1997 *J. of Experimental Biology* 200,193-202.
- Brand M.D. e Esteves T.C. 2005 *Cell. Metab.* 2(2),85-93.
- Brown G.C., Hafner R.P., Brand M.D. *Eur. J. Biochem.* 1990 Mar 10; 188(2): 321-5.
- Cheng S., Zhu X.G., Hanover J.A., Hager G.L., *J. Biol. Chem.* 1998 Oct 16, 273, 2705-8.
- Cimmino M., Mion F., Goglia F., Minaire Y., Geloen A. *Journal of Endocrinol.* 1996, 149, 319.

- Davis P.J., Spanlding S.W., Gragerman R.I. 1970 *Endocrinology* 87: 978.
- Davis P.J., Shih A., Lin Y., Martino L.J., Davis F.B. 2000 *J. Biol. Chem.* 275:38032-38039.
- Davis P.J., Tillmann H.C., Davis F.B. Wehling, M. *J. Endocrinol. Invest.* 2002, 25, 377.
- De Groot L.J., Coleoni A.H., Rue P.A., Refetoff 1977 *Biochem Biophys. Res. Commun.* 79, 172.
- Denton R.M., Mc Cormac J.G., 1985 *Am. J. Physiol.* Dec; 249(6Pt): E 543-54.
- Dw Herder W.W., Hazenberg M.P., Pennock-Schroder A.M., Hennemann G., Visser T.J. 1986 *Med. Biol.* 64, 31.
- Dummler K., Muller S., Seitz H.J. 1996 *Biochemical J.* 317,913.
- Dutton G., 1980 *CRC press*, Boca Raton, Florida.
- Echtay K.S., Roussel D., St- Pierre J., Jeckabson M.B., Cadenas S., Stuart J.A., Harper J.A., Roebuck S.J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D. 2002 Jan 3 *Nature*;415(6867):96-9.
- Echtay K.S., Esteves T.C., Pakay J.L., Jecabson M.B., Lambert A.J., Portera-Otin M., Pamblora R., Vidal Puig A.J., Wangs Roebuk S.J., Brand M.D. 2003; *EMBOY* 22 (16), 4103-4110.
- Friesema EC., Guly S., Abdalla A., Manning Fox JE., Halestrap AP., Visser TJ. *J.Biol.Chem.* 2003; **278**(41): 40128-35.
- Gharbi-Chini J., Torresani J. 1981 *J. Endoc. Invest.* 4, 177.
- Gershengorn MC. 1986 *Ann. Rev. Physiol.* 48,515.
- Goglia F., Torresani J., Bugli P., Barletta A., Liverini G. *Pflugers Arch* 1981 May: 390(2):120-4.
- Goglia F., Lanni A., Barth J., Kadenbach B., *FEBS Lett* 1994 Jun 13; **346**(2-3):295-298.

- Hafner RP., Nobes CD., MCGOWN AD., Brand MD., *Eur.J.Biochem.* 1988 Dec 15; 178:511-18
- Hafner RP., Brown G.C., Brand M.D. (1990a) *Eur. J. Biochem.* 188, 313.
- Hafner RP., Brown G.C., Brand M.D. (1990b) *Biochem. J.* 265, 731.
- Harper M.E., Brand M.D. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995; 208:228-237.
- Hartree EF. *Anal Biochem.* 1972 Aug. 48(2): 422-427.
- Hashizume K., Kobayashi M., Miyamoro T. and Yamauchi K. *Endocrinology* 1986 Sep; 119(3): 1063-70.
- Hashizume K., Miyamoto T., Ichikawa K., Yamauchi K., Sakuray A., Ohtsuka H., Kobayashi M., Nishi Y., Yamada T. (1991) *Endocrinol.* 129, 2571.
- Hennemman G., Docter R 1990 (Ed) *The Thyroid Gland* Raven Press p 221.
- Himms- Hagen J., Harper M.E. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001 Feb;226(2):78-84.
- Horrum M.A., Tobin R.B., Ecklund R.E. *Mol.Cell.Endocrinol.* 1990; 68:137-41.
- Horst C., Rokos H., Seitz H.J. *Biochem. J.* 1989; 261: 945-50.
- Hummerich H., Soboll S. *Biochem. J.* 1989 Mar 1; 258(2):363-7.
- Ichihawa K., e Hashizume K. 1995 *Endocrin. J.*42 (2),131.
- Yamauchi K., Tata Jr. 1994 *Eur. J. Biochem.* 225(3), 1105.
- Yen, P.M. Baumann, C.T., Maruvada, P., Hager, G.L., *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 11237.
- Jucker B.M., Dufour S., Ren J., Cao X., et al. *PNAS*, 2000; 97:6880-6884.
- Kaplan MM., Yaskoskj KA. *J. Clin.Invest.* 1980 66 (3):551-62.
- KatoH., Fukuda T., Parkinson C., Mcphie P., Cheng S-Y, 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7861.

Khailova L.S., Prikhodko E.A., Dedukhova V.I., Mokhova E.N., Popov V.N., Skulachev V.P. 2006; *Biochim Biophys Acta* 1757 (9-10) 1324-9.

Kohrle J., Hesch R.D., Leonard J.L. 1991 In Braverman L.E. Utiger R.D. (eds) *The thyroid*. Lippincott, Philadelphia, p 144.

Krenning E.P., Docter R., Bernard HF, Visser T.J., Heinemann G. 1981 *Biochimica et Biophysica Acta* 676, 314.

Lanni A., Moreno M., Cioffi M., Goglia F. *Mol.Cell.Endocrinol* 1992 Aug;**86**(3): 143-148.

Lanni A., Moreno M., Cioffi M., Goglia F. 1993 *J. Endocrinol.* 1993 Jan;**136**(1):59-64.

Lanni A., Moreno M., Lombardi A. and Goglia F. *J. Physiol* 1996 Aug 1; 494(Pt3): 831-7.

Lanni A., De Felice M., Lombardi A., Moreno M., Fleury C., Riccuier D. and Goglia F. *FEBS Lett.* 1997 Nov 24:418(1-2): 171-4.

Lanni A., Moreno M., Lombardi A. and Goglia F. *Pflug.Arch:Eur.J.Physiol.* 1998; 436:407.

Lanni A., Beneduce L., Lombardi A., Moreno M., Boss O., Muzin P., Giacobino J.P. and Goglia F. *FEBS Lett.* 1999 Feb 12: 444(2-3): 250-4.

Lanni A., Moreno M., Lombardi A., de Lange P., and Goglia F. 2001 *J. Endocrinol. Invest.* Dec.;**24**(11):897-913.

Lanni A., Moreno M., Lombardi A., de Lange P., Silvestri E., Ragni M., Farina P., Chieffi Baccari G, Fallahi P., Antonelli A., Goglia F. *FASEB J.* 2005; 19:1552.

Larkin S., Mull E., Miao W., Pittner R., Albrabdt K., Moore C., Yung A., Denaro M. and Beamount K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*1997 Nov 7; 240(1): 222-7.

Lennon A.M. (1992) *Eur. J. Biochem.* 210 (1): 79.

Leonard J.L., Larsen P. R. 1985 *Brain Res.* Feb. 18 ; 327 (1-2) : 1-13.

- Leonard J.L., Visser T.J. 1986. Henneman G., (ed) *Marcel Dekker*, New York, cap. 6.
- Leonard J.L. 1990 In Greer M.A. (ed) *The Thyroid Gland* Raven Press, N.Y. p225.
- Lombardi A., Lanni A., Moreno M., Brand M.D. and Goglia F. *Biochem. J.* 1998 Feb 15; 330(Pt1): 521-6.
- Lombardi A.; Beneduce L., Moreno M., Diano S., Colantuoni V., Ursini M.V., Lanni A., Goglia F. *Endocrinology*, 2000: 141-1729.
- Lombardi A., Silvestri E., Moreno M., De Lange P., Farina P., Goglia F., Lanni A. *FEBS Lett* 2002 Dec 4; 532(1-2): 12-6.
- Mol J.A., Krenning E.P., Docter R., Ronzing J., Heinemann G. 1986 *J. Biol. Chem.* 261, 7460.
- Moreno M., Lanni A., Lombardi A., Goglia F. *J. Physiol (London)* 1997 Dec1; 505(Pt2): 529-38.
- Moreno M.; Lombardi A.; Beneduce L.; Silvestri E.; Pinna G.; Goglia F.; Lanni A. *Endocrinology*, 2002, 143(2), 504.
- Moreno M., Silvestri E., Visser T.J., Goglia F., Lanni A. *Endocrinology* 2003; 144(6): 2297-303.
- Mowbray J., Carrigan J. 1984 *Eur. J. Biochem.* 139, 95.
- Murray M., Towle H. *Mol. Endocrinol* 1989 Sep., 3(9):1434-42.
- O'Malley B. *Mol. Endocrinol.* 1990; 4(3): 363-9.
- Oppenheimer J.H., Schwartz H.L., Surcs M.I. 1974 *Endocrinol.* 95, 897.
- O'Reilly I., Murphy M.P. *Acta Endocrinol.* 1992 Dec; 127(6): 542-546.
- Pardridge W.M. 1987 *Am. J. Physiol.* 252, E157.
- Parker N., Humphry D., Green K., Brand M.D. 2006; *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 14, 385.
- Pfahl M. 1993 *Endocr. Rev.* 14:651-658.

- Rasmussen U., Kohrle J., Rokos H., Hesch R.D. 1989 *FEBS Letters* 255, 385.
- Rutgers M., Bonthius F., Heresdins F.A., Visser T.J. 1987 *J. Clin Invest.* 80:758.
- Samson M Osty J., Francon J., Blondeau J.P. 1992 *Biochim. Biophys. Acta* 1108,91
- Schonfeld P., Wieckowsk M.R., Woitczok L. *FEBS Lett.* 1997; 416:19-22.
- Skulachev V.P. *FEBS Lett.* 1991 Dec 9; 294(3): 158-62. Review.
- Sobbolle S. 1993 *Biochimica et Biophysica Acta* 1144, 1.
- St. Germain D.L. 1988. *Endocrinology* 122: 1860.
- Sterling K., Milch P.O. 1975 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72,3225.
- Sterling K., Campbell G.A., Taliadouros G.S., Nunez E.A. 1984 *Cell. Tissue Res.* 236, 321.
- Sterling K. *Endocrinology* 1986 Jul; 119(1): 292-295.
- Sugawara A., Yen P.M., Darling D.S., Chin W.W. *Endocrinology* 1993 133:965.
- Tomita K., Lardy H.A. 1960 *J. Biol. Chem.* 235,3292.
- Treutere E., Albrektsen T., Johansson L., Leers J., Gustafsson J.A. 1998 *Mol. Endocrinol.* 12: 864-881.
- Van Itallie CM. (1990) *Endocrinol.* 127, 55.
- Virbasius JC., Virbasius CA., Scarpulla RC. *Genes Dev.* 1993; 7(3): 380-92.
- Vie M.P., Blanchet P., Samson M., Francon J., Blondeau J.P. 1996 *Endocrinol.* 137(11), 4563.
- Vie M.P., Evrard C., Osty J., Breton-Gilet A., Blanchet P., Pomerance M., Rouget P., Francon J., Blondeau J.P. 1997 *Mol. Endocrinol.* 11(11), 1728.
- Visser T.J., Leonard J.L., Kaplan M.M. et al. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 79: 5080

Visser T.J. In: Coke B.A., King R.J.B., Van der Molen H.J. (Eds.). *Elsevier*, Amsterdam 1988, p 81.

Visser T.J. (1990) In Vitta J. (ed) *Glutathione: metabolism and physiological functions*. CRC Press, Boston, p 317.

Wrutniak C., Cassar-Malek I., Marchal S., Rochard P., Dauca M., Flechon J., Samarut J., Ghysdael J., Cabello G. 1994 *J. Clin. Invest.* 17, 15.