

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

DESCRIZIONE DI UN CASO DI SEVERA INSULINO-RESISTENZA E LIPODISTROFIA PARZIALE, CAUSATO DA UNA MUTAZIONE A CARICO DEL PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR- γ (PPAR- γ): CARATTERIZZAZIONE CLINICA E MOLECOLARE.

Relatore: Prof. Paolo Beck-Peccoz

Dr. Irene Campi

Indice

Struttura dei recettori nucleari.....	4
Struttura degli hormone response elements (HREs).....	7
Coattivatori.....	7
Corepressori.....	8
Recettori nucleari della famiglia dei peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).....	9
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ).....	11
<i>Struttura del gene ed isoforme.</i>	11
<i>Attività trascrizionale del PPAR-γ.</i>	12
<i>Ligandi del PPAR-γ.</i>	13
<i>Funzioni metaboliche del PPAR-γ.</i>	14
<i>PPAR-γ e sindromi da resistenza recettoriali.</i>	16
<i>Altre condizioni cliniche associate a mutazioni del PPAR-γ.</i>	17
<i>Modelli animali.</i>	19
METODI.....	20
Screening delle mutazioni del PPAR- γ	20
Mutagenesi.....	21
Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	22
Saggio di trasfezione transiente.....	22
Studi clinici.....	24
CASE REPORT.....	25
RISULTATI.....	26
Analisi genetica.....	26
Alterazioni metaboliche.....	28
Lipodistrofia parziale.....	32
La mutazione R184W determina in vitro ridotta attività trascrizionale.....	35
DISCUSSIONE.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	39

ABSTRACT

Mutations affecting ligand or DNA binding functions of PPAR γ are associated with lipodystrophic insulin resistance. In the present study, we describe a 31 yr old female, heterozygous for a novel, mutation of PPAR γ . Clinical features included hirsutism, polycystic ovarian syndrome, dyslipidaemia and hypertension. Hyperinsulinaemia during an OGTT and HOMA-IR 11.1% confirmed severe insulin resistance. She had distal limb and gluteal lipodystrophy with reduced subcutaneous adipose tissue (SCAT) but preserved visceral adipose tissue (VAT), with SCAT/VAT ratio of 0.619 (NR 0.19 \pm 0.084) and hepatic steatosis on MRS (Intrahepatic lipid 26.8% NR<5). In functional studies, the mutant receptor was more transcriptionally impaired with lower-affinity ligand (PGJ2) than synthetic agonist (rosiglitazone). Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with hFABP4 PPARE showed absent DNA binding. Modelling based on the PPAR γ -RXR heterodimer structure, indicates that this mutation involve a conserved aminoacid, which forms part of the extended DNA binding domain in the hinge region of the receptor. This residue interacts with bases in the minor groove upstream of the PPARE, and this substitution is predicted to destabilize such contacts. This mutation represents a novel mechanism whereby loss of receptor interaction with DNA is associated with human metabolic disease.

INTRODUZIONE

Struttura dei recettori nucleari

I peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari (NR). Le proteine che costituiscono tale famiglia, pur avendo funzioni profondamente differenti, esibiscono numerose proprietà comuni, quali la capacità di dimerizzare tra loro o con altri NR, costituendo omo, o più frequentemente, eterodimeri e l'abilità di regolare la trascrizione genica, legandosi a sequenze specifiche, localizzate generalmente a livello del promoter dei geni target.

Fino ad ora sono stati identificati circa 50 differenti recettori nucleari; alcuni di essi, presentano elevata affinità di legame per ormoni noti, quali il recettore degli ormoni tiroidei (TR), della vitamina D (VDR), dei mineral e glucocorticoidi (MR e GR, rispettivamente), degli estrogeni (ER), del progesterone (PR) e degli androgeni (AR).

Al contrario, per molti NR, il ligando fisiologico non è tuttora noto e vengono pertanto definiti "orphan receptors". Esempi di tali recettori sono il Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (DAX-1), il Nuclear Receptor subfamily 1, group F, member 1 (NR1F1), Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF4 α e β), Steroidogenic Factor 1 (SF-1) e Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1). Alcuni di essi, rivestono comunque un ruolo importante nella patogenesi di alcune patologie umane; ad esempio mutazioni di DAX-1 sono responsabili dell'ipoplasia surrenalica congenita X-linked; in pazienti affetti da diabete mellito, nel contesto del Maturity Onset Diabetes of the Young 1 (MODY1), sono state identificate le mutazioni di HNF4A; il gene che codifica SF-1 (NR5A1) sembra invece coinvolto in alcuni casi di ipogonadismo/amenorrea primaria, ambiguità dei genitali alla nascita, insufficienza ovarica primitiva/premature ovarian failure (POF).

Infine, per altri NR, sono stati identificati in vitro alcuni ligandi a bassa affinità, per lo più di natura lipidica; tuttavia non è stato ancora chiarito in modo definitivo, se tali composti rappresentino i reali ligandi fisiologici in

vivo. A questo gruppo, appartengono i recettori definiti “adopted orphan receptors” tra cui i peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), il retinoid X receptor (RXR), il liver X receptor (LXR), il Farnesoid X receptor (FXR), il Steroid and Xenobiotic sensing nuclear Receptor (SXR), il Constitutive Androstane Receptor (CAR).

Nonostante presentino fra loro numerose differenze, nei NR si riconosce una struttura di base simile, caratterizzata da specifici domini funzionali, espressione di una origine ancestrale comune: una regione amino terminale (A/B) contenente una porzione con funzione trascrizionale ligando-indipendente, definita Activation Function 1 (AF-1); un dominio centrale (C) altamente conservato tra i diversi NR denominato DNA-binding domain (DBD); una regione linker (D), seguita dalla regione E/F che media il legame con il ligando. La regione carbossi-terminale di molti recettori nucleari, contiene una regione AF-2 caratterizzata da una funzione trascrizionale ligando-dipendente, sinergica con AF-1 (Fig 1).

La regione A/B, presenta dimensione variabile dai 23 aminoacidi del recettore della vitamina D (VDR), ai 602 del recettore dei mineralcorticoidi. Contiene al suo interno la regione AF-1, dotata di funzioni non ancora completamente chiarite. La sua attività trascrizionale in condizioni basali è generalmente debole; tuttavia, attraverso un'interazione con aminoacidi localizzati nella regione AF-2 del carbossi-terminale, mediata da cofattori che agiscono da “ponte” tra i due domini, si assiste ad up-regolazione della trascrizione genica. Questo fenomeno è stato ad esempio riportato per il recettore degli estrogeni (ER) (1). Inoltre questo dominio è regolato, da protein-kinasi o MAP-kinasi, che mediano la fosforilazione di alcuni residui, come dimostrato ad esempio per RAR e PPAR- γ ; questa possibilità, rappresenterebbe un'integrazione tra vie di segnale di membrana e nucleari.

Il dominio C, contiene il DBD, costituito da residui altamente conservati sia tra le specie, sia tra i differenti NR, la cui principale funzione è il legame con il DNA, a livello di specifiche sequenze geniche, denominate Hormone Response Elements (HREs), generalmente localizzate nel promoter dei geni regolati dal NR. Il DBD è costituito da due zinc-finger che contengono quattro cisteine altamente conservate, in grado di legare un atomo di zinco.

Più nel dettaglio i residui posti nella porzione distale della prima zinc-finger costituiscono la P-box, importante per il legame con il DNA; i residui localizzati nella seconda delimitano, invece, una D-box, che media la dimerizzazione, in concerto con altri aminoacidi posti nel LBD. Nel complesso il DBD contiene due α -eliche, poste perpendicolarmente tra loro, di cui la prima, contenente la P-box, è orientata verso il solco maggiore del DNA, e prende diretto contatto con i response elements. La seconda contiene l'altra zinc-finger che stabilizza il legame alla doppia elica.

La regione linker o D, denominata anche hinge region, rappresenta una sorta di estensione distale del DBD, costituendo un'altra zona di legame, a livello del solco minore del DNA. L'hinge domain presenta inoltre altre importanti funzioni. In esso è infatti contenuto il Nuclear Localisation Signal (NLS), sequenza segnale, che permette il passaggio del NR dal citoplasma al nucleo, riconoscendo i pori nucleari; inoltre la regione D, appare fondamentale per il legame con i corepressori in particolare con la Nuclear CoRepressor protein (NCoR) (4). In alcuni recettori, quali il recettore degli ormoni tiroidei (TR) e l'RXR α , la hinge region costituisce una terza alfa elica, che stabilizza il legame con il DNA, ancorandosi al solco minore (2,3).

La regione E/F ha molteplici funzioni, di cui, la più importante è la capacità di legare il ligando, a livello del Ligand Binding Domain (LBD). La struttura cristallografica del LBD, è caratterizzata dalla presenza di 12 α -eliche (H1-12) e da un foglio beta, che delimitano una cavità idrofobica in cui penetra il ligando. Essa è caratterizzata da dimensioni molto variabili tra i vari NR, consentendo un legame specifico con il ligando. L'elica 12 (H12) comprende la regione AF-2 che, a seguito del legame con il ligando, subisce una modificazione conformazionale, che facilita l'esposizione della superficie di legame con i coattivatori.

Gli aminoacidi che mediano la dimerizzazione, sembrano invece localizzati a livello delle eliche H7, H9 e H10, come dimostrato per i dimeri RAR-RXR, PPAR- γ -RXR (5, 6). All'interno della regione E/F sono inoltre presenti dei residui che consentono il legame con le heat shock proteins (HSP).

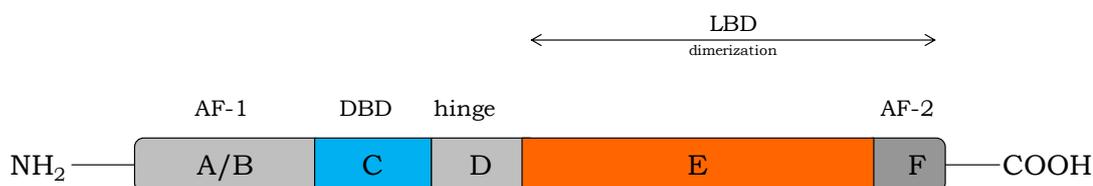


Figura : rappresentazione schematica dei domini funzionali dei recettori nucleari.

Struttura degli hormone response elements (HREs)

Pur differenziandosi nella struttura, gli HREs derivano da una sequenza ancestrale AGGTCA, definita half site. Essa, può essere preceduta da una sequenza 5' ricca di A/T, oppure duplicata come palindrome inversa, nei NR che agiscono come monomeri; in rari casi è presente una mirror palindrome; infine, nei recettori che dimerizzano con RXR, si osserva una ripetizione diretta. La lunghezza della sequenza localizzata tra i due half site, denominata spacer, è variabile e riveste un ruolo importante nel determinare la specificità della risposta ormonale.

Coattivatori

I coattivatori (COA) sono proteine che permettono di incrementare l'attività trascrizionale dei NR. Ad oggi sono stati identificati oltre 200 proteine in grado di agire da COA, che sono dotati di differenti attività enzimatiche intrinseca: metiltransferasica, ligasi dell'ubiquitina, histone acetiltransferasica, o kinasica (7). Come dimostrato da analisi mutazionali e da studi cristallografici, la regione AF-2 dei NR, è cruciale per la capacità di legare i COA, che avviene generalmente a livello di motivi LXXLL.

I coattivatori sono stati raggruppati in famiglie di proteine con funzione simile. La famiglia p160, che comprende SRC1, SRC2 e SRC3, presenta una attività intrinseca di istone acetil transferasi (HAT) (8, 9). La famiglia CBP/p300 presenta una capacità di legame con la cyclic AMP response

element binding protein (CREB) (10). I membri di questa famiglia presentano una attività HAT molto forte, che non coinvolge solo gli istoni, ma anche altre proteine, regolando la loro stessa funzione. Il complesso TRAP/DRIP lega prevalentemente i TR e il recettore della vitamina D. I membri di questa famiglia, non sembrerebbero dotati di attività HAT, ma interagiscono direttamente con le altre proteine che costituiscono il complesso trascrizionale (11, 12, 13).

È verosimile che nell'ambito della cascata trascrizionale, i coattivatori dotati di attività HAT siano i primi ad entrare in azione, dal momento che la loro funzione è quella di eliminare la repressione legata all'addensamento della cromatina. Questa funzione permetterebbe il reclutamento altri coattivatori, che costituiscono un complesso con numerose sub-unità, definiti Mediators (MED) che agiscono a più stretto contatto con la cascata trascrizionale e con la RNA polimerasi II.

Corepressori

I corepressori sono stati inizialmente identificati dallo studio di una proteina di 270 kd associata ai TR e RAR, che venne denominata Nuclear CoRepressor (NCoR) (4). Successivamente venne identificata un'altra proteina, SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor) (14) con funzioni simili a NCoR, ed omologia di sequenza circa del 40%, e verosimilmente derivate entrambe da un comune gene ancestrale. Studi mutazionali eseguiti nel TR, suggeriscono che NCoR, prenda contatto a livello della hinge region del recettore e della porzione più N-terminale dell'LBD. Successivamente sono stati identificati altri componenti del complesso di repressione trascrizionale, quali alcune istone deacetilasi (HDAC1/HDAC2), TBL-1, TBLR-1, GPS-2 ed altri fattori, in grado di interagire con SMRT e NCoR, a livello della loro porzione N-terminale e centrale (15). Altri corepressori con struttura non omologa a SMRT e NCoR sono stati riconosciuti: la small ubiquitous nuclear corepressor (SUN-COR), Alien ed Hairless. Altri corepressori, quali la Receptor Interacting Protein 140 (RIP140), interagiscono con i NRs in modo ligando-dipendente, reprimendo direttamente l'espressione dei loro geni target. Tali proteine prenderebbero contatto con il NR a livello del carbossi terminale (16).

Recettori nucleari della famiglia dei peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)

Il nome PPAR deriva dalla originaria scoperta di un recettore nucleare, successivamente denominato PPRA- α , che, stimolato da vari composti, tra cui il clofibrato, induceva la proliferazione dei perossisomi negli epatociti murini (17).

Studi successivi hanno permesso di identificare gli altri membri della famiglia, codificati da geni distinti: PPAR- α , PPAR δ (definito anche PPRA- β , NUC-1 o FAAR) e PPAR- γ . Tali recettori presentano una distribuzione tissutale specifica (18): il PPAR- α è espresso prevalentemente a livello del fegato, rene, miocardio e muscolo scheletrico ed è coinvolto nel metabolismo dei lipidi, incrementando l'uptake e la beta ossidazione degli acidi grassi a livello epatico (19). Il PPAR δ ha una distribuzione più ubiquitaria, con prevalenza per il tessuto nervoso, adiposo e cute; la sua principale funzione sembra essere la regolazione della beta ossidazione degli acidi grassi nel tessuto muscolare e adiposo (20, 21). Infine il PPAR- γ , presenta un'elevata espressione nel tessuto adiposo, a livello intestinale e nei leucociti della linea dei monocito-macrofagi; la sua principale funzione è la regolazione del differenziamento e delle funzioni degli adipociti.

Tali recettori presentano una elevata omologia di sequenza (intronò al 90%) nella porzione del DNA binding domain (DBD), mentre differiscono maggiormente nella struttura del ligand binding domain (LDB) (Fig. 1).

Il legame con il DNA avviene unicamente mediante la formazione di eterodimeri con l'RXR, e riconoscimento di una sequenza specifica, definita peroxisome proliferator activated response elements (PPRAEs), localizzata al 5' dei geni target e caratterizzata da una sequenza aminoacidica tandem costituita dalla ripetizione di due half-sites con sequenza AGGNCA, separate da un aminoacido e definita direct repeat +1 (DR-1) (22, 23). I PPAREs meglio caratterizzati sono riportati in tabella 1.

Gene	Posizione	PPRE	Funzione in vivo
Acyl-CoA ossidasi (ACO)	-570/-558 -214/-202	TGACCTtTGTCCT TGACCTtCTACCT	β -ossidazione nei perossisomi
Proteina bifunzionale (enoyl-CoA idratasi)	-2939/-2927	TGAACTaTTACCT	β -ossidazione nei perossisomi
Citocromo P450IVA6 (CYP4A6)	-650/-662 -728/-740 -27/-1	TCACTTtTGCCCT TGGCCTtTGTCCT TGACCTtTGCCCA	ω -ossidazione degli acidi grassi
L-fatty acid binding protein (l-FABP)	-68/-56	TGACCTaTGCCCT	Trasporto lipidi
Adipocyte fatty acid binding protein (aP2)	-5222/-5209	TGAACTcTGATCC	Trasporto lipidi
Enzima malico	-328/-340	TCAACTtTGACCC	Sintesi acidi grassi
Lipoprotein Lipasi (LPL)	-169/-157	TGCCCTtTCCCCC	Idrolisi dei trigliceridi
apoA-I	-212/-197	TGACCCcTGCCCCT	Componente delle HDL
apoA-II	-734/-716	CAACCTtTACCCT	Componente delle HDL
HMG-CoA sintetasi	-104/-92	AGACCTtTGGCCC	Chetogenesi
Acyl-CoA sintetasi	-175/-154	TGACTGaTGCCCT	Formazione di esteri del acyl-CoA

Tabella 1: Elenco dei principali PPRE, e della loro localizzazione a livello del promotore dei geni target e delle principali funzioni metaboliche delle proteine codificate da tali geni.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ)

Struttura del gene ed isoforme.

Il PPAR- γ è codificato dal gene PPARG (NR1C3), localizzato sul cromosoma 3.

Tale gene presenta otto esoni e la sua struttura è riassunta nella figura 2.

I trascritti di tale gene, prodotti per splicing alternativo sono 4. L'mRNA delle isoforme 1, 3 e 4 codificano la stessa proteina di 477 aminoacidi (PPAR γ 1), in quanto differiscono unicamente nella struttura della sequenza 5'UTR. L'isoforma 2 differisce invece per la presenza di una sequenza aggiuntiva localizzata a monte e porta alla sintesi di una proteina con 28 aminoacidi aggiuntivi rispetto alla isoforma 1 (PPAR γ 2). Le diverse isoforme presentano una distribuzione tissutale caratteristica. L'isoforma γ 2 è invece riscontrata unicamente a livello del tessuto adiposo.

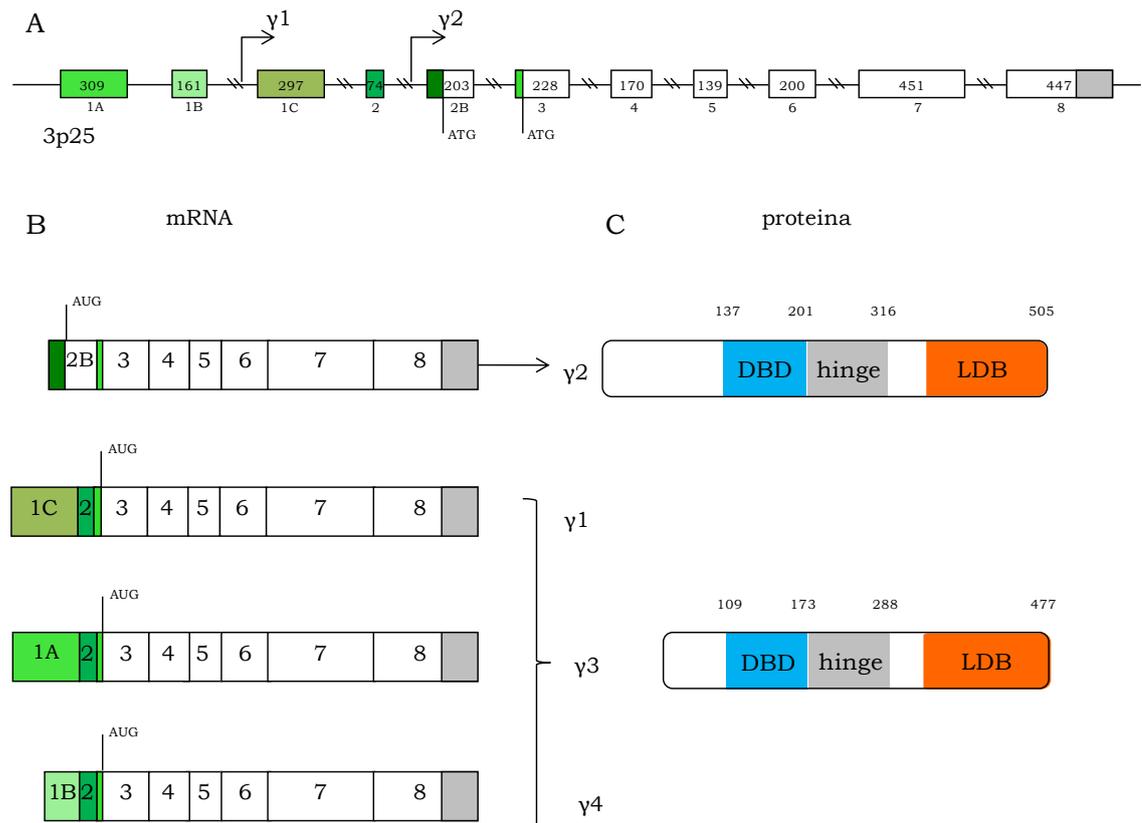


Figura 2 Rappresentazione schematica del gene NR1C3 (A) costituito da 8 esoni. Nel pannello B sono indicate i differenti mRNA prodotti, che portano alla produzione di 2 isoforme PPAR- γ 2, proteina di 505 aminoacidi e PPAR- γ 1 di 477 aminoacidi. I 3 mRNA indicati come γ 1, γ 3, γ 4, vengono tutti tradotti nell'isoforma PPAR- γ 1 e differiscono per la lunghezza della sequenza 5'UTR (rappresentata in verde).

Isoforma mRNA	Proteina	Tessuto
PPAR- γ 1	PPAR- γ 1	Tessuto adiposo, intestino, rene, sistema immunitario, cellule ematopoietiche, fegato, muscolo scheletrico
PPAR- γ 2	PPAR- γ 2	Tessuto adiposo
PPAR- γ 3	PPAR- γ 1	Tessuto adiposo, macrofagi, colon
PPAR- γ 4	PPAR- γ 1	Non definito

Tabella 2: distribuzione tissutale delle diverse isoforme del PPAR- γ

Attività trascrizionale del PPAR- γ

Analogamente ad altri recettori nucleari, in assenza del ligando il PPAR- γ è legato a corepressori (in particolare SMRT e NcoR), che reprimono la trascrizioni di geni target. Il legame con il ligando provoca un cambiamento conformazionale che determina l'esposizione di siti di legami con i coattivatori, p160/SRC, hystone acetil transferasi CBP e p300, che si combinano con il NR a livello della regione AF-2 del LBD. Un altro coattivatore critico, per la regolazione metabolica è PGC-1 (24), indotto dall'attività muscolare e dall'esposizione alle basse temperature, che aumentano in modo netto l'espressione dell'mRNA per PGC-1. Quest'ultimo è in grado di legare il recettore anche in assenza del ligando a livello di una zona posta tra il DBD e la hinge-region. PGC-1 resenta un ruolo fondamentale nella regolazione trascrizionale gene-specifica, per esempio è un potente induttore della uncoupling protein 1 (UCP1), ma non di aP2 (fatty acid binding protein 4, FABP4).

Alcune evidenze suggeriscono che anche il legame costitutivo con i corepressori, sia gene specifico. Per esempio a livello del promotore del gene codificante per la fatty acid binding protein 4 (FABP4), espresso durante l'adipogenesi, il PPAR- γ è costitutivamente legato a coattivatori, a differenza di quanto avviene nel caso della glicerolo kinasi (GyK), associata invece a corepressori (25).

La possibilità di un legame con i coattivatori, anche in assenza del ligando, spiegherebbe l'attività trascrizionale costitutiva del PPAR- γ , osservata in vivo. Questa possibilità è verosimilmente determinata dalla struttura dell'elica H12, posta in una posizione più prossima al corpo del recettore rispetto a quanto avviene in altri NR. Tale collocazione spaziale sembrerebbe agevolare il legame con i coattivatori (26).

Sono state descritte inoltre, alcune modificazioni post-trascrizionali che possono regolare l'attività del PPAR- γ , quali la fosforilazione della serina 112 che riduce l'attività trascrizionale (27).

La sumoylation ligando-dipendente del PPAR- γ , previene lo scambio tra corepressori e coattivatori determinando inibizione trascrizionale. Questo è stato dimostrato per esempio nei macrofagi murini ed avrebbe un effetto immunosoppressivo (28).

Infine un altro meccanismo di regolazione operato dal PPAR- γ , sembrerebbe il legame diretto con alcuni fattori nucleari quali il nuclear factor KB (NF-KB) e l'activator protein (AP-1). Tale fenomeno sembrerebbe alla base dell'effetto anti-infiammatorio esercitato dagli agonisti del PPAR- γ (29).

Ligandi del PPAR- γ

Nonostante, in vitro, numerosi composti si siano dimostrati in grado di legare il PPAR- γ , il ligando "naturale" non è noto. Diversi ligandi sono stati riportati, quali acidi grassi polinsaturi a lunga catena, derivati dell'acido arachidonico ed acidi grassi derivati da LDL ossidate. Molti di essi, sono dotati di una bassa affinità di legame. La spiegazione della presenza di così numerosi ligandi, risiede nella caratteristica conformazione del LBD del PPAR γ . Essa presenta un'addizionale alfa-elica H2' che conferisce alla tasca idrofobica una dimensione molto ampia (1400 Å); inoltre la presenza di una struttura a tre braccia, poste a forma di Y, permette il legame con diversi acidi grassi. (26).

La prostaglandina ciclopentone, 15dPGJ₂, considerata originariamente il ligando naturale putativo e pertanto spesso utilizzata per studi in vitro, è stata attualmente messo in discussione: infatti la sua produzione in vivo è estremamente ridotta, durante la differenziazione degli adipociti, periodo in cui, al contrario, l'espressione di PPAR- γ è massima.

In conclusione, al momento, non è noto se il PPAR- γ , abbia un solo ligando endogeno, ad alta affinità non ancora identificato o se, al contrario, agisca come una sorta di "sensore lipidico", attivato da differenti acidi grassi o eicosanoidi dotati di debole affinità recettoriale.

Gli unici agonisti completi del PPAR- γ ad oggi identificati, sono in realtà delle sostanze farmacologiche, le più note dei quali, sono i tiazolinedioni (TZD), tra cui il troglitazone, il pioglitazone e rosiglitazone. Tali composti presentano un effetto insulino-sensibilizzante, determinando un miglioramento del compenso glicemico in soggetti diabetici; tuttavia si associano ad incremento ponderale per aumento dell'adipogenesi e probabilmente ad edema per accumulo di liquidi, fenomeno che potrebbe peggiorare cardiopatie preesistenti. Per tale ragione si è cercato di produrre composti, denominati SPPARMs, che modulano in modo selettivo le azioni del PPAR- γ , attraverso un diverso reclutamento di corepressori e coattivatori. Per esempio F-MOC-L-leucina recluta SRC-1, mentre i TZD inducono il legame con TIF-2, che regola l'up-regulation di geni coinvolti nell'adipogenesi. Questo differente comportamento spiegherebbe i diversi effetti in vivo di questi composti (30). Non è chiaro in quale tessuto i TZD agiscano prevalentemente. Alcune evidenze suggeriscono che il tessuto bersaglio sia il tessuto adiposo, in cui il PPAR- γ presenta la maggiore espressione. A supportare questa ipotesi è l'osservazione che i topi privi di tessuto adiposo, sono infatti refrattari all'azione dei TZD (31).

Funzioni metaboliche del PPAR- γ

Diverse evidenze, suggeriscono che il PPAR- γ rivesta un ruolo cruciale nella regolazione delle funzioni degli adipociti (32, 33): in particolare durante la differenziazione dei preadipociti in adipociti, il PPAR- γ regola l'espressione di geni chiave per le funzioni metaboliche dell'adipocita, quali aP2 (32), fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) (34), fatty acid transporter (FATP-1) (35) e la lipoprotein lipasi (LPL) (22).

A dimostrazione di ciò, i topi KO per il PPAR- γ (36, 37) presentano depositi di tessuto adiposo ridotti, negli eterozigoti, e virtualmente assenti nei topi con delezione omozigote del gene. Sebbene altri fattori di trascrizione siano coinvolti nella regolazione dell'adipogenesi, quali C/EBPs, ADD-1/SREBP, numerose evidenze, suggeriscono la centralità del PPAR- γ (38).

L'isoforma γ 2, in particolare, sembrerebbe la maggiore responsabile della regolazione trascrizionale a livello adipocitario, come dimostrato da modelli animali di delezione selettiva di tale isoforma, che presentano lipodistrofia

parziale; inoltre i pre adipociti prelevati da tali animali, non sono in grado di differenziarsi in adipociti maturi (39).

Come precedentemente ricordato, i tiazolinedioni sono agenti ipoglicemizzanti, con effetto l'insulinosensibilizzante, che però non modificano la secrezione insulinica, da parte delle cellule beta-pancreatiche. La scoperta che tali molecole sono agonisti ad alta affinità del PPAR- γ , suggerito un ruolo di tale recettore nucleare, anche nel metabolismo glucidico e nel controllo della sensibilità insulinica: pertanto è stato considerato come possibile gene candidato, in famiglie con individui affetti da severa insulinoresistenza. Il meccanismo molecolare di tale regolazione non è completamente chiarito; tuttavia è stato dimostrato che l'attivazione del PPAR- γ determina l'incremento dell'espressione di GLUT4 e altri geni importanti per l'omeostasi glicemica, a livello degli adipociti. Un'altra ipotesi è che il PPAR- γ regoli il flusso di acidi grassi nell'organismo, stimolandone l'up-take a livello muscolare o adiposo. È infatti noto che gli acidi grassi possano avere un effetto di lipotossicità, incrementando l'insulinoresistenza. Tale meccanismo sembrerebbe confermato dal fatto che il PPAR- γ attivi una cascata di geni coinvolti nell'idrolisi dei trigliceridi (lipoprotein lipasi), uptake ed esterificazione degli acidi grassi (fatty acid translocase, CD36, fatty acid transport protein, FATP, acylCoa sintetasi), lipogenesi e sintesi dei trigliceridi (fosfoenol-piruvato carbossichinasi e glicerolo chinasi).

Infine l'azione insulino-sensibilizzante dei TZD potrebbe essere mediata anche dagli ormoni secreti dal tessuto adiposo. L'adiponectina, la cui secrezione è inversamente proporzionale alla massa di tessuto adiposo bianco, è up-regolata dai TZD, inoltre la sua produzione è ridotta nei soggetti con mutazioni del PPAR- γ (40). La leptina invece presenta una correlazione diretta con la massa adiposa e regola l'appetito nei soggetti umani (41). In soggetti lipodistrofici, i livelli di leptina sono ridotti e la somministrazione di questo ormone determina miglioramento della sensibilità insulinica (42). La resistina, che invece promuove l'insulinoresistenza, è ridotta dalla somministrazione di TZD (43). Un'altra proteina che appare up-regolata dagli agonisti del PPAR- γ è la 11 β -idrossi-steroido deidrogenasi di tipo 1, che media, a livello epatico e del tessuto adiposo, la produzione di cortisolo dal cortisone, facilitando la differenziazione degli adipociti (44).

Come precedentemente ricordato il PPAR- γ , può inoltre ridurre l'attività del pathway dell'NF-KB, riducendo quindi la produzione di citochine pro infiammatorie, che possono indurre insulino-resistenza.

Per quanto riguarda il metabolismo osseo, diverse evidenze suggeriscono che la stimolazione del PPAR γ determini una differenziazione delle cellule staminali mesenchimali ossee in adipociti, causando una riduzione numerica degli osteoblasti. La conseguenza è una riduzione del BMD. (45). Inoltre il PPAR- γ , sembrerebbe stimolare il reclutamento e la differenziazione degli osteoclasti verosimilmente agendo come regolatore dell'espressione di c-fos (46). Diverse metanalisi suggeriscono che il trattamento con TZD sia una causa di osteoporosi secondaria, determinando un ulteriore peggioramento della qualità dell'osso, già compromessa nei soggetti diabetici (47).

Oltre alle azioni metaboliche appena descritte, il PPAR- γ , presenta altre funzioni, riassunte in tabella 3.

PPAR- γ e sindromi da resistenza recettoriali.

Lo screening di una ampia coorte di famiglie affette da severa insulino-resistenza, presso l'University of Cambridge, ha permesso di identificare le prime due mutazioni di tali gene (V467L e V290M) (48). Questi pazienti presentavano diabete tipo 2 associato a severa insulino-resistenza e ipertensione arteriosa, confermando per la prima volta, il ruolo cruciale del PPAR- γ nel controllo della sensibilità insulinica a livello tissutale. La caratterizzazione funzionale di tali mutazioni suggeriva un effetto di dominanza negativa della proteina mutata, sul recettore wild type (wt), come suggerito dalla ereditarietà autosomica dominante della sindrome.

Successivamente sono state identificate altre mutazioni con perdita di funzione del LBD (49, 50). Le caratteristiche cliniche di questi soggetti, hanno permesso di definire una nuova sindrome da resistenza, che è stata denominata PPAR- γ ligand resistance syndrome (PRLS). I soggetti affetti presentano tutti severa insulino resistenza, presente anche in casi pediatrici (51), precoce insorgenza di diabete mellito, ipertensione arteriosa, acanthosis nigricans, severa dislipidemia ed ipertrofia muscolare; nelle femmine è presente importante iperandrogenismo accompagnato da

irsutismo in un quadro simile alla sindrome dell'ovaio policistico. Frequentemente si osserva infertilità, poliabortività ed un elevato rischio di eclampsia. Il fenotipo caratteristico di questi soggetti è la presenza di un quadro stereotipato di lipodistrofia parziale, più evidente nei soggetti di sesso femminile, con perdita di tessuto adiposo sottocutaneo a livello degli arti e della regione glutea, con mantenimento dei depositi viscerali e sottocutanei addominali.

In seguito vennero individuate anche mutazioni determinanti perdita di funzione del PPAR- γ . Una di esse venne identificata in una famiglia con diversi membri affetti da insulino-resistenza accompagnata da acanthosis (51). La mutazione presente in questi soggetti provocava lo stop prematuro del NR a livello dell'aminoacido 186. Alcuni soggetti eterozigoti per questa mutazione non presentavano manifestazioni, mentre altri erano insulino-resistenti. Dal momento che, analogamente ad altre sindromi da resistenza, le mutazioni con perdita di funzione totale della proteina non determinano un effetto di dominanza negativa, venne proposto un modello digenico di patogenesi della sindrome. Infatti, l'analisi molecolare, estesa ad altri geni candidati, ha permesso di identificare una seconda mutazione frameshift/premature stop nel gene che codifica per la subunità muscolo-specifica della protein fosfatasi di tipo 1 (PPP1R3A). I soggetti con manifestazioni cliniche, risultavano doppi eterozigoti per mutazioni digeniche, che singolarmente non erano in grado di determinare la sindrome.

Altre condizioni cliniche associate a mutazioni del PPAR- γ

Ristow e collaboratori (52) hanno descritto una differente variante genetica del PPAR- γ (P115Q) in soggetti affetti da obesità severa. Tale mutazione distrugge il sito di fosforilazione della serina 112, e determina attivazione costitutiva del recettore, stimolando l'adipogenesi e promuovendo l'obesità. Sorprendentemente un modello animale che presenta la stessa mutazione non presenta obesità, ma protezione dall'insulino-resistenza, se alimentato con dieta ipercalorica (53).

Studi di popolazione hanno evidenziato un polimorfismo Pro12Ala, a livello dell'N terminus, che conferirebbe una ridotta attività trascrizionale in vitro e

migliore sensibilità insulinica in vivo. Tale polimorfismo sembrerebbe protettivo nei confronti dello sviluppo di diabete tipo 2, di insulino-resistenza (54) di eventi cardiovascolare (55) e dallo sviluppo di sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) (56).

	Azione degli agonisti del PPAR-γ	Importanza clinica	Referenze
Macrofagi	Upregolazione di CD36 (scavenger LDL) nella placca ateromasica, aumentandone le dimensioni	Il pioglitazione avere un ruolo vasoprotettivo (minore progressione di aterosclerosi coronarica, rispetto a glimepiride)	Tontonoz 1997
	Riduzione IL-6, TNF- α		Chawla 2001 Chinetti 2001 Ricote 1998 Nissen, 2008
Endotelio	Incremento rilascio C-Natriuretico atriale (vasodilatazione)	Riduzione della pressione arteriosa in diabetici trattati con TZD; è stato osservato un incremento di eventi avversi cardiaci (maggiore per il rosigitazione)	Ogihara 1995
	Inibizione endotelina		Doi 1998, Satoh, 1999
	Attività calcio-antagonista		Nakamura, 1998 Lago 2007
Neoplasie	Arresto crescita e ciclo cellulare in HIB-1B cell trasformate	Controversa, tuttavia diverse recenti metanalisi suggeriscono che il pioglitazione sia associato ad un incremento del rischio di carcinoma uroteliale	
	Inibizione della crescita in colture di carcinoma mammario e del colon		Altiok ,1997
	Espressione condizionale in mammella determina comparsa di neoplasie		Mueller, 2000
	Mutazioni somatiche presenti in carcinomi del colon		Elstern, 1998
	Incremento dimensioni dei polipi dopo trattamento con TZD in modelli murini di carcinoma del colon		Sarraf, 1998
	Traslocazioni PAX8/PPARG presenti nel 20% dei carcinomi follicolari della tiroide		Saez 2004
			Kroll, 2000
	Saez, 1998		
	Lefebre, 1998		
	Sarraf, 1998		

Tabella 3: funzioni extra-metaboliche del PPAR- γ

Modelli animali

Due gruppi indipendenti hanno prodotto un modello murino equivalente alla mutazione umana P467L (57, 58). I topi eterozigoti per la mutazione (P465L) esibiscono delle caratteristiche differenti rispetto ai pazienti affetti: il volume totale del tessuto adiposo è uguale al wt, tuttavia presentano una riduzione del grasso viscerale con aumento del tessuto adiposo sottocutaneo; inoltre non sono insulino-resistenti. Unica analogia con la patologia umana, è la presenza di ipertensione arteriosa. Successivamente Gray et al, hanno prodotto un altro modello introducendo la mutazione P465L, in topi ob/ob con deficit di leptina. Tali animali presentano una riduzione della massa adiposa, associata ad una insulino-resistenza e alterazioni metaboliche esacerbate rispetto all'ob/ob non mutato. Zhang e collaboratori hanno invece prodotto un modello di distruzione selettiva del PPAR- γ 2 che presenta il fenotipo di lipodistrofia parziale tipico dei soggetti umani. I preadipociti prelevati da tali animali, non sono in grado di differenziarsi in adipociti maturi, se stimolati in vitro. Tale modello ribadisce l'importanza di questa isoforma nel mediare le azioni del PPAR- γ a livello dell'adipocita (39).

Kubota e collaboratori hanno generato topi PPAR- γ -null. I topi omozigoti per la mutazione hanno una mortalità embrionaria a 10-10.5 dpc. I topi eterozigoti presentavano invece in modo inatteso un normale metabolismo in condizioni basali, mentre in una dieta ad alto contenuto di grassi sono protetti dallo sviluppo di insulino-resistenza. Tale fenomeno è probabilmente dovuto al ridotto incremento delle dimensioni degli adipociti, in questi animali. (36).

METODI

Tutti gli studi sono stati eseguiti previo parere favorevole della commissione etica locale. La paziente ha fornito consenso all'utilizzo dei dati clinici, opportunamente anonimizzati. Le valutazioni sono state eseguite nel rispetto dei principi sanciti nella Dichiarazione di Helsinki.

Screening delle mutazioni del PPAR- γ

Il DNA genomico è stato estratto da leucociti periferici utilizzando il kit QIAamp blood extraction kit (Qiagen). L'iniziale lisi in sucrosio è stata ottenuta con il seguente buffer: 10mM Tris HCl pH 8, 320 mM sucrosio, 5 mM MgCl₂, 1% v/v Triton-X-100. Per ottenere la lisi 5 ml di sangue in EDTA sono stati incubati con 50 ml di lysis buffer, durante rotazione. I leucociti sono stati recuperati mediante centrifugazione e risospesi in PBS sterile. Successivamente il DNA è stato estratto seguendo le istruzioni del kit. Il prodotto della PCR è stato purificato mediante precipitazione con PEG.

L'amplificazione è stata ottenuta a partire da 250 ng di DNA utilizzando reagenti Bioline (bioTaq, 10x reaction buffer, MgCl₂). I primer per l'amplificazione della sequenza codificante del PPAR- γ , utilizzati alla concentrazione 0.2 μ M, sono riassunti in tabella 4 e sono stati prodotti da Sigma. Le condizioni della PCR sono le seguenti: denaturazione iniziale 94°C per 2 minuti, seguiti da 35 cicli (94°C per 50 secondi, annealing per 50 secondi, extension 72° C per 50 secondi) seguiti da 10 minuti a 72°C.

Il sequenziamento è stato eseguito utilizzando il kit dye terminator della Perkin Elmer (USA) contenente una soluzione premiscelata di dNTPs dye labelled, Taq polymerase e MgCl₂. I cicli della reazione sono i seguenti: 94°C per 30 secondi, 60 per 2 minuti e 72°C per 30 secondi, seguiti da uno step di estensione finale di 72°C. Il prodotto è stato sottoposto a precipitazione in etanolo 100% (2.5 volumi) e 3M NaOAc (1/10 del volume della reazione) ed incubato in ghiaccio secco per 25 minuti. Dopo lavaggio del pellet con etanolo 70%, decantazione ed evaporazione dei residui di etanolo, il DNA è stato risospeso in 11 μ l di Hi-Di© Formamide (Applied Biosistem) denaturato a 95°C per 2 minuti e incubata in ghiaccio per 2 minuti prima del sequenziamento (ABI Avant 3100, automated sequence analyser).

Primer	Sequenza
Esone B forward (PPAR γ 2)	5'-ATATCAGTGTGAATTACAGC-3'
Esone B reverse (PPAR γ 2)	5'-CCTGGAAGACAAACTACAAG3'
Esone 1 forward	5'-AGATTGCTGTGTTCTCTAG-3'
Esone 1 reverse	5'-CCTAGTAGTCTGAAAAGTG-3'
Esone 2 forward	5'-CATGGGATAATTATCCTCTCA-3'
Esone 2 reverse	5'-GGTTCTGCTGAAATGAA-3'
Esone 3 forward	5'-TTCGTGCTTCCATGTGTC-3'
Esone 3 reverse	5'-CTGGTCTGGCAGCTATAATG-3'
Esone 4 forward	5'-GCACAGTGTGTGTTTCAGAGC-3'
Esone 4 reverse	5'-CCAATGAAGACAGCAGAAG-3'
Esone 5 forward	5'-AGTTAGAAATCTCCAAGTCATCCCACG-3'
Esone 5 reverse	5'-TCATCCCACCCTCTTTCATAGAAGATC-3'
Esone 6 forward	5'-TGAACCCCTGTTGTGTTTTCCATATG-3'
Esone 6 reverse	5'-AGGGAAATGTTGGCAGTGGCTCAGGAC-3'

Mutagenesi

Il cDNA del PPAR- γ 1 e PPAR- γ 2 è stato precedentemente ottenuto da retrotrascrizione a partire da RNA di preadipociti umani, ed è stato clonato nel vettore di espressione pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Netherlands) da Maria Adams (Adams, 1999). La mutazione R184W è stata introdotta mediante mutagenesi diretta utilizzando il kit Quik-change®, utilizzando i seguenti primer specifici

GCCATCAGGTTTGGGTGGATGCCACAGGCCGAGAAGG
CCTTCTCGGCCTGTGGCATCCACCCAAACCTGATGGC

Il Kit comprende XL-1 blue supercompetent cells E. Coli che sono state trasformate dopo digestione del DNA parentale e seminate in piastre Luria-Bertani (LB) ampicillina agar. Le colonie positive per la mutazione sono state screenate mediante sequenziamento diretto. Le miniprep sono state allestite con 3 ml di Luria-Bertani (LB) medium + ampicillina inoculate con una singola colonia batterica ed incubate overnight in un incubatore con orbital shaker.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Le proteine marcate con ^{35}S -metionina, utilizzate per il saggio EMSA (RXR, PPAR- γ 1 e PPAR- γ 2), sono state traslate in vitro mediante il TNT coupled reticulocyte lysate kit® (Promega, UK) a partire dai corrispondenti vettori di espressione.

Per il saggio è stata utilizzata una sonda corrispondente alla sequenza del PPARE del hFABP4 (aP2) marcato con ^{32}P (Tabella 1), ottenuta utilizzando semi-overlapping DNA duplexes uniti utilizzando il frammento della Klenow della DNA polimerasi di tipo I (Roche Diagnostic) in presenza di $^{32}\text{PdCTP}$ (1000 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) e 70 μM di dATP, dGTP e dTTP non marcati. I nucleotidi non incorporati, sono stati rimossi utilizzando colonne Sephadex G-50.

Per l'assay 1 nM di oligonucleotide sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con le proteine traslate in shift buffer composto da 20 mM Hepes pH 7.8, 50 mM KCl, 10% glicerolo e 2 mM DTT). Per separare i complessi DNA/proteine, la reazione è stata corsa in gel non denaturante 5-6% poliacrilamide (0.1x14x14 cm) precedentemente sottoposto ad elettroforesi a 300 V per 30 minuti in un apparato per gel-elettroforesi (Biorad) raffreddato a 0-5°C. L'elettroforesi è stata condotta a 300 V per 90 minuti. Successivamente il gel è stato fissato, disidratato a 80°C per 45 minuti su Wathman paper.

Il gel, contenente i prodotti marcati è stato posto in una cassetta per X-ray. La lastra fotografica esposta overnight a -70°C, è stata successivamente sviluppata.

Saggio di trasfezione transiente

Per tali esperimenti sono state utilizzate 293-EBNA cells (derivate da fibroblasti renali umani) coltivate in Dulbecco Eagle Modified Medium (DMEM) addizionato con 10% FBS, 1% PSF. Negli esperimenti di trasfezione è stato utilizzato stripped serum ottenuto mediante eliminazione di steroidi con resina di Dowex a scambio ionico (AG-1-X8), miscelata al FBS e lasciata in agitazione su rotore per 24 ore. Lo stripped FBS è stato successivamente

separato dalla resina mediante centrifugazione, filtrato, aliquotato e conservato a -20°C.

Per la trasfezione è stata ottenuta utilizzando una soluzione contenente Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen), 50 ng di vettore di espressione di PPAR- γ 1 o γ 2, 200 ng del reporter hFABP4-TK-LUC (precedentemente ottenuto da Agostini) e 200 ng del controllo interno cioè il plasmide Bos- β -Gal (precedentemente ottenuto da Agostini). Le cellule seminate in 96 well plates DMEM 10% stripped FBS, 1% PSF sono state crescite fino a una confluenza del 60-70% prima della trasfezione. A distanza di 6 ore, il medium contenente la soluzione di trasfezione è stato aspirato e sostituito con medium contenente l'opportuna concentrazione (0, 10, 100, 1000 nM) di rosiglitazone o del ligando a bassa affinità PGJ2. L'assay è stato eseguito a distanza di 16 ore dalla trasfezione. Le cellule sono state lisate direttamente nella plate utilizzando 100 μ l di lysis buffer gly-gly buffer (25 mM glycine-glycine buffer pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA), con 1 mM DTT e 1% Triton-x-100 a temperatura ambiente per 20 minuti in rotazione. 50 μ l sono stati prelevati per la valutazione dell'attività beta-galattosidasi e posti in una seconda plate a cui sono stati aggiunti 150 μ l del reaction buffer (63 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 14 mM NaH₂PO₄*2H₂O, 1 mM MgCl₂, 14 mM β -mercapto-etanolo, 0.9% o-nitrofenolo- β -D-galactopiranoside (OPNG), incubato a 37°C per 5-30 minuti. L'attività è stata misurata mediante valutazione con dell'assorbimento a 415 nm utilizzando un microtitre plate reader (Molecular Device). Parallelamente è stata eseguita la valutazione dell'attività luciferasica mediante saggio automatico con luminometro utilizzando i seguenti buffer: 300 μ l di reaction buffer (gly-gly buffer con 16.5 mM KH₂PO₄, 2.2 mM ATP, 0.1 mM DTT) iniettato automaticamente in ciascun pozzetto, seguito da iniezione di 100 μ l di soluzione contenente luciferina (gly-gly buffer 0.2 mM luciferina, 10 mM DTT) e acquisizione dell'emissione luminosa dopo 10 secondi.

I risultati della assay della luciferina sono stati normalizzati per l'attività beta galattosidasi ottenuta.

Ogni condizione è stata testata in triplicato ed il risultato finale è stato ottenuto dalla media di 6 diversi esperimenti, condotti in giorni differenti.

Studi clinici

Le valutazioni biochimiche di routine sono state eseguite utilizzando kit commerciali disponibili presso il dipartimento di Clinical Biochemistry (dr. David Hallsal), Addenbrooks Hospital. La determinazione dei livelli di leptina ed adiponectina sono stati eseguiti utilizzando un metodica two site immunoassay messa a punto presso lo stesso dipartimento. I dati di normalità sono stati ricavati da un'ampia coorte di controlli reclutati nella MRC Ely-cohort i cui dati sono stati forniti dal Dipartimento di Epidemiologia Clinica dell'Università di Cambridge. L'Homeostatic modelling assessment of insulin resistance (HOMA-IR) è stato calcolato secondo la formula $\text{insulina} \times \text{glucosio} / 22.5$.

Per la valutazione Dual-Energy X-Ray absorptiometry (DEXA) per quantificare la composizione corporea è stata utilizzata la Lunar Prodigy Pro (GE Healthcare).

La Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS), eseguita presso il Wolfson Brain Imaging Centre Addenbrooke's Hospital Cambridge utilizzando il Whole Body 3T Tim® Trio scanner (Siemens), secondo metodica precedentemente descritta (59). Utilizzando software dedicati (AMARES), è stato calcolato il contenuto adiposo intramiocellulare (Intramyocellular lipid o IMCL) e intra epatico (intra Hepatic lipid o IHL); a livello della regione glutea è stato quantificato il tessuto adiposo viscerale (VAT) e sottocutaneo (SCAT). La tecnica utilizzata sfrutta lo spettro dell' ^1H su sezione T2 pesate, ottenuto da un voxel di un cubo di tessuto della lunghezza di 1.5 cm, localizzato a livello del lobo destro del fegato. Per la quantificazione del IMCL è stato utilizzato un voxel a livello del muscolo soleo. La quantificazione di IHL e IMCL, è stata eseguita relativamente all'acqua e alla creatina, rispettivamente. La misurazione del VAT e SCAT è stata ottenuta utilizzando un metodo semi-automatico utilizzando una mappa di soglie (software-generated threshold map Analyze 7.0, BIR, Mayo Clinic, Rochester MN) combinato con una suddivisione manuale dei due compartimenti adiposi.

CASE REPORT

La paziente descritta nel presente studio, è un soggetto caucasico, di sesso femminile di 31 anni, che presentava severa insulino-resistenza ed irsutismo ed oligomenorrea, che si erano manifestate al menarca, avvenuto all'età di 10 anni.

All'età di 15 anni, in occasione di un episodio di pancreatite acuta, veniva riscontrata la presenza di una severa ipertrigliceridemia (trigliceridi >1000 mg/dl). Veniva posta diagnosi di ipertrigliceridemia familiare ed iniziata terapia con bezafibrato, acidi grassi omega 3 e dieta ipolipidica con discreta risposta clinica.

A 21 anni, a seguito della diagnosi di ipotiroidismo primario autoimmune intraprendeva terapia con levo-tiroxina.

All'età di 23 anni veniva posta diagnosi di sindrome dell'ovaio policistico "classico" a causa del mancato riconoscimento del fenotipo lipodistrofico. La paziente veniva trattata con terapia estro-progestinica e metformina per il rilievo di elevati livelli basali di insulina, in presenza di glicemia ed emoglobina glicata nella norma. La paziente presentava un quadro di irsutismo severo con necessità di rasatura al volto e alopecia frontale.

A 30 anni la paziente intraprendeva una gravidanza gemellare, clomifene indotta. A 12 settimane di gestazione veniva riscontrata ipertensione arteriosa, scarsamente responsiva alla terapia con metil-DOPA. A 20 settimane, diagnosi di eclampsia e morte intrauterina dei due feti e veniva pertanto indotto il parto. Successivamente persistenza di ipertensione arteriosa trattata con sartanici e betabloccanti, con buon compenso. La valutazione ecocardiografia mostrava ipertrofia lieve del ventricolo sinistro, con funzione sistolica conservata.

Successivamente veniva riconosciuto il fenotipo lipodistrofico (Figura 3), e sospettata una PRLS.

L'analisi genetica confermava la presenza di una mutazione del PPARG gene e pertanto la terapia con pioglitazone 30 mg/die veniva associata alla metformina, con buona risposta metabolica.



Figura 3: Fenotipo della paziente inclusa nello studio, che mostra lipodistrofia parziale con marcata riduzione del tessuto adiposo a livello della regione gluteale. Nell'inserto dettaglio della gamba destra che sottolinea la riduzione del tessuto adiposo sottocutaneo con evidenza del circolo venoso e la marcata ipertrofia muscolare.

RISULTATI

Analisi genetica

La mutazione riscontrata nella paziente esaminata, è localizzata a livello del codone 184 (relativamente a PPAR- γ 1; nell'isoforma γ 2 il codone implicato è il 212) e determina la sostituzione della C ancestrale con una T (CGG>TGG), che causa la sostituzione di una arginina con un triptofano (R184W in PPAR- γ 1 e R212W in PPAR- γ 2). Tale aminoacido, localizzato nella hinge region è altamente conservato tra le specie (Fig 4a) e in quasi tutti gli altri NR (Fig 4 b), suggerendo un'importanza rilevante per le funzioni del recettore.

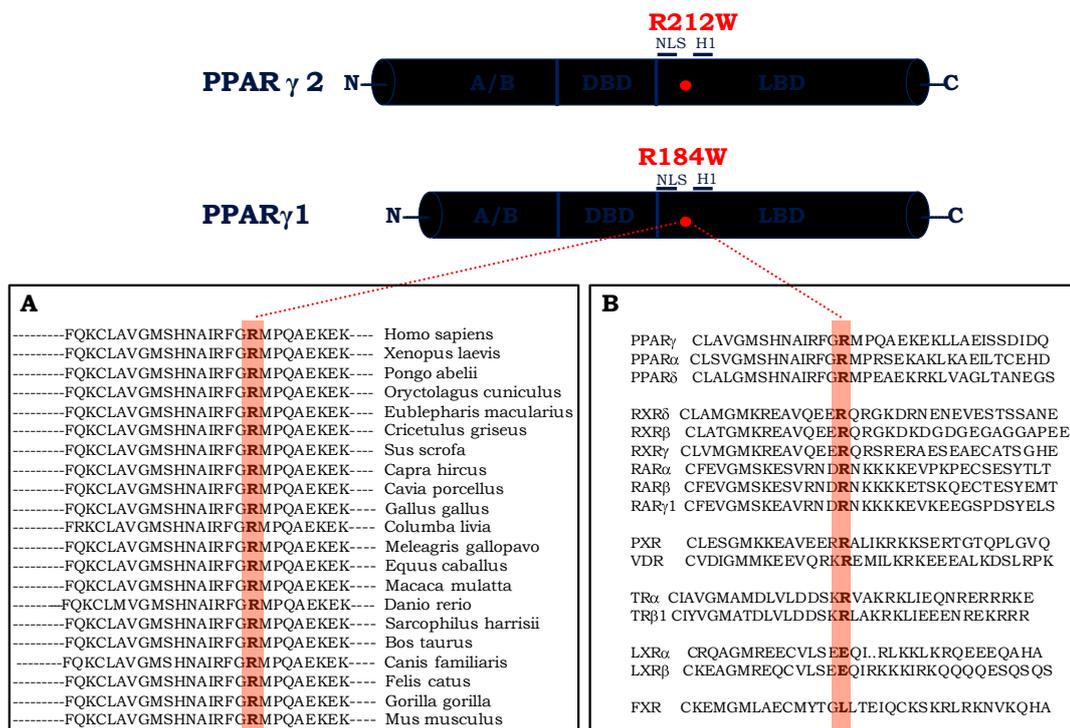


Figura 4 Rappresentazione schematica della mutazione e la posizione nel contesto di PPAR- γ 1 e γ 2. NLS= Nuclear localization signals 2, H1= elica 1 del LBD. A allineamento con ortologi delle principali specie, che mostra conservazione dell'arginina nella posizione 184. B allineamento con altri NR.

Altre informazioni derivano dalla osservazione della struttura cristallografica del PPAR- γ , rappresentata in figura 5. L'arginina 184 è localizzata nella regione “estesa del DBD” a livello della hinge region e prende contatto con il solco minore del DNA stabilizzando il DBD stesso.

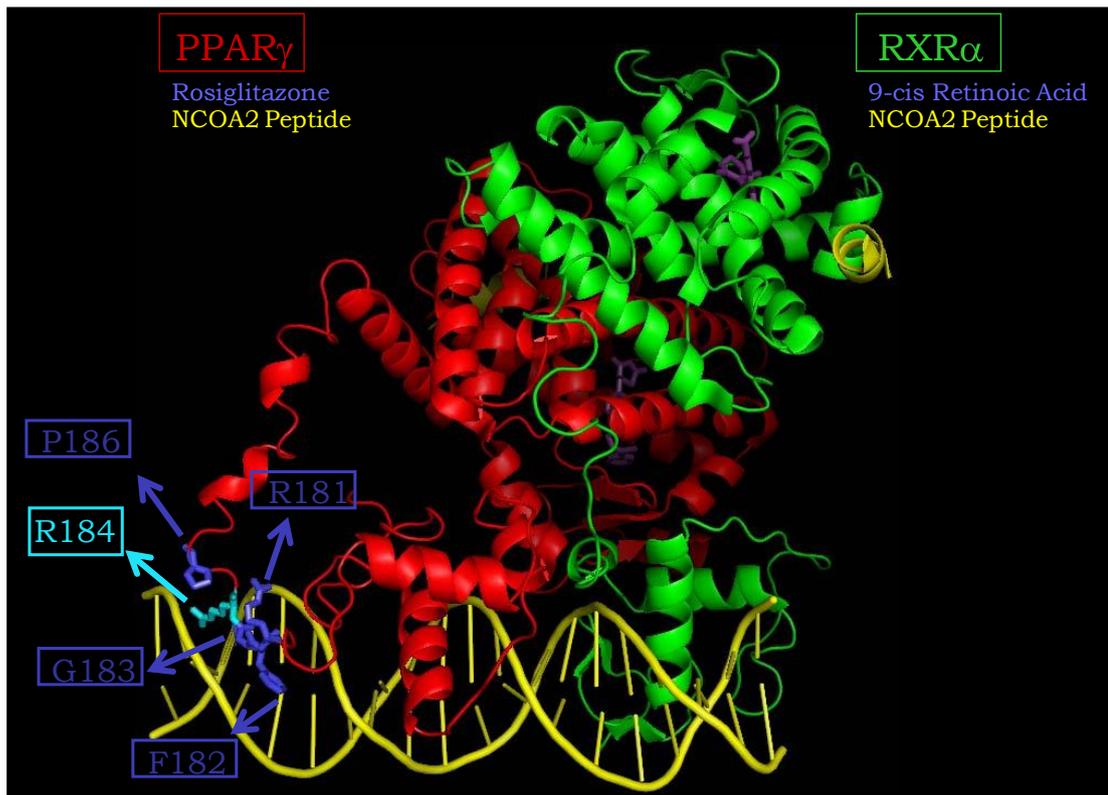


Figura 5: rappresentazione della struttura cristallografica del PPAR- γ (in rosso) con dettaglio degli aminoacidi che compongono la porzione estesa del DBD (in blu), che prende contatto con il solco minore della doppia elica del PPARE (giallo chiaro). Come si può notare l'arginina 184 si trova in una posizione cruciale all'interno di questa porzione (raffigurata in azzurro). La figura mostra inoltre il legame del PPAR- γ con RXR- α (in verde) e con una porzione del Nuclear Coattivator Protein A2 (NCOA2) (giallo scuro). In violetto è invece raffigurato il legame con il ligando sintetico rosiglitazone.

Alterazioni metaboliche

La paziente è stata rivalutata a distanza di circa un mese dalla sospensione della terapia con pioglitazone 30 mg/die e metformina 850 mg x 3 die. Tale interruzione è stata possibile dal momento che la paziente non presentava diabete. Per ragioni di sicurezza, non è stata invece sospeso in trattamento con bezafibrato, in considerazione del precedente episodio di pancreatite, né la terapia antiipertensiva.

I risultati delle indagini biochimiche sono riportati in tabella 5. Sebbene le valutazioni basali siano state eseguite presso un altro laboratorio e non siano perfettamente confrontabili, esse sono indicative di una buona risposta alla terapia con pioglitazone. In terapia con la sola metformina, la paziente presentava livelli di insulina a digiuno elevati (588 pmol/l) e un HOMA-IR di

17.8%; a distanza di circa 2 mesi dall'introduzione del pioglitazone i livelli di insulina e l'HOMA-IR erano 147.3 pmol/l e 4.6%, rispettivamente.

I livelli di androgeni della paziente, nettamente superiori alla norma prima di intraprendere la terapia, mostravano una significativa riduzione, senza però normalizzarsi. Ciò non ha determinato alcun miglioramento dell'irsutismo, ma ha permesso la ripresa di cicli mestruali regolari.

La figura 5 rappresenta i risultati del test da carico orale con glucosio (75 g) eseguito in sospensione da pioglitazone. I box plot corrispondono ai valori di glicemia ed insulina ottenuti dallo studio di 89 soggetti di controllo della cohorte MRC-Ely matchati per sesso ed età. Sebbene i risultati mostrino una normale tolleranza ai carboidrati (glicemia a 120' 132 mg/dl con v.n <140 mg/dl), i livelli di insulina sono nettamente superiori alla norma ed indicativi di una severa insulino-resistenza.

Sono stati inoltre valutati i livelli sierici di adiponectina e leptina, risultati ridotti rispetto a controlli sani, analogamente a quanto già riportato, nei pazienti con lipodistrofia (fig. 6). I valori della paziente portatrice della mutazione R184W sono stati paragonati ad altri soggetti con mutazioni del PPAR- γ e a pazienti con mutazioni di AGPAT2, che causa lipodistrofia totale e LMNA, che invece determina una lipodistrofia parziale. È interessante notare come i livelli di leptina siano risultati prossimi alla soglia di 3.7 ng/ml, che in precedenti pubblicazioni (Guettier, 2008) è stata indicata come il cut-off per un'eventuale terapia sostitutiva con leptina, che si è dimostrata efficace nel migliorare alcune anomalie metaboliche, presenti nei soggetti affetti da lipodistrofia.

	Basale	2 mesi	9 mesi
Terapia	Metformina, ipolipemizzanti ed antiipertensivi	Metformina, pioglitazone, ipolipemizzanti ed antiipertensivi	ipolipemizzanti ed antiipertensivi
glicemia (mg/dl)	91	85	99
Insulina (pmol/l)	588	147.3	294
HOMA-IR (%)	17.8	4.6	11.1
Trigliceridi (mg/dl)	380	-	213
Colesterolo totale (mg/dl)	178	-	151
HDL (mg/dl)	19	-	23
Testosterone (nmol/l)	5.1	2.7	3.7
Δ4androstenedione (nmol/l)	24.4	-	13.6
SHBG (nmol/l)	37	-	34

Tabella 5: andamento degli esami ematici al tempo 0, dopo 2 mesi di terapia con pioglitazone 30 mg/die e a distanza di nove mesi dall'inizio. A questo punto del follow-up la paziente aveva sospeso da circa 30 giorni l'assunzione degli insulino-sensibilizzanti. I livelli di normalità degli androgeni sono: testosterone <3 nmol/l, androstenedione 3.8-11.5 nmol/l, SHBG, 18.0-144.0.

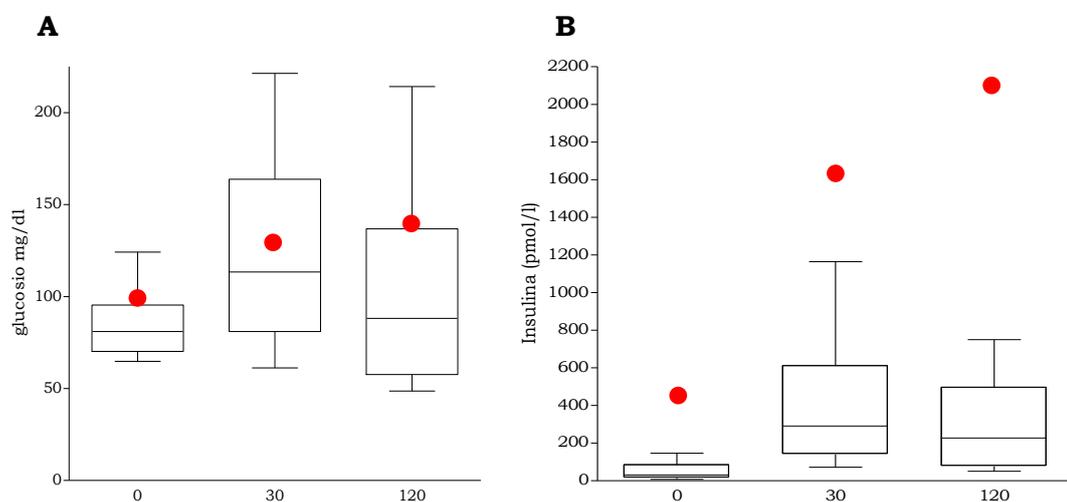


Figura 5: A: valori di glicemia (a sinistra) e B: insulina (a destra) durante OGTT. I risultati della probanda sono indicati in rosso.

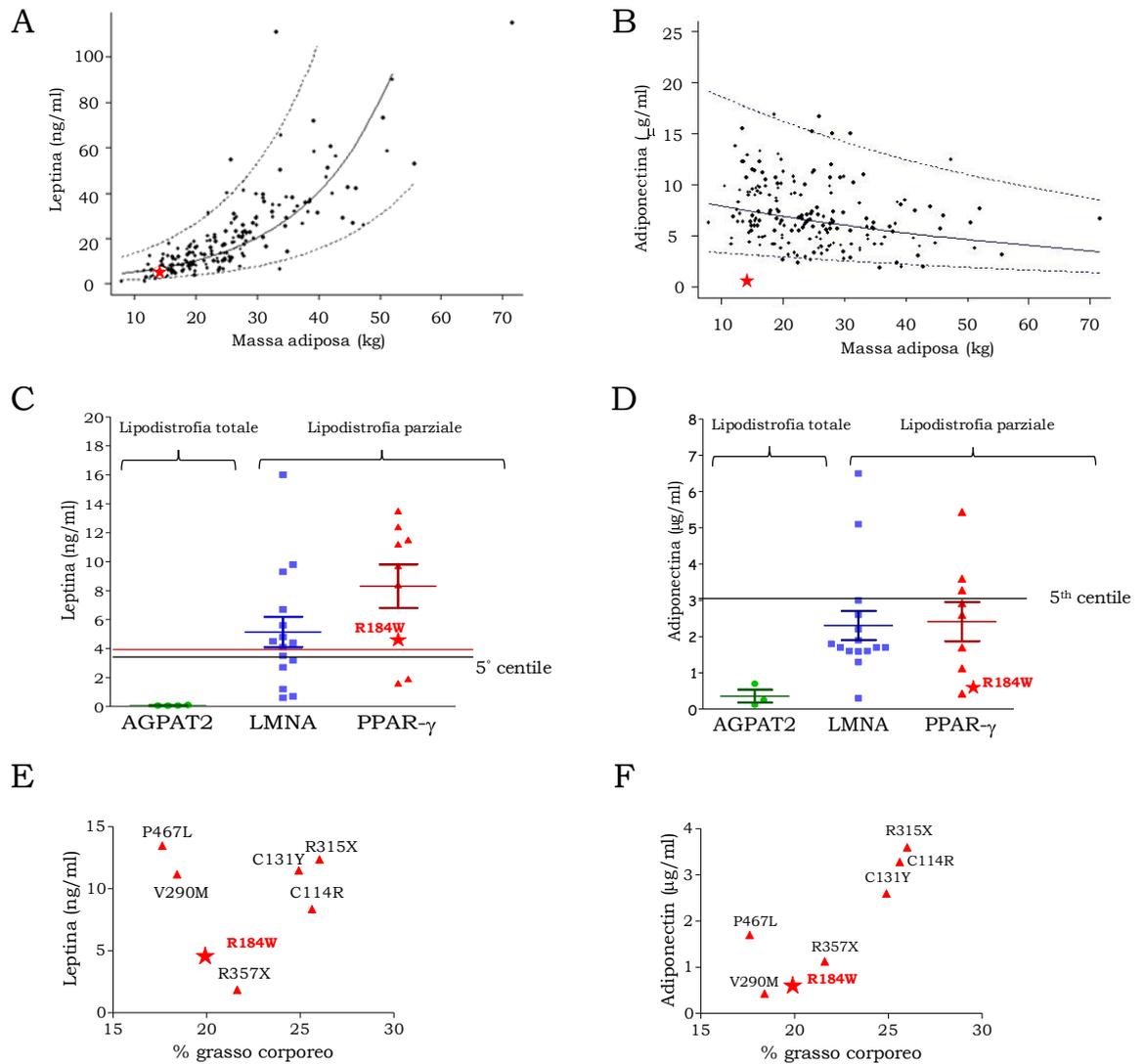


Figura 6: livelli di leptina (A) e adiponectina (B) in una cohorte di 188 soggetti di controllo matchati per sesso ed età. In rosso è indicata la probanda. C e D: livelli di leptina e adiponectina in soggetti con differenti forme di lipodistrofia totale e parziale. Il 5° percentile è indicato in nero. In rosso è indicato la soglia di 3.7 ng/ml al di sotto della quale può essere utile la somministrazione di leptina. La probanda è indicata da una stella. In E ed F sono indicati rispettivamente i livelli di leptina e adiponectina relativamente alla massa adiposa corporea espressa in percentuale sul peso totale di soggetti portatori di differenti mutazioni del PPAR- γ .

Lipodistrofia parziale

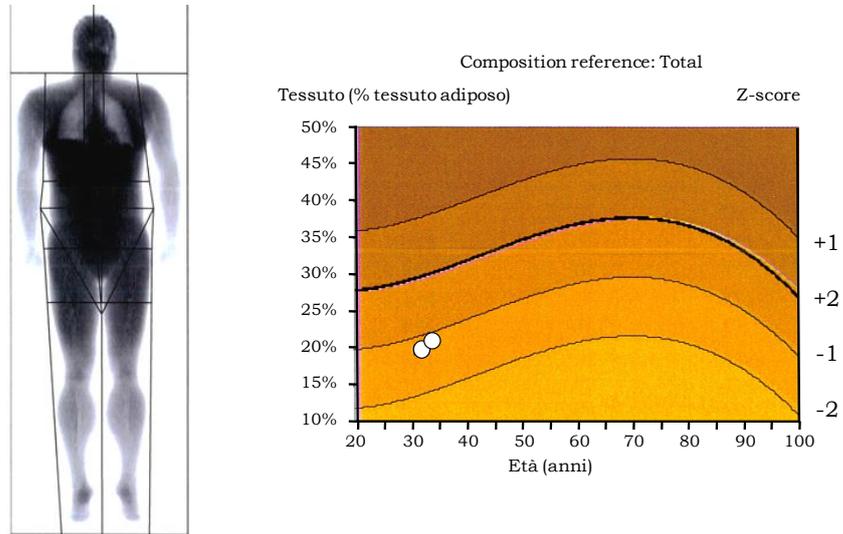
Come più volte ricordato, una delle caratteristiche fenotipiche più evidenti della paziente con mutazione R184W è la presenza di una lipodistrofia parziale, tratto presente anche negli altri pazienti con mutazioni analoghe. Come mostrato in figura 3, la paziente presenta una distribuzione del grasso corporeo tipica, con una netta riduzione del tessuto adiposo sottocutaneo a livello degli arti e della regione glutea. L'assenza virtuale di tale strato rende particolarmente evidente il circolo venoso sottocutaneo, soprattutto a livello degli arti inferiori.

Diverse metodiche consentono di quantificare in modo più preciso la distribuzione del tessuto adiposo. La paziente è stata pertanto sottoposta a indagine DEXA per studio della composizione corporea ed i risultati sono riassunti in figura 7. Sono rappresentati i dati ottenuti in due valutazioni successive a distanza di circa 12 mesi l'una dall'altra. Sebbene molto ravvicinate, tali indagini sembrerebbero suggerire un possibile effetto della terapia con pioglitazone sulla distribuzione del tessuto adiposo, con incremento della massa grassa, come peraltro osservato nei pazienti diabetici trattati con TZD.

Al fine di quantificare in modo più dettagliato le caratteristiche del tessuto adiposo viscerale, abbiamo eseguito RMN e MRS. Utilizzando i software indicati nella sezione dei metodi, è stato possibile visualizzare direttamente il tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale.

A livello della sezione gluteale, l'area occupata da tessuto adiposo sottocutaneo (SCAT) appare significativamente ridotta rispetto ai soggetti di controllo, mentre l'area del VAT ha un'estensione maggiore. Conseguentemente il rapporto SCAT/VAT risulta più sfavorevole nella paziente rispetto ai controlli.

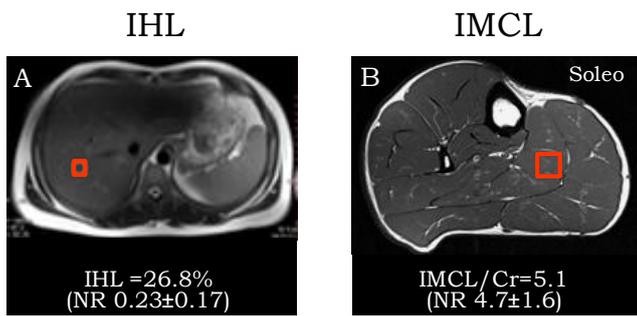
La MRS pesata per l'atomo di idrogeno, consente di misurare in modo non invasivo il contenuto adiposo a livello di organi target, nel caso specifico, il fegato e il tessuto muscolare. Nella paziente con mutazione R184W abbiamo osservato una evidente stasi epatica, con percentuale di lipidi intraepatici quasi 60 volte superiori a soggetti di controllo. A livello del muscolo soleo l'IMCL, pur essendo ai limiti superiori della norma, non risulta significativamente differente rispetto ai controlli.



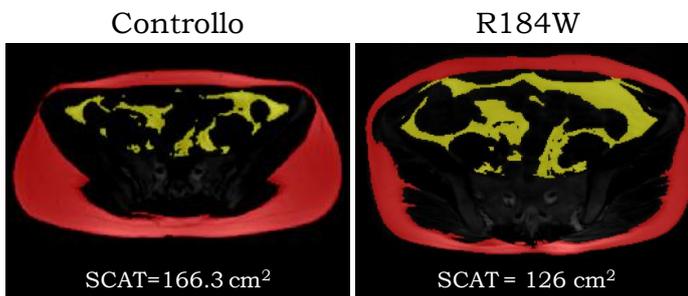
Regione	Tessuto (% tessuto adiposo)		Z-score		Massa totale (kg)		Massa grassa (g)		Massa magra (g)		BMC (g)	
	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010
Total	19.9	20.9	-1.2	-1.1	73	75	14.1	15.2	56.5 (77,35%)	57.4 (76,5%)	2.5	2.5
NV	29.3											

Figura 7: risultati della DEXA della paziente portatrice della mutazione R184W. I cerchi vuoti rappresentano le due indagini successive rappresentate in termini di Z-score rispetto a soggetti della stessa età.

^1H -MRS



RMI gluteale



- Subcutaneous adipose tissue (SCAT)
- Visceral adipose tissue (VAT)



Figura 8: risultati della MRS e RMN della probanda rispetto a controlli che mostrano incremento della concentrazione di lipidi epatici e muscolari e una riduzione del tessuto adiposo sottocutaneo.

La mutazione R184W determina in vitro ridotta attività trascrizionale.

I risultati degli esperimenti di trasfezione transiente mostrano una ridotta attività trascrizionale, quando saggiate con il PPARE “naturale” contenuto nel promoter della hFABP4. Tale ridotta attività trascrizionale, presente in condizioni non stimolate, non viene normalizzata dal trattamento con concentrazioni scalari del ligando sintetico ad alta affinità rosiglitazone o dal ligando endogeno putativo a bassa affinità PGJ2 (Fig. 9).

Al fine di indagare la capacità del PPRA- γ mutato di legare il DNA abbiamo eseguito un saggio di mobilità elettroforetica (EMSA) utilizzando una sonda radioattiva hFABP4(aP2) 32 P-PPARE. I risultati mostrano che la mutazione R184W determina la perdita della capacità di legare il DNA, sia nel contesto dell'isoforma γ 1, sia dell'isoforma γ 2.

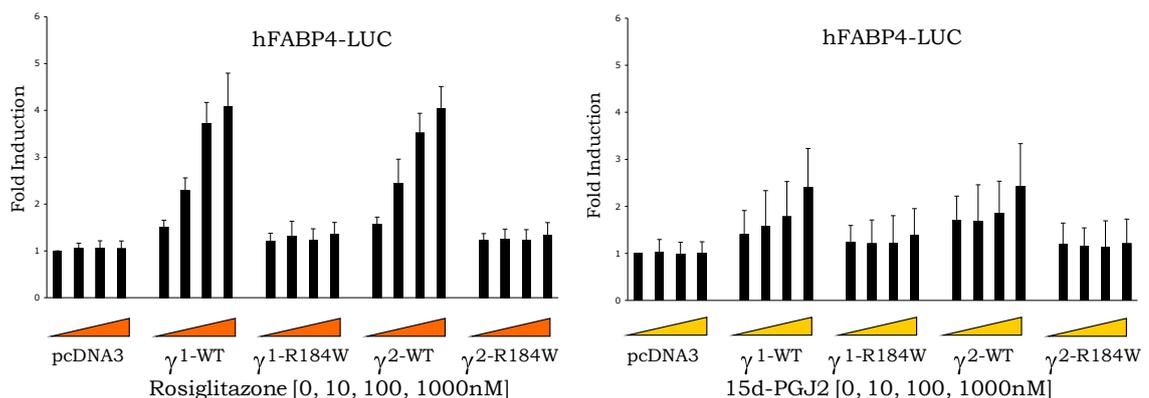


Fig: 9 Risultati della trasfezione transiente utilizzando come reporter il PPARE del hFABP4, in condizioni basali e dopo stimolo con ligandi sintetici e naturali del PPAR- γ

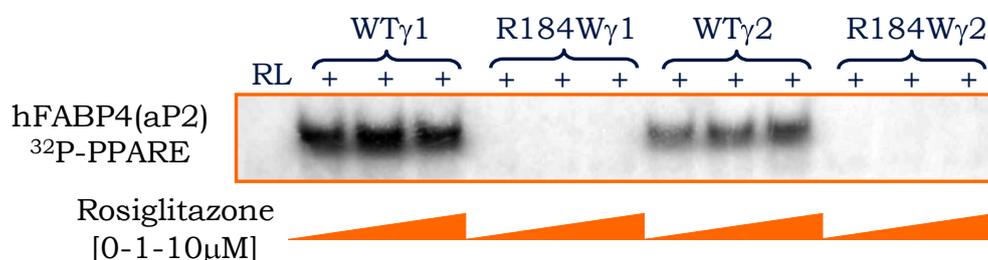


Fig. 10: EMSA assay: la proteina mutata perde la capacità di legare il DNA rispetto al wild type che invece risulta rallentato nella sua migrazione dall'avvenuto legame con sonda a doppia elica (per incremento del peso, sia per modifica della carica elettrica). Tale incapacità di legame non viene modificata dall'incubazione con il ligando ad alta affinità rosiglitazone.

DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo descritto un caso di sindrome da resistenza al ligando del PPAR- γ .

Il quadro clinico della paziente si caratterizza per la presenza del classico fenotipo di lipodistrofia parziale, associato a severa insulino-resistenza, iperandrogenismo, dislipidemia ed ipertensione arteriosa. La lipodistrofia si presenta con una netta riduzione del tessuto adiposo sottocutaneo, accompagnata da una conservata rappresentazione del tessuto adiposo viscerale, con un rapporto SCAT/VAT sfavorevole. Inoltre abbiamo documentato un'importante steatosi epatica, confermata dalla MRS, metodica che consente di ottenere una stima più precisa rispetto a quanto ottenuto con l'ecografia, in modo del tutto non invasivo.

La sindrome è causata da una mutazione in eterozigosi del PPAR- γ , R184W, comune alle due isoforma del recettore e localizzata a livello dell'hinge region, dominio in cui, fino ad ora, non sono state descritte altre varianti. Come indicato in Fig 4, che mostra l'allineamento della sequenza proteica del PPAR- γ umano con i paraloghi e ortologhi, l'arginina 184 è un residuo fortemente conservato tra le varie specie ed in quasi tutti i recettori nucleari. La sostituzione in questa posizione, di un arginina con un triptofano, caratterizzato da una minore polarità e da dimensioni superiori per la presenza di un anello aromatico, potrebbe alterare l'equilibrio dell'hinge region, determinando una minore affinità di legame con il solco minore del DNA ed eventualmente destabilizzare il legame con i nucleotidi posti più a monte del PPARE.

Questa ipotesi è avvalorata dai risultati dell'EMSA, che mostra come la mutazione R184W, abbia perso totalmente l'abilità di legare il DNA e tale anomalia non venga recuperata neppure dal legame con ligando ad alta affinità rosiglitazone.

Altre mutazioni non DNA binding, descritte in precedenza presentano delle caratteristiche cliniche completamente differenti. In particolare, nella famiglia riportata da Savage et al, la mutazione P186X non era in grado, in eterozigosi, di determinare la sindrome. Infatti, il fenotipo di severa insulino-resistenza compariva solo in associazione con una seconda mutazione nel

gene PPP1R3A, anch'esso incapace di terminare alterazioni se presente in eterozigosi semplice. La mutazione P186X, priva del NLS, non è inoltre in grado di traslocare nel nucleo, e il recettore mutato rimane sequestrato nel citoplasma. Pertanto non è associato ad effetto dominant negative.

Questo dato sembra in contrasto con risultati ottenuti da altri gruppi, in cui alcune frameshift mutations caratterizzate da completa perdita del DBD e del LBD (61), sono state associate ad insulino-resistenza e lipodistrofia parziale anche in eterozigosi. Gli autori suggerivano la possibilità di un meccanismo di aploinsufficienza, nel determinare il fenotipo. In questo contesto, l'espressione clinica potrebbe essere influenzata anche da condizioni ambientali, quali lo stile di vita, l'esercizio fisico ed alimentazione e ciò potrebbe giustificare dei risultati così divergenti.

Nel caso della presente mutazione, al contrario, le caratteristiche che abbiamo descritto e alcuni dati preliminari, non mostrati nel presente lavoro, fanno ipotizzare un differente meccanismo patogenetico. In particolare la R184W, sembrerebbe mostrare maggiori analogie con altre mutazioni non DNA-binding, localizzate nel DBD "classico" (62). Tali mutazioni, C114R e C131Y, coinvolgevano 2 delle 4 cisteine che compongono la prima zinc finger. Dal momento che questi aminoacidi presentano una funzione cruciale per la funzione della zinc-finger, il legame con il DNA viene completamente abolito, quando testato con una varietà di differenti PPARE umani.

Pur essendo incapaci di legare il DNA, tali mutazioni erano associate in vitro ad un effetto dominant negative, quando trasfettate con una quantità identica di recettore wt. Studi di pull-down, hanno suggerito che l'effetto dominant negative potesse essere ricondotto alla conservata capacità dei recettori mutati di legare alcuni coattivatori, in modo ligando-dipendente. Conseguentemente al legame con il ligando, si osservava un sequestro dei coattivatori da parte dei NR mutati, rendendoli meno accessibili alla controparte wt. Tale fenomeno potrebbe essere critico in alcuni tessuti e non in altri, come suggerito da alcune mutazioni artificiali che coinvolgono il DBD capaci di inibire l'adipogenesi (63) o la differenziazione delle cellule staminali neuronali (64).

Nel caso della presente mutazione, è verosimile che il legame con il DNA, possa essere abolito per alcuni PPARE e non per altri, che presentano una sequenza differente rispetto a quello del hFABP4, utilizzato per i nostri studi in vitro. È inoltre possibile che i geni che presentano una regolazione mediata da PGC-1, che come ricordato in precedenza ha un sito di legame a livello dell'hinge region, possano essere maggiormente coinvolti, rispetto ad altri.

L'ipotesi che la R184W possa determinare una maggiore compromissione della trascrizione di alcuni geni target e non di altri, sembrerebbe avvalorata dal fenotipo della paziente e dalla ottima risposta alla terapia con TZD. Inoltre, paragonata ad altri casi precedentemente riportati, la probanda sembra avere una minore compromissione del metabolismo glicidico: infatti i risultati dell'OGTT mostrano una normale tolleranza ai carboidrati nonostante la severa insulino-resistenza.

Tuttavia ulteriori studi funzionali sono necessari al fine di avvalorare questa ipotesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Kraus WL, McInerney EM, Katzenellenbogen BS. Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 19;92(26):12314-8.
2. Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*. 1995; 18;375(6528):203-11.
3. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 1999; 64(5):310-9.
4. Hörlein AJ, Näär AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 1995;377(6548):397-404.
5. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(10):381-8.
6. Gampe RT Jr, Montana VG, Lambert MH, Miller AB, Bledsoe RK, Milburn MV, Kliewer SA, Willson TM, Xu HE. Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell*. 2000;5(3):545-55.
7. Lonard DM, O'Malley BW. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(3):126-32.
8. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*. 1997;389(6647):194-8.
9. Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM. Nuclear receptor coactivator ACTR is a

- novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*. 1997;90(3):569-80
10. Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon H, Montminy M, Evans RM. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*. 1996;383(6595):99-103.
 11. Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY, Roeder RG. The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):7939-44.
 12. Rachez C, Gamble M, Chang CP, Atkins GB, Lazar MA, Freedman LP. The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol Cell Biol*. 2000 Apr;20(8):2718-
 13. Atkins GB, Hu X, Guenther MG, Rachez C, Freedman LP, Lazar MA. Coactivators for the orphan nuclear receptor RORalpha. *Mol Endocrinol*. 1999 (9):1550-7.
 14. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 1995;377(6548):454-7.
 15. Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:315-60.
 16. Perissi V, Rosenfeld MG. Review Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jul; 6(7):542-54
 17. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645-50.
 18. Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137(1):354-66.
 19. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999;20(5):649-88.

20. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003;113(2):159-70.
21. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10(4):355-61.
22. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res*. 1996;37(5):907-25.
23. Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, Desvergne B. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1997;272(40):25252-9.
24. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*. 2003;24(1):78-90.
25. Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev*. 2005;19(4):453-61. Jan 28.
26. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-43.
27. Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem*. 1997;272(8):5128-32.
28. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*. 2005;437(7059):759-63
29. Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab*. 2006 Oct;17(8):321-7

30. Picard F, Géhin M, Annicotte J, Rocchi S, Champy MF, O'Malley BW, Chambon P, Auwerx J. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*. 2002;111(7):931-41.
31. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O, Reitman ML. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 2000;106(10):1221-8.
32. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*. 1994;8(10):1224-34.
33. Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9856-60.
34. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol*. 1995;15(1):351-7.
35. Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem*. 1997;272(45):28210-7.
36. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999;4(4):597-609.
37. Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest*. 2000;105(3):287-92.
38. Mueller E, Drori S, Aiyer A, Yie J, Sarraf P, Chen H, Hauser S, Rosen ED, Ge K, Roeder RG, Spiegelman BM. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem*. 2002;277(44):41925-30

39. Zhang J, Fu M, Cui T, Xiong C, Xu K, Zhong W, Xiao Y, Floyd D, Liang J, Li E, Song Q, Chen YE. Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(29):10703-8.
40. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, Tanen M, Berg AH, O'Rahilly S, Savage DB, Chatterjee K, Weiss S, Larson PJ, Gottesdiener KM, Gertz BJ, Charron MJ, Scherer PE, Moller DE. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology*. 2002;143(3):998-1007.
41. Farooqi S, Rau H, Whitehead J, O'Rahilly S. *ob* gene mutations and human obesity. *Proc Nutr Soc*. 1998;57(3):471-5.
42. Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med*. 2002;346(8):570-8
43. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-12.
44. Berger J, Tanen M, Elbrecht A, Hermanowski-Vosatka A, Moller DE, Wright SD, Thieringer R. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit adipocyte 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *J Biol Chem*. 2001;276(16):12629-35
45. Hockley KR, Rosen CJ, Churchill GA, Lecka-Czernik B. PPARgamma2 regulates a molecular signature of marrow mesenchymal stem cells. *PPAR Res*. 2007; 2007:81219
46. Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med*. 2007;13(12):1496-503
47. Lecka-Czernik B. Bone loss in diabetes: use of antidiabetic thiazolidinediones and secondary osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2010;8(4):178-84
48. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with

- severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature*. 1999;402(6764):880-3.
49. Agarwal AK, Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):408-11.
50. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 2002;51(12):3586-90.
51. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, Williams RL, Umpleby AM, Thomas EL, Bell JD, Dixon AK, Dunne F, Boiani R, Cinti S, Vidal-Puig A, Karpe F, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 2003;52(4):910-7.
52. Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med*. 1998;339(14):953-9.
53. Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, Shulman GI, Kaestner KH, Lazar MA. Genetic modulation of PPARgamma phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Dev Cell*. 2003 Oct;5(4):657-63.
54. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J.A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. 1998 ;20(3):284-7.
55. Ridker PM, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Plutzky J, Zee RY Alanine for proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 (PPARG2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(5):859-63.
56. Hahn S, Fingerhut A, Khomtsiv U, Khomtsiv L, Tan S, Quadbeck B, Herrmann BL, Knebel B, Müller-Wieland D, Mann K, Janssen OE. The peroxisome proliferator activated receptor gamma Pro12Ala polymorphism is associated with a lower hirsutism score and increased

- insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62(5):573-9
57. Tsai YS, Kim HJ, Takahashi N, Kim HS, Hagaman JR, Kim JK, Maeda N. Hypertension and abnormal fat distribution but not insulin resistance in mice with P465L PPAR γ . *J Clin Invest*. 2004;114(2):240-9.
58. Gray SL, Dalla Nora E, Backlund EC, Manieri M, Virtue S, Noland RC, O'Rahilly S, Cortright RN, Cinti S, Cannon B, Vidal-Puig A. Decreased brown adipocyte recruitment and thermogenic capacity in mice with impaired peroxisome proliferator-activated receptor (P465L PPAR γ) function. *Endocrinology*. 2006;147(12):5708-14.
59. Rico-Sanz J, Thomas EL, Jenkinson G, Mierisová S, Iles R, Bell JD. Diversity in levels of intracellular total creatine and triglycerides in human skeletal muscles observed by (1)H-MRS. *J Appl Physiol*. 1999 Dec;87(6):2068-72.
60. Guettier JM, Park JY, Cochran EK, Poitou C, Basdevant A, Meier M, Clément K, Magré J, Gorden P. Leptin therapy for partial lipodystrophy linked to a PPAR- γ mutation. *Clin Endocrinol* 2008;68(4):547-54
Clin Endocrinol (Oxf). 2008;68(4):547-54
61. Francis GA, Li G, Casey R, Wang J, Cao H, Leff T, Hegele RA. Peroxisomal proliferator activated receptor- γ deficiency in a Canadian kindred with familial partial lipodystrophy type 3 (FPLD3). *BMC Med Genet*. 2006; 14;7:3.
62. Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, Rajanayagam O, Semple R, Luan J, Bath L, Zalin A, Labib M, Kumar S, Simpson H, Blom D, Marais D, Schwabe J, Barroso I, Trembath R, Wareham N, Nagy L, Gurnell M, O'Rahilly S, Chatterjee K. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPAR γ mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab*. 2006;4(4):303-11.
63. Moore ML, Park EA, McMillin JB. Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase-1 β expression by PGC-1. *J Biol Chem*. 2003;278(19):17263-8.
64. Wada K, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Shibuya A, Kubota N, Terauchi Y, Tachibana M, Miyoshi H, Kamisaki Y, Mayumi T, Kadowaki T, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -

mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem.* 2006;281(18):12673-81.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Beck-Peccoz, relatore della mia tesi, per sua disponibilità e per avermi incoraggiato ad affrontare una nuova e entusiasmante esperienza lavorativa, che ha arricchito la mia formazione scientifica.

Ringrazio inoltre il Prof. V. Krishna Chatterjee, che ha supervisionato il mio lavoro presso l'Università di Cambridge e le altre persone che hanno collaborato alla stesura di questa tesi: Dr.ssa Nadia Schoenmakers, Dr. Erik Schoenmakers, Dr.ssa Alessandra Gambineri, Dr. Robert Sample e il Dr. David Savage.

Un ringraziamento particolare alla Dr.ssa Maura Agostini, senza il cui supporto, non avrei potuto realizzare questo lavoro.