

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI
SCIENZE MORFOLOGICO BIOMEDICHE
Sez. di Anatomia ed Istologia Umana

DOTTORATO DI RICERCA IN
"FISIOPATOLOGIA METABOLICA CONGENITA"

CICLO XIX°

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO
IL "METABOLISMO" DEL SAPORE

S.S.D. BIO-16

Coordinatore:

Prof. Francesco Osculati

Tutor:

Prof. Andrea Sbarbati

Dottorando:

Dott. Marco Tizzano

A.A. 2003-2006

Ai miei genitori, a mia moglie e ai miei figli

INDICE

1

1. Abstract	- 1 -
-------------------	-------

2

2. Prefazione e nota dell'autore	- 4 -
--	-------

3

3. Introduzione.....	- 4 -
3.1. Anatomia del gusto	- 4 -
3.2. L'olfatto.....	- 6 -
3.3. Breve descrizione della trasmissione nervosa del gusto e dell'olfatto	- 6 -
3.4. Il sistema gustativo	- 7 -
3.4.1. Come vengono percepiti i differenti gusti?.....	- 8 -
3.4.2. Il gusto dolce	- 9 -
3.4.3. Il gusto umami	- 11 -
3.4.4. Il gusto amaro	- 12 -
3.4.5. I gusti salato e acido	- 14 -
3.4.6. La trasduzione del segnale a valle dei T1Rs e T2Rs.....	- 15 -
3.4.7. "Labelled-line model" per la codifica del gusto alla periferia	- 16 -
3.4.7.1. Amaro	- 17 -
3.4.7.2. Amaro e dolce.....	- 17 -
3.4.7.3. Amaro, dolce e acido.....	- 18 -
3.4.8. "L'eccitante viaggio" dalla rilevazione alla percezione.....	- 18 -
3.5. Il sistema chemosensoriale diffuso (diffuse chemosensory system - DCS).....	- 19 -
3.5.1. Anatomia del sistema gustativo periferico.....	- 20 -
3.5.2. Marcatori associati al gusto.....	- 20 -
3.5.2.1. Subunità α della G protein "gustducina" (α -gustducin).....	- 21 -
3.5.2.2. Espressione di elementi del meccanismo di trasduzione del gusto amaro fuori dai calici gustativi.....	- 21 -
3.5.3. Un'elemento "classico" del DCS - le "brush cells".....	- 21 -
3.5.3.1. Localizzazione delle BCs in diversi organi.....	- 22 -
3.5.3.2. Caratteristiche fenotipiche e morfologiche delle BCs.....	- 22 -
3.5.3.3. Considerazioni generali sulle BCs.....	- 23 -
3.5.4. Elementi chemosensoriali solitari del DCS - le "solitary chemosensory cells - SCCs".....	- 23 -
3.5.4.1. Considerazioni anatomiche comparative.....	- 23 -
3.5.4.2. SCCs nella cavità orale.....	- 25 -
3.5.4.3. SCCs nella cavità nasali.....	- 26 -
3.5.4.4. SCCs nella laringe.....	- 28 -
3.5.4.5. SCCs nella trachea e bronchi.....	- 29 -
3.5.4.6. Considerazioni generali riguardo le SCCs.....	- 31 -
3.5.5. Somiglianze e differenze fra il sistema gustativo primario e il DCS	- 32 -
3.5.6. Clusters chemosensoriali	- 32 -
3.5.7. Il ruolo del DCS.....	- 33 -
3.6. Patologie congenite dell'apparato respiratorio e gastrointestinale, rigenerazione del fegato, chemorecezione e sistema chemosensoriale diffuso.....	- 34 -

4

4. Scopi del dottorato.....	- 37 -
-----------------------------	--------

5

5. Materiali e Metodi	- 39 -
5.1. Materiali	- 39 -
5.1.1. Animali da laboratorio.....	- 39 -
5.1.2. Strumenti da laboratorio	- 39 -
5.1.3. Softwares utilizzati	- 39 -
5.1.4. Links di pagine internet utilizzati	- 40 -

5.2. Metodi	- 40 -
5.2.1. Perfusione degli animali, fissaggio con paraformaldeide e crioprotezione dei tessuti fissati.....	- 40 -
5.2.2. Epatectomia parziale di fegato di ratto	- 40 -
5.2.3. Produzione di sezioni su vetrino al microtomo per immunistoichimica (IHC).....	- 41 -
5.2.4. Produzione di sezioni su vetrino al criostato per ibridizzazione insitu (ISH) e immunistoichimica (IHC).....	- 41 -
5.2.5. Estrazione dell'RNA totale e purificazione dell'RNA messaggero	- 41 -
5.2.6. RT-PCR (reverse transcriptase - PCR)	- 43 -
5.2.7. Elettroforesi su gel di agarosio	- 46 -
5.2.8. Estrazione del DNA plasmidico (con S.N.A.P. miniprep kit della Invitrogen).....	- 47 -
5.2.9. Purificazione del DNA plasmidico da gel d'agarosio (con S.N.A.P. miniprep kit della Invitrogen).....	- 48 -
5.2.10. Clonaggio con vettori plasmidici di espressione in E. coli chimicamente competenti (Kit TOPO TA CLONING della Invitrogen).....	- 48 -
5.2.11. Taglio del DNA plasmidico con enzimi di restrizione.....	- 52 -
5.2.12. Sequenziamento dei prodotti di PCR e dei plasmidi.....	- 53 -
5.2.13. Produzione di sonde antisense marcate con digossigenina per esperimenti di ISH	- 53 -
5.2.14. Immunistoichimica (IHC).....	- 54 -
5.2.15. ISH non radioattiva con substrato NBT/BCIP	- 56 -
5.2.16. Estrazione delle proteine, elettroforesi degli estratti proteici su gel di acrilammide e Western immunoblotting	- 58 -
5.2.17. Microarray su estratti di mRNA	- 59 -
5.2.18. Lista dei primers utilizzati negli esperimenti di RT-PCR	- 60 -

6

6. Risultati e Discussione.....	- 61 -
6.1. SCCs e DCS nelle vie aeree di <i>Bos taurus</i>	- 61 -
6.2. I calici gustativi della laringe e i chemorecettori delle vie aeree dimostrano bassi livelli di espressione dei recettori del dolce e dell'umami (T1Rs), ma esprimono molti dei recettori dell'amaro (T2Rs)	- 64 -
6.2.1. Espressione dei T1Rs e di alcune molecole della cascata chemorecettoriale tipiche della percezione del gusto nella cavità orale e nelle vie aeree.....	- 65 -
6.2.2. Espressione dei recettori T2Rs dell'amaro e dei recettori candidati PKD2L1 e PKD2L2 dell'acido nella cavità orale e nelle vie aeree di ratto.....	- 76 -
6.3. La LRRP Ba1-651 di ratto è una Δ -1-pirrolina-5-carbossilato-deidrogenasi del fegato di mammiferi, attivabile o inducibile dal cambiamento della concentrazione di molecole dolci a livello cellulare, che risulterebbe essere coinvolta nell'HPII, nella rigenerazione del fegato ed in altre patologie epatiche?.....	- 79 -
6.4. Feromoni batterici per il Quorum Sensing (AHL - acyl homoserine lactones) provocano stati infiammatori e apoptosi dell'epitelio delle vie respiratorie di ratto.....	- 85 -

7

7. Pubblicazioni scientifiche.....	- 92 -
------------------------------------	--------

8

8. Bibliografia.....	- 93 -
----------------------	--------

9

9. Ringraziamenti	- 105 -
-------------------------	---------

1. Abstract

Taste buds and solitary chemoreceptor cells (SCCs) in the oral cavity, larynx and nasopharynx must both monitor potential foods as well as guard against intake of toxic materials into the alimentary and respiratory passageways. All of these sensory cells utilize TR receptors to initiate a signaling cascade, which utilizes TrpM5 as a requisite downstream element. Accordingly, TrpM5 is a useful marker of likely chemoreceptor cells whether they are in taste buds or SCCs. To understand the role of these cells, we set out to determine which taste signal transduction elements they express. For sweet and umami, the taste signaling cascade is initiated in the taste receptor cells (TRCs) by activation T1R receptors (good markers of chemoreceptors responsive to appetitive qualities), and for bitter and sour, the taste signalling cascade is initiated in the TRCs by activation T2R receptors and PKD2L1/2 candidate receptors (good markers of chemoreceptors responsive against to intake of toxic compounds). The downstream elements for sweet, umami and bitter taste include α -gustducin, PLC β 2, IP3R3 and Trpm5. I utilized in situ hybridization, RT-PCR, two lines of transgenic mice, TrpM5-GFP and T1R3-GFP, immunoblotting and immunohistochemistry, to assess the distribution within the oropharynx and respiratory tract, of solitary and taste buds chemoreceptor cells expressing these different markers. TrpM5-GFP receptor cells occur within all taste buds, including those on the epiglottis and larynx. In addition, numerous, scattered TrpM5-GFP SCCs lie within the nasopharynx, larynx and trachea. α -gustducin, PLC β 2 and Trpm5 are expressed in taste buds cells of the oropharynx as well as SCCs throughout the epiglottis, oropharynx, larynx and trachea of mice, rat and bovine. By RT-PCR studies on rats, T1Rs receptors were localized predominantly in lingual, palatal and laryngeal tissue. Comparatively, T1R3-GFP cells occur predominantly in lingual and palatal taste buds, few T1R3-GFP cells are present in laryngeal taste buds and essentially no T1R3-positive SCCs are present within the airways. These results from transgenic mice T1R3-GFP are largely confirmed by in situ hybridization studies on rat T1Rs: laryngeal taste buds exhibit low expression of T1Rs compared to lingual and palatal taste buds, and no T1Rs-positive SCCs are present within the airways. Thus, it seems that laryngeal taste buds and SCCs do not display molecular features associated with detection of sweet or umami compounds. By RT-PCR studies on rats, bitter and sour receptors occur either in lingual, palatal, nasal and laryngeal tissue, but only T2Rs were present in trachea and bronchi. Thus, it seems that T2Rs play an important role as guard against intake of toxic materials and in the protective chemoreflex of respiratory passageways. These findings are consistent with electrophysiological studies on the superior laryngeal nerve (188), showing minimal responsiveness to sweet and umami substances, but large responses to bitter and sour-tasting stimuli.

Moreover, by gene microarray experiments, I demonstrate that the action of AHLs, quorum sensing gram negative bacterial pheromones, is not only limited to activate conspecific bacteria, but also

modify innate defence mechanisms of the airway. AHLs induce an early mucosal response related to the length of their acyclic chain. The chondrioma of ciliate and secretory cells is the main cytological target of AHL action. However, the airways present a population of cells, the SCCs, that resists to the AHL-induced lesion. An important question is if some of the responses detected after treatment with AHL are part of a defensive mechanism operated by the mucosa. This might be the case of the secretory response elicited by C12-HSL. It is possible to speculate that the increased secretion could dilute the bacterial infochemicals, blocking the quorum sensing based strategy. In the response of the airway to AHL, the most interesting new finding is the high resistance of the SCCs, which do not display the mitochondrial alterations detectable in ciliate or secretory elements. The SCCs are a part of a diffuse chemosensory system (DCS) that control the whole airway, and are located in ideal positions to evaluate the mucus composition into the airways or the presence of infochemicals generated by resident micro-organisms. Recent studies demonstrated that SCCs are sentinels active against irritants (105). These data suggest that SCCs could have a role in bacterial infections, because ultrastructural analysis demonstrated that they are activated by AHL. Considering the chemoreceptorial capability of SCCs, it seems probable that they have a role in innate mechanism of defences that operates in presence of bacterial infochemicals. In conclusion, if the main taste system plays a role in food sampling, the DCS seems rather to be an alarm system. In the respiratory apparatus it could provide information about the luminal microenvironment. The DCS is probably the afferent branch of intrinsic mechanisms, which might involve gland secretion and muscle contraction. Local reflexes could be generated by interaction between the DCS and surrounding elements. The transmission of information from the DCS to the central nervous system is possible, but appears to be limited to the chemosensory cells innervated by afferent axons. Such cells seem to be a minority and are mainly localized in the larynx. For the elements not innervated, a paracrine action seems probable. Finally, the DCS seems to be a potential new drug target because several elements indicate that information obtained by this system induces secretory reflexes. Therefore, modulation of the respiratory apparatus by substances acting on their chemoreceptors could be important in the treatment of diseases such as cystic fibrosis and asthma, and might open a new frontier in drug discovery.

Finally, by RT-PCR studies on humans and rats, I showed that a new form of P5CDh enzyme, involved in proline catabolism, exist in rat liver. LRRP Ba1-651 is probably a Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, fused with the extramembrane receptor domain of sweet receptor T1R2, activated by changes in the concentration of sweet molecules. After partial epatectomy, constitutive P5CDh and inducible P5CDh-T1R2 co-exist in rat liver tissue. This finding demonstrates as part of a taste receptor sequence, the receptor domain, could be used for a completely different function and in no taste organs. Type II hyperprolinemia (HPII) is an inborn

error of metabolism due to a deficiency of P5CDh enzyme, thus it will be very interesting and important carry out further studies that contribute to understand the biological significance of this P5CDh-ANF enzyme, especially for the potential applications in the treatment of HP11, other liver diseases and in liver transplantation.

2. Prefazione e nota dell'autore

Il “metabolismo” del sapore! Permettetemi di usare una terminologia decisamente non corretta, ma che con questa licenza poetica mi ha semplificato nella scelta di un titolo impattante. Sì, perché più che di metabolismo si dovrebbe parlare di “percezione” e “trasduzione”, mentre per quanto riguarda il sapore si dovrebbero usare un insieme di termini che lo definirebbero più adeguatamente. Percezione e trasduzione, perché una qualunque molecola quando viene percepita, causa una serie di eventi a cascata, appunto la trasduzione del segnale percepito, che portano all'informazione finale su questa molecola; e questo vale per la maggior parte dei pathways “molecolari” e “metabolici”.

3. Introduzione

Il sapore, come definizione del termine, è la combinazione del gusto, dell'olfatto e delle sensazioni trigeminali. Il gusto è la percezione delle cinque modalità gustative (salato, acido, dolce, amaro ed umami) attraverso la lingua ed altri tessuti gustativi. L'olfatto è la percezione dell'odore attraverso il naso. Le sensazioni trigeminali rappresentano la stimolazione dolorosa, tattile, termica dei sistemi gustativo ed olfattivo tramite fibre nervose libere e/o a contatto con cellule recettoriali. Le funzioni chemosensitive del gusto e dell'olfatto giocano un ruolo vitale nella fisiologia umana ed animale. Infatti, determinano il sapore e la gustosità di cibi e bevande, la selezione di nutrienti essenziali per la vita, ed il riconoscimento di possibili pericoli quali: il calore eccessivo, i vapori tossici e i generi alimentari viziati. Le alterazioni di queste sensazioni hanno effetti drammatici sulla qualità della vita. Quando mangiamo, l'odore è la prima cosa che percepiamo attraverso il condotto olfattivo, prima ancora che il cibo sia stato introdotto in bocca. Il gusto viene percepito successivamente, quando il cibo entra a contatto con le cellule recettoriali gustative localizzate in ogni parte del cavo orale. Una seconda percezione olfattiva e gustativa avviene, posteriormente, attraverso la vie nasofaringea e laringea non appena il bolo alimentare è stato masticato ed inghiottito. La stimolazione trigeminale contribuisce a rendere il tutto più piacevole.

3.1. Anatomia del gusto

I calici gustativi o gemme gustative (“taste buds”) mediano le sensazioni gustative (Fig.1).

Tre tipi di papille linguali contengono i calici gustativi (Fig. 2):

- papille fungiformi (nei 2/3 anteriori della lingua)
- papille foliate (nei bordi laterali della lingua e l'area antistante al V linguale)
- papille circumvallate (o vallate; in numero di 12-14 nell'uomo disposte lungo le branche del V linguale e una nei roditori disposta posteriormente in posizione centrale).



Fig.1. Calice gustativo.

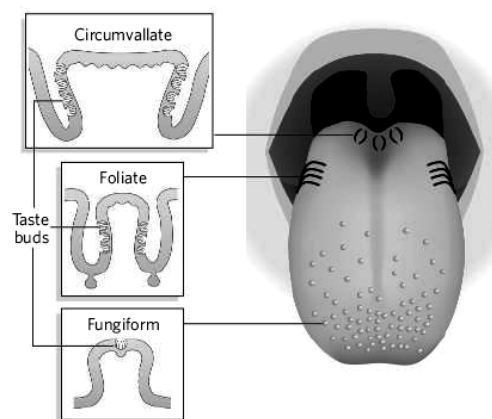


Fig.2. Papille gustative di uomo.

Molti calici gustativi sono anche presenti in: papato molle, geschmackstreifen, nasofaringe, laringe, epiglottide, ugola, labbra e terzo superiore dell'esofago. I calici gustativi vengono costantemente rimpiazzati approssimativamente ogni 10-12 giorni. Fra i vertebrati, i calici gustativi sono molto simili in dimensioni e forma, raggiungendo circa i 20-40 μm di diametro e circa 40-60 μm di lunghezza. I calici gustativi di mammifero sono costituiti da un "cluster" (insieme) allungato di circa 50 cellule epiteliali, che è possibile raggruppare in 4 tipi cellulari. Le cellule di tipo I sono le più frequenti e presentano assoni ed altre cellule inguainati come succede per le cellule gliali (glial cells). Queste cellule sono caratterizzate dalla presenza di grandi granuli apicali e sono ampiamente considerate come elementi di supporto e di secrezione. Le cellule di tipo II sono elementi fusiformi che non posseggono granuli o sinapsi e appaiono quindi luminose al microscopio. La funzione di queste cellule viene ancora molto dibattuta, ma vengono generalmente considerati elementi chemosensoriali o di secrezione. Le cellule di tipo III presentano porcessi apicali e basali che creano sinapsi con gli assoni. Queste cellule vengono generalmente considerate come elementi sensoriali del gusto. Le cellule di tipo IV sono elementi poco differenziati localizzati alla base dei calici gustativi, che vengono considerati come cellule staminali del calice stesso. In aggiunta ai 4 tipi

cellulari, possono essere osservate delle cellule perigemmalì (? di tipo V ?) attorno al calice gustativo.

I recettori del gusto percepiscono i cinque gusti base (salato, acido, dolce, amaro ed umami), ma anche un vasto range di altri gusti, che non sono descritti dalle categorie di base (metallico, piccante, elettrico). Ogni calice gustativo possiede dei recettori nella porzione apicale esposta alla cavità orale (il cosiddetto poro gustativo)(Fig. 1), ed un'area baso-laterale, ed è inserito nel muro delle cellule epiteliali. La porzione apicale dei calici gustativi dà inizio alla catena di eventi che porteranno alla sensazione gustativa. In questo processo, la saliva gioca un ruolo importante sia come diluente delle molecole gustative, per renderle accessibili nei pressi dei calici e per allontanarle da essi stessi, sia come agente protettivo per il gusto e per le cellule epiteliali, in quanto diluisce la sostanza ad una concentrazione stimolante.

3.2. L'olfatto

I recettori dell'olfatto risiedono nell'epitelio olfattivo del setto nasale, nel turbinato superiore, e nella volta della cavità nasale. Nei roditori esistono anche dei recettori dei feromoni situati nell'organo vomero nasale (VNO), detti anche recettori vomero nasali (VN), che sono stati persi durante l'evoluzione dell'uomo (esistono solo alcuni pseudogeni), nel quale l'VNO si pensa possa essersi oramai atrofizzato o sia inesistente. I neuroni bipolari ciliati o cellule recettoriali olfattive, che vengono sostituiti approssimativamente ogni 15-60 giorni (1, 2), sono connessi al bulbo olfattivo attraverso il nervo olfattivo a cui giungono attraversando la lamina cribriiforme. La trasduzione del segnale inizia nei neuroni periferici, quando la sostanza stimolante viene inalata e trasportata o dissolta nelle secrezioni mucosali, ed il processo viene completato nel bulbo olfattivo.

3.3. Breve descrizione della trasmissione nervosa del gusto e dell'olfatto

Lo stimolo ricevuto dai recettori del gusto viene trasmesso per mezzo di tre nervi cranici: il VII (facciale, corda timpani e grande petroso), il IX (glossofaringeo) e il X (vago); poi attraversa il tratto del nucleo solitario e il talamo, fino alla corteccia e all'ipotalamo (Fig. 3).

A differenza della funzione gustativa, un solo nervo cranico (I, nervo olfattivo) è responsabile di quella olfattiva. I neuroni olfattivi si aggregano a formare glomeruli nel bulbo olfattivo (Fig. 1). L'informazione viene spedita e processata nel lobo piriforme, nell'ippocampo e nell'ipotalamo. Le cellule recettoriali olfattive, essendo esse stesse dei neuroni, a differenza di quelle gustative hanno tempi di turn over più lunghi. Il nervo trigeminale (V nervo cranico) gioca un ruolo importante nelle sensazioni gustativa ed olfattiva attraverso la "chemiostesia", che permette l'identificazione di sostanze irritanti o velenose.

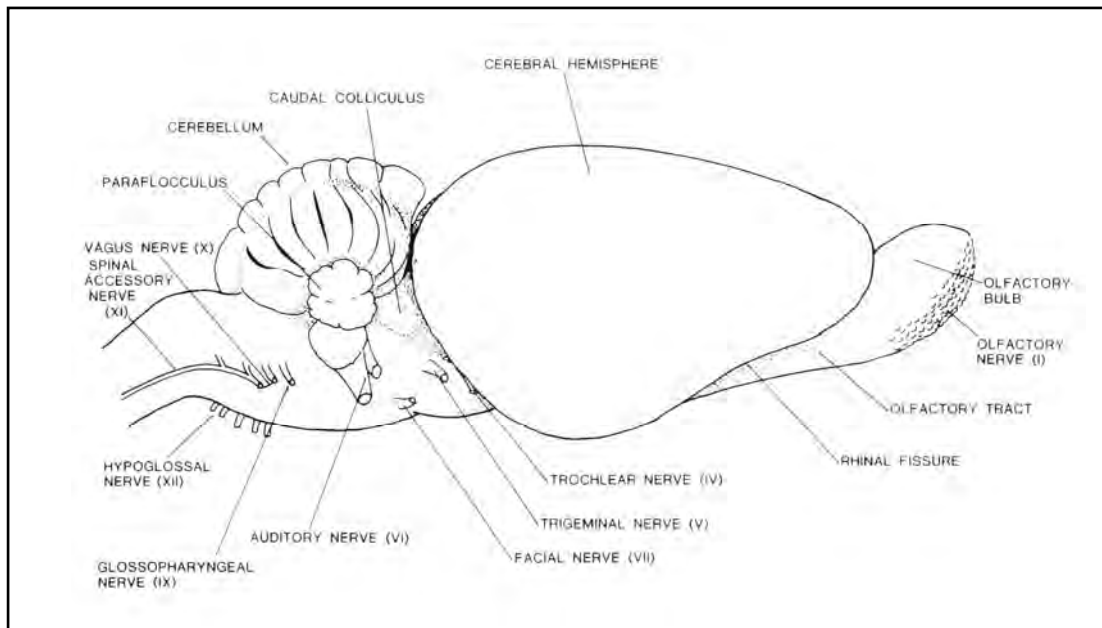


Fig.3. Sistema nervoso di ratto.

Le branche mascellare e mandibolare del V nervo cranico danno origine, nella cavità orale, ai nervi linguale, nasopalatino, palatino posteriore e buccale. Il nervo trigeminale ha una funzione nocicettiva, principalmente nella regione anteriore della cavità orale, mentre il nervo glossofaringeo (IX nervo cranico) funziona come il principale recettore delle regioni posteriori. Parecchie terminazioni nervose libere risiedono anche nella mucosa orale e si trovano principalmente nella regione anteriore, nelle papille filiformi e intorno alla papilla circumvallata (vengono in minor misura ritrovate anche in qualsiasi altro tipo di papilla). Il nervo laringeo superiore (branca del X nervo cranico o vago), che si divide principalmente in 5 sottobranchie, innerva la laringe, l'esofago e l'epiglottide e sembra essere responsabile nel procurare l'informazione riguardante i cambi chimici nella mucosa della laringe. Questa informazione a sua volta è probabilmente molto importante per la protezione delle vie aeree e nel procurare l'input finale per l'inghiottimento o l'espulsione del bolo di cibo.

3.4. Il sistema gustativo (3)

Sorprendentemente, sebbene possano essere recepiti o "gustati" un numero molto vasto di entità chimiche, al momento viene generalmente accettato che qualitativamente vengano raggruppate in un numero inferiore di sensazioni gustative distinguibili: il dolce, l'amaro, l'acido, il salato e l'umami (o saporito). La sensazione del gusto dolce permette l'identificazione di nutrienti ricchi in energia, quella dell'umami riconosce gli amminoacidi, quella del salato assicura un bilancio appropriato degli elettroliti, e quelle dell'amaro e dell'acido allertano contro l'ingestione di potenziali sostanze chimiche irritanti o velenose. I recettori dei gusti dolce, umami e amaro sono

delle proteine transmembranalì, accoppiate ad una G-protein, mentre i recettori dei gusti acido e salato sono dei canali ionici (Fig. 4).

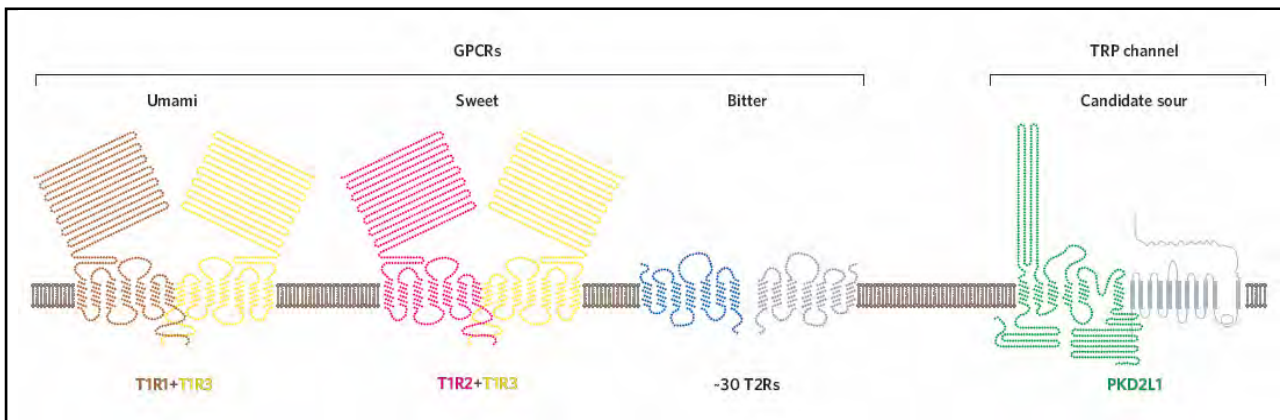


Fig.4. Recettori dei gusti umami, dolce, amaro e acido.

Rappresentazione schematica dei recettori del gusto (e dei recettori candidati) che guidano quattro delle cinque modalit  gustative di base. Sebbene non venga indicato in figura, la risposta ad alte concentrazioni di zuccheri, ma non ad altre sostanze gustative dolci, si ha anche da parte del solo T1R3. In grigio vengono rappresentati la possibilit  che i T2Rs, cosiccome i T1Rs, funzionino come complessi eterodimerici e il partner candidato insieme al PKD2L1 per la recezione del gusto acido.

3.4.1. Come vengono percepiti i differenti gusti?

Ci sono due principali ed opposti punti di vista su come le differenti modalit  gustative vengono codificate alla periferia: il modello a marcatura lineare (labelled-line model) e i modelli a fibre incrociate (across-fibre models) (Fig. 5).

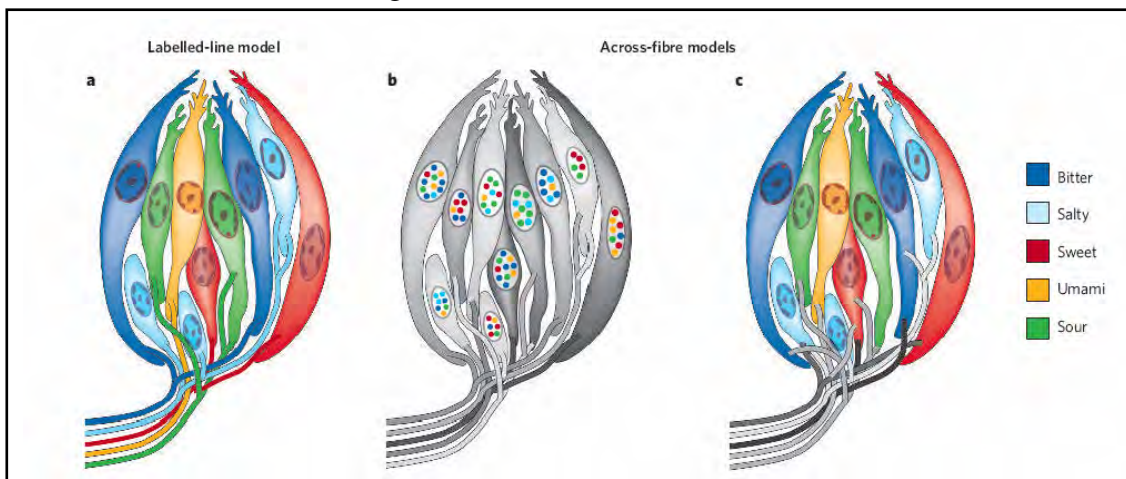


Fig.5. Modelli di percezione delle differenti modalit  gustative: il modello a marcatura lineare e i due modelli a fibre incrociate.

Nel primo modello, le cellule recettoriali gustative (taste receptor cells, TRCs) sono specializzate nel rispondere a singole modalit  gustative e sono innervate da fibre nervose individuali dedicate. In parole povere, ogni gusto viene percepito da cellule, esprimenti recettori specializzati, e trasdotto da fibre non sovrapponibili. Nell'altra classe di modelli, prevalentemente riconosciuti come pi  corretti negli ultimi due decenni, sembra che TRCs individuali siano sintonizzabili su modalit  gustative

multiple incrociate e che le stesse fibre afferenti trasportino informazioni riguardanti più di un modalità, oppure che le TRCs percepiscano singole modalità gustative, ma le stesse fibre afferenti trasportano informazioni gustative multimodali. Recenti studi molecolari e funzionali in topo hanno dimostrato che TRCs differenti fra loro definiscono le varie modalità gustative, e che l'attivazione di un singolo tipo di TCR sia sufficiente per codificare il corrispondente gusto; dati questi a supporto del "labelled-line model", ma con fibre afferenti che contattano le TRCs specializzate su una singola modalità gustativa e che trasportano informazioni multimodali.

3.4.2. Il gusto dolce

La dolcezza dello zucchero e il piacere che provoca ci sono così familiari che sembrano essere più delle proprietà fisiche dello zucchero stesso, piuttosto che la rappresentazione del bombardamento neuronale nel cervello. Questa stretta relazione tra qualità sensoriale, valore edonico positivo ed accettazione comportamentale, illustra bene come la rilevazione e la percezione del gusto dolce si sia evoluta per aiutare nel riconoscimento delle fonti di energia metabolica basilari e fondamentali.

I gusti con modalità attrattive, dolce e umami, vengono guidati da una piccola famiglia di tre recettori accoppiati alla proteina G (GPCRs, G-protein-coupled receptors) – T1R1, T1R2 e T1R3 – che sono lontanamente relazionabili ai recettori metabotropici del glutammato, dei feromoni, del sensing del calcio extracellulare e degli acido- γ -amminobutirrico di tipo B (4-13). Questi GPCRs si assemblano sia in complessi recettoriali omodimerici che eterodimerici (14), e sono caratterizzati dalla presenza di lunghi domini extracellulari ammino-terminali, che sembrano indirizzare il riconoscimento ed il legame del ligando (lo zucchero o L-amminoacido) (15).

I recettori T1Rs sono espressi in dei subsets di cellule TRCs coesprimenti il T1R1 ed il T1R3 (cellule T1R1+3), il T1R2 ed il T1R3 (cellule T1R2+3) e cellule TRCs contenenti solamente il T1R3 (6). Però cosa fanno queste cellule? Più di 30 anni fa, studi genetici sul gusto dolce effettuati su topi identificarono un locus singolo principale, che influenzava le risposte a numerose sostanze dolci (16, 17). Questo locus, conosciuto con il nome di *Sac*, determina differenti soglie di abilità di alcuni ceppi nel distinguere soluzioni contenenti saccarosio e/o saccarina dall'acqua pura (17). E' stato recentemente dimostrato, tramite "linkage analysis"(6, 9-12, 18) e "genetic rescue"(6), che il locus *Sac* codifica il recettore T1R3; ciò implica il coinvolgimento di un membro della famiglia genica T1Rs nella rilevazione del gusto dolce. Oltretutto, studi di espressione funzionale in cellule eterologhe avevano rivelato che il T1R3 combinato al T1R2 (T1R2+3) forma il recettore del gusto dolce, che risponde a tutte le classi di stimoli gustativi dolci: zuccheri naturali, dolcificanti artificiali, D-amminoacidi e proteine intensamente dolci (come monellina, miraculina, pentadina, curculina e taumatina) (6, 8, 19). Questi risultati convalidavano la funzione dell'eteromero T1R2+3

come quella di recettore del dolce, e suggerivano che le cellule T1R2+3 sono il subset di TRCs sensibili al dolce.

Uomo e topo mostrano differenze notevoli nella loro abilità percettiva verso certi dolcificanti artificiali e proteine intensamente dolci; ad esempio il topo non può percepire l'aspartame e la monellina. La cosa interessante è che introducendo il recettore T1R2 umano in topo, quest'ultimo cambia significativamente la sue preferenze per i gusti dolci ad un profilo di risposta simile all'umano (13), a riprova che differenze di specie nella sensibilità e selettività al dolce sono un riflesso diretto della variazione delle sequenze dei T1Rs nelle varie specie. Studi biochimici recenti sui recettori T1R2+3 dell'uomo, dei roditori e recettori chimerici uomo-roditore hanno dimostrato che diverse classi di ligandi del recettore del dolce attualmente richiedono differenti domini del complesso recettoriale per il riconoscimento di ciascun ligande (20-23), procurando così in modo semplice una soluzione alla possibile domanda su come un singolo complesso recettoriale possa rispondere ad un così ampio numero di composti percepibili come dolci (dai semplici zuccheri a 6 atomi di carbonio ai più complessi acido guanidinoacetico e ai numerosi peptidi e polipeptidi). Presi insieme tutti questi studi genetici, funzionali e biochimici convalidano ampiamente il ruolo delle subunità T1R2 e T1R3 nel riconoscimento degli stimoli gustativi dolci, e dimostrano l'enorme importanza dell'etero-dimerizzazione nel funzionamento del complesso recettoriale. Prove definitive, infine, che il recettore T1R2+3 è il principale recettore del gusto dolce nei mammiferi, sono state ottenute da studi su topi knockout per il T1r2 e il T1r3 (13, 24) (Fig. 6).

Mutanti omozigoti mancanti le due subunità mostravano una perdita devastante del gusto dolce: tutte le risposte comportamentali ed elettrofisiologiche ai dolcificanti artificiali, ai D-amminoacidi e alle basse o moderatamente alte concentrazioni (fino ai 300 mM) di zuccheri naturali vengono abolite (13, 24). In ogni caso, questi animali conservano delle piccolissime risposte, sebbene misurabili, alle concentrazioni altissime di zuccheri. Una cosa importante da riportare, è che il doppio knockout T1R2/T1R3 eliminava completamente le suddette risposte residue (13), dimostrando inequivocabilmente il ruolo essenziale dei T1Rs nella rilevazione e percezione del gusto dolce. Ad irrobustire, inaspettatamente, la tesi che i T1Rs sono fundamentalmente richiesti nella percezione del gusto dolce, ci ha pensato la recente scoperta che i gatti (cosiccome tutta la famiglia dei felidi dal gatto comune alla tigre) presentano una delezione naturale nel loro gene T1r2, dando una spiegazione molecolare alla sorprendente osservazione che i gatti non rispondono al dolce (25).

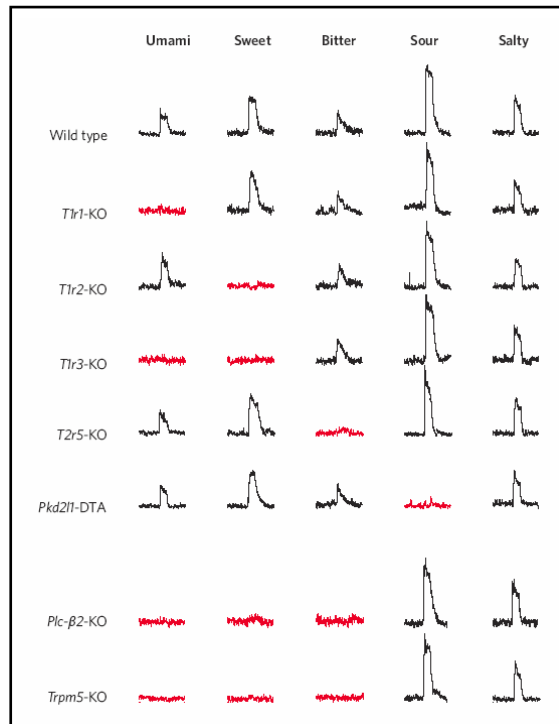


Fig.6. Il gusto dolce, umami, amaro e acido sono guidati da recettori e cellule specifici.

Le tracce mostrano registrazioni dell'attività indotta da sostanze gustative nei nervi connessi alla lingua di topi wild.type e knockout (KO) di vari geni e studi di ablazione cellulare con la tossina difterica espressa specificatamente in cellule PKD2L1 (Pkd2L1-DTA). Il dimero T1R1+3 funziona come recettore dell'umami, mentre il T1R2+3 come recettore del dolce. Il T2R5 è un recettore ad alta affinità per la cicloesamide e il PKD2L1 è il candidato alla recezione del gusto acido. Il PLCβ2 è l'effettore e il TRPM5 il canale di trasduzione dei pathways del dolce, dell'amaro e dell'umami. Le tracce rosse rappresentano lo straordinariamente specifico deficit gustativo in ciascuna linea di topo alterato geneticamente.

3.4.3. Il gusto umami

La maggior parte dei mammiferi viene notevolmente attratta dal gusto di un ampio numero di L-amminoacidi (13, 26-28). Nell'uomo comunque solo due amminoacidi (aspartato e monosodio glutammato – MSG) provocano l'unica sensazione del saporito conosciuta come umami (che in giapponese significa “sapore delizioso”)(29), peraltro ben rappresentato nella cucina occidentale dal gusto di brodo di carne. Una caratteristica saliente del gusto amminoacido negli animali e del gusto umami nell'uomo, è il loro impressionante potenziamento ottenuto tramite i nucleotidi purinici (come il disodio inosina monofosfato – IMP e il disodio guanosina monofosfato – GMP)(30). Questa caratteristica è stata enormemente sfruttata dall'industria alimentare con lo scopo di aumentare l'appetibilità di un gran numero di prodotti, e si prevedeva che sarebbe diventato il marchio di garanzia biochimica del recettore autentico dell'umami.

Studi basati sull'espressione cellulare hanno dimostrato che il T1R1 ed il T1R3 di roditore si combinano per formare il recettore ad ampio spettro degli L-amminoacidi (7). Questi risultati convalidano ampiamente che il ruolo delle subunità T1R1 e T1R3 è quello di recettore del gusto amminoacido, e che le cellule esprimenti l'eterodimero T1R1+3 sono coinvolte nel riconoscimento

dello stimolo gustativo umami. Devono essere inoltre ricordati altri recettori degli amminoacidi, quali i recettori ionotropici e metabotropici del glutammato, ed in particolare l'mGluR4 legato al gusto, che è una forma troncata dell'mGluR4 del cervello (7, 8, 31-33). Le subunità T1R1 e T1R3 vengono coespresse nei calici gustativi della parte anteriore della lingua (7), mentre l'mGluR4 legato al gusto viene espresso nei calici gustativi delle papille vallate e foliate (34).

Di molto interesse sono i saggi cellulari su umano, dove il complesso T1R1+3 funziona da recettore molto più specifico, rispondendo selettivamente al MSG, all'aspartato e all'analogo del glutammato L-AP4, con una selettività che riassume la soglia psicofisica umana per il gusto umami (7,8). In aggiunta, come sarebbe previsto per la genuinità del recettore per l'umami, gli eterodimeri T1R1+3 sia di uomo che di roditore mostravano un forte potenziamento in risposta ai nucleotidi purinici (7,8). Infine, prove definitive che il T1R1+3 funziona in vivo come recettore del gusto amminoacido (umami) è stata ottenuta dallo studio di topi knockout per il T1r1 e il T1r3 (13, 24)(Fig. 6). Mutanti omozigoti, mancanti le due subunità, mostravano una totale perdita del gusto umami, includendo tutte le risposte all'IMP e l'attrazione comportamentale all'MSG e agli L-amminoacidi (13, 24).

Presi insieme, questi risultati stabiliscono fortemente il ruolo del complesso GPCR eterodimerico T1R1+3 come recettore del gusto umami dei mammiferi e procura un esempio sorprendente di come delle GPCRs eterodimeriche alterino radicalmente la loro selettività a seconda dell'arrangiamento combinatoriale delle subunità (gusto dolce con T1R2+3 e umami con T1R1+3). Oltretutto, questi studi rivelano che i gusti dolce e umami, considerati i due inputs chemosensoriali responsabili del comportamento attrattivo, condividono un repertorio di recettori e origine evolutiva comuni.

3.4.4. Il gusto amaro

A differenza dei gusti dolce e umami, che si sono evoluti per riconoscere un numero limitato di nutrienti, il gusto amaro ha l'oneroso compito di prevenire l'ingestione di una grandissima quantità di composti tossici strutturalmente distinti. Sorprendentemente, anche considerando la vastezza di questo repertorio, tutti questi composti evocano la stessa sensazione conosciuta come "amaro". Queste osservazioni suggeriscono che i recettori del gusto amaro vengono probabilmente codificati da una grande famiglia genica, e che la sensazione dell'amaro si è evoluta per permettere il riconoscimento di un ampio spettro di composti chimici, ma non necessariamente per distinguerli uno dall'altro. Il gusto amaro è mediato da una famiglia di circa 30 GPCRs altamente divergenti fra loro (i recettori T2Rs)(35, 36). I geni T2r sono espressi selettivamente in subsets di cellule TRCs diverse e distinte da quelle che contengono i recettori del dolce e dell'umami (35), e formano un cluster in regioni del genoma geneticamente collegate al gusto amaro sia in uomo che in topo (35-

38). E' stato dimostrato con saggi di espressione eterologa, che la maggior parte dei recettori T2Rs funzionano come recettori del gusto amaro (39-43), e che parecchi hanno polimorfismi distintivi che sono associati con variazioni significative nella sensibilità a sostanze stimolanti in modo selettivo il gusto amaro sia in topo (39), che in scimpanzè (44) e uomo (45).

Prove certe del fatto che i T2Rs sono necessari e sufficienti per la funzionalità del gusto amaro, provengono da studi di mis-espressione e topi knockout. Da una parte, animali nei quali manca uno specifico T2R (ad esempio, il T2R5, il recettore candidato della cicloesimide), esibivano una perdita selettiva e molto marcata dell'abilità percettiva del corrispondente composto amaro (46)(Fig. 6). Dall'altra parte, topi geneticamente ingegnerizzati per esprimere il recettore umano candidato per il PTC (feniltiocarbammide) e la salicina, due sostanze amare alle quali il topo normalmente non risponde, divengono estremamente avversi a queste sostanze chimiche (46). Questi risultati dimostravano che i T2Rs sono necessari e sufficienti per la risposta selettiva alle sostanze stimolanti il gusto amaro, e convalidano che il ruolo dei T2Rs e delle cellule che li esprimono è di mediatori *in vivo* della rilevazione e percezione del gusto amaro.

In ogni caso, il fatto che la risposta del topo al gusto amaro possa essere umanizzata introducendo recettori del gusto di uomo mette in luce un'importante caratteristica dei recettori T2Rs e del gusto amaro: le differenze in selettività e sensibilità ai composti amari fra le diverse specie sono probabilmente il riflesso della differenziazione delle sequenze geniche nel loro rispettivo repertorio di T2Rs (47, 48).

Una straordinaria caratteristica biologica dei recettori dell'amaro proviene dalla scoperta che la maggior parte, se non tutti, i recettori T2Rs vengono espressi nelle stesse cellule TRCs (35). Questo implica che cellule individuali esprimenti T2Rs potrebbero funzionare come un sensore ad ampio spettro per tutte le sostanze chimiche amare, con l'unico inconveniente che potrebbero avere limitata, se non poca, discriminazione. In effetti, non sarebbe irragionevole immaginare che sebbene gli animali possano rilevare molti composti amari, essi non abbiano bisogno di distinguerli a livello qualitativo. Oltretutto, recenti studi su topo hanno confermato che le cellule esprimenti T2Rs operano come sensori universali dell'amaro (46, 49), e che, sebbene topi e ratti possano distinguere intensità differenti di sostanze stimolanti il gusto amaro, essi siano incapaci di discriminarle (50). Chiaramente, sarebbe irragionevole aspettarsi che differenti cellule TRCs rispondenti all'amaro esprimano le stesse proteine T2Rs a livelli identici; ne deriva che cellule individuali sensibili all'amaro probabilmente variano nella loro sensibilità alle sostanze stimolanti il gusto amaro, ma continuano ad essere in grado di rispondere a tutto il loro repertorio.

3.4.5. I gusti salato e acido

In numerosi studi è stato suggerito che le sostanze stimolanti i gusti acido e salato modulino la funzione delle cellule gustative tramite l'entrata diretta di ioni Na^+ e H^+ attraverso canali di membrana specializzati situati sulla superficie apicale delle cellule.

Nel caso del salato, l'attivazione delle cellule TRCs si crede venga mediata almeno in parte dall'entrata di Na^+ attraverso i canali del sodio sensibili all'amiloride (51, 52).

Un gran numero di tipi cellulari, recettori e meccanismi sono stati proposti come responsabili del gusto acido. Tra i recettori da segnalare i canali permeabili ai nucleotidi ciclici (HCN, cyclic-nucleotide-gated) attivabili per iperpolarizzazione (53), i canali ionici acido-sensibili (ASICs)(54), i canali del potassio (K2P)(55, 56) e i canali del calcio permeabili all' H^+ (57), mentre fra i meccanismi ci sono il coinvolgimento degli scambiatori Na^+/H^+ (58) e l'inattivazione acida dei canali del K^+ (59). Comunque, recenti studi genetici e funzionali hanno enormemente semplificato la questione dei recettori dell'acido, dimostrando che un membro della famiglia dei canali ionici TRP, il PKD2L1, è presente nelle cellule TRCs sensibili all'acido (60). Il PKD2L1 viene selettivamente espresso in una popolazione di cellule TRCs completamente distinta da quelle sensibili ai gusti dolci, amaro e umami (60, 61), dando ulteriore solidità alla tesi della segregazione cellulare delle modalità gustative alla periferia.

Prove chiare che le cellule esprimenti PKD2L1 funzionino come recettori dell'acido nel sistema gustativo, provengono da esperimenti conclusivi di ablazione genetica. Esperimenti con topi transgenici esprimenti la tossina difterica attenuata diretta in modo mirato contro cellule della lingua esprimenti il PKD2L1, producevano negli animali una perdita specifica e totale del gusto acido (60), convalida definitivamente che il ruolo delle PKD2L1-TRCs è quello di essere le uniche cellule sensibili all'acido ed implica che i canali ionici PKD2L1 sono i candidati a recettori del gusto acido (60, 62). Negli stessi topi transgenici acido-deficienti le risposte ai sali erano normali, dando un'ulteriore dimostrazione che anche il gusto acido deve essere mediato da una popolazione di cellule TRCs indipendente dalle altre (Fig. 6).

La sensibilità all'acidità sembra essere importante non solo per il sistema gustativo, ma anche nei processi di monitoraggio dei livelli di anidride carbonica nel sangue (63) dello stato interno del fluido cerebro spinale e del cervello (64). Di conseguenza, viene da pensare che il PKD2L1 potrebbe essere funzionante anche in altri scenari fisiologici. Effettivamente è stato dimostrato che il PKD2L1 viene espresso in una popolazione selettiva di neuroni che contattano il canale centrale della corda spinale, che viene stimolato in risposta a minimi cambi della concentrazione protonica (60). Questi risultati suggeriscono che quei neuroni funzionano come sentinelle del pH cerebrospinale e ventricolare, e mettono in risalto una sorprendente unità percettiva dell'acidità a livello cellulare in sistemi fisiologici molto diversi.

3.4.6. La trasduzione del segnale a valle dei recettori T1Rs e T2Rs

La cascata dei segnali a valle dei recettori gustativi è stata l'oggetto di immanse speculazioni durante questi ultimi anni, con una gran quantità di modelli ipotizzanti una sorprendente diversità di pathways e strategie (65-67). Questa complessità proposta, contrasta fortemente con la semplicità dimostrata dai pathways dei segnali degli altri sensi, come l'olfatto, nel quale centinaia di recettori distinti fra loro condividono una cascata di trasduzione dei segnali identica per tutti (68). Con una certa sicurezza, recenti studi hanno dimostrato che i recettori per i gusti dolce, amaro e umami, sebbene vengano espressi in subsets separati di cellule (6), condividono un pathway comune per trasdurre in attivazione cellulare il riconoscimento degli stimoli gustativi (49, 69).

I dati a disposizione suggeriscono che il legame ai recettori T1Rs e T2Rs di sostanze stimolanti il gusto attivano l' α -gustducin (70) o la G_{i2} (71) (subunità α delle G protein eterotrimeriche) provocando il rilascio delle subunità $G\beta\gamma$ (49, 72) e la susseguente stimolazione della fosfolipasi C β 2 (PLC- β 2) (49, 73). L'attivazione del PLC- β 2 causa l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-difosfato producendo i due messaggeri intracellulari, l'inositolo-1,4,5-trifosfato e il diacilglicerolo, e come recentemente scoperto conduca all'apertura del canale di trasduzione del gusto TRPM5 (transient receptor potential protein di tipo M5) (49, 69, 74)(Fig. 7).

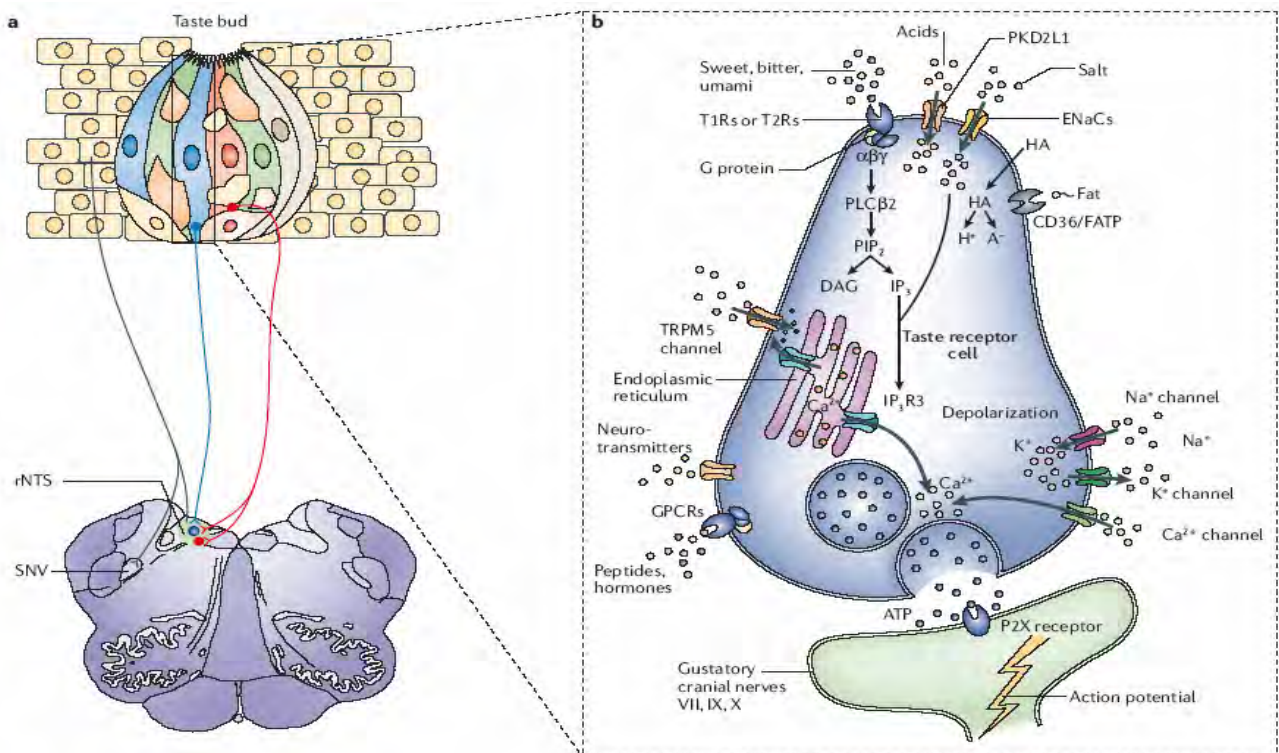


Fig.7. Diagramma schematico di un calice gustativo, connesso tramite fibre nervose al sistema nervoso centrale, e di una cellula gustativa recettoriale, con le proteine coinvolte nella rilevazione, nella trasduzione e percezione dello stimolo gustativo.

Come ci si aspetterebbe da questo modello, i topi knockout per l' α -gustducin (75, 76), il *Plc- β 2* (46, 77) o il *TrpM5* (49, 69) hanno enormi deficit nei gusti dolce, amaro e umami (Fig. 6). In tutti i

knockouts, i gusti salato e acido rimangono invariati (49), anche se viene riportato che i componenti della risposta al gusto salato potrebbero essere mediati da delle GPCRs e dal TRPM5 (69).

Questi risultati mostrano inequivocabilmente che la modalità del gusto acido usa un pathway di segnali differente e opera indipendentemente dai gusti dolce, amaro e acido, mentre per la modalità del gusto salato è vero solo in parte (49, 69).

Ci sono altri pathways importanti nella rilevazione e percezione dei gusti dolce, amaro e umami? Per rispondere a questa domanda bisogna far riferimento alla bibliografia. In base a quello che viene riportato negli esperimenti effettuati, sembrerebbe che anche alcune molecole di segnale appartenenti a differenti cascade di trasduzione, siano presenti in molti tipi cellulari, includenti anche le TRCs (73, 78-83). Comunque la presenza solamente di alcune di esse non implica che debbano anche essere coinvolte nella trasduzione del gusto (67). Esaurienti studi genetici e fisiologici sarebbero necessari per accertare se e quale ruolo esse abbiano nella cascata di segnali del gusto. Sarebbe interessante, oltretutto, se messaggeri secondari di un certo numero di pathways modulassero i segnali del gusto, sia a livello del recettore che più a valle, in modo da fornire una piattaforma all'ampiezza di risposte in funzione dei vari segnali e degli stati cellulari.

Curiosamente, è stato recentemente dimostrato che l'attivazione del canale di trasduzione TRPM5 sia fortemente dipendente dalla temperatura (84), in un range di temperature al quale normalmente le cellule TRCs funzionano (15-35°C). In questo studio viene proposto che questa proprietà del canale TRPM5 metterebbe in risalto alcuni degli effetti che ha la temperatura sulla rilevazione e percezione del gusto (84). Sarebbe un buon tentativo ingegnerizzare animali che esprimano canali TRPM5 con profili di temperatura modificati e determinare l'impatto fisiologico e comportamentale di queste modificazioni alle risposte gustative.

3.4.7. "Labelled-line model" per la codifica del gusto alla periferia

Numerosi studi elettrofisiologici o basati sull'imaging del calcio in ratto e topo riportano che cellule TRCs prese individualmente sono sintonizzate su varie modalità gustative (85, 86-88), proponendo quindi che la codifica della qualità gustativa alla periferia debba usare un pattern di attività a fibre incrociate (Fig. 5). Comunque, la scoperta che le cellule gustative del dolce, dell'amaro, dell'umami e dell'acido (e, per estrapolazione, del salato), siano segregate in popolazioni non sovrapponibili esprimenti recettori distinti denuncia la necessità di una revisione del suddetto modello. Vi verrà dimostrato con tre linee di investigazione che le cellule TRCs esprimenti i T1Rs, i T2Rs e il PKD2L1 funzionano come sensori specificamente dedicati ai gusti dolce, umami, amaro e acido, propendendo quindi, piuttosto, per un *"labelled-line model con una codifica alla periferia a fibre incrociate per tutte le modalità gustative"*.

3.4.7.1. Amaro

Il PLC- β 2 è richiesto per percepire i gusti dolce, amaro e umami (49, 77), cosicchè animali eventualmente knockout per il *Plc- β 2* sarebbero ciechi agli stimoli di ciascuna di queste tre qualità gustative (Fig. 6). Se le cellule TRCs prese individualmente fossero sintonizzate su una singola qualità gustativa, allora restaurando la funzione PLC ad un'unica popolazione di cellule TRCs di animali *Plc*-knockout (ad esempio alle cellule esprimenti i T2Rs), si dovrebbe a sua volta restaurare il gusto per una singola modalità gustativa (in questo caso quella amara). Diversamente, se quelle stesse cellule fossero sintonizzate genericamente sui gusti dolce, amaro e umami, allora restaurando la funzione delle cellule T2Rs (per mezzo dell'espressione del PLC) allora verrebbero restaurate tutte e tre le modalità gustative indifferentemente. Recentemente, è stato dimostrato che topi *Plc*-knockout ingegnerizzati per restaurare la funzionalità PLC- β 2 esclusivamente in cellule esprimenti i T2Rs, rispondono normalmente alle sostanze stimolanti il gusto amaro ma non rispondono a quelle stimolanti il gusto dolce o umami (49).

Questi esperimenti di “riscatto selettivo” dimostrano sia che l'attivazione delle cellule T2Rs è sufficiente per una normale percezione del gusto amaro, sia che il gusto amaro viene codificato indipendentemente dai gusti dolce e umami, con cellule TRCs non sintonizzate genericamente su modalità gustative multiple incrociate.

3.4.7.2. Amaro e dolce

Per studiare le basi del riconoscimento e della codifica delle sostanze stimolanti i gusti dolce e amaro, sono stati ingegnerizzati topi transgenici, sia in cellule TRCs del dolce che dell'amaro, che esprimevano un recettore “Gi-coupled κ -opioid receptor” modificato (RASSLs, receptor activated solely by a synthetic ligand)(13, 46, 89) sotto il controllo del “tetracycline transactivator (tet) system”. Gli animali che esprimevano il recettore RASSL in cellule TRCs del dolce venivano attratti selettivamente dalla spiradolina (antagonista sintetico degli oppioidi), che normalmente è un composto senza gusto, dimostrando che è l'attivazione delle cellule esprimenti i recettori del dolce, piuttosto che gli stessi recettori del dolce da soli, a causare la percezione della dolcezza. Inoltre, questi risultati dimostrano inequivocabilmente che l'attivazione di un singolo tipo cellulare è sufficiente per innescare risposte gustative specifiche.

Può la stessa logica essere applicata anche al gusto amaro? Come in precedenza, sono stati generati topi transgenici nei quali lo stesso recettore RASSL era stato ingegnerizzato per esprimersi in cellule TRCs del gusto amaro. Tali topi presentavano una marcata avversione e repulsione, piuttosto che attrazione, per la spiradolina (46). Presi insieme, questi risultati dimostravano che un pattern di attività combinatoriale, “across-fibre pattern”, non era necessario per l'attrazione o la repulsione

mediata da cellule TRCs del gusto dolce o amaro, sostenendo così fortemente il modello “labelled-line model” di codifica del gusto alla periferia.

Come prova finale a corollario degli esperimenti precedenti, sarebbe stato interessante vedere se l’espressione di recettori del gusto dolce in cellule TRCs del gusto amaro avrebbe innescato a livello comportamentale avversione per sostanze stimolanti il gusto dolce, laddove l’espressione di recettori dell’amaro in cellule TRCs del dolce dovrebbero innescare attrazione per i composti amari. A questo proposito, sono stati ingegnerizzati animali esprimenti recettori dell’amaro in cellule del gusto dolce e questi topi mostravano una fortissima attrazione per i composti amari affini (46). Ne deriva che il “gusto” di composti dolci o amari (in altre parole, la percezione del dolce e dell’amaro) è un riflesso dell’attivazione selettiva di cellule TRCs esprimenti recettori T1Rs rispetto a quelle T2Rs, piuttosto che una proprietà del recettore stesso o delle molecole stimolanti tali gusti.

3.4.7.3. Amaro, dolce e acido

Usando un approccio concettualmente complementare al riscatto funzionale dei subsets di cellule TRCs descritto precedentemente, si è pensato di eliminare intere popolazioni di cellule TRCs per mezzo dell’espressione geneticamente guidata della tossina della difterite (DTA) in definiti subsets di cellule gustative (60). Sorprendentemente, animali che esprimevano la DTA in cellule TRCs esprimenti il T1R2, i T2Rs o il PKD2L1 mostravano dei deficit gustativi straordinariamente specifici, dove ciascuno di essi esibiva una marcata perdita della singola qualità gustativa corrispondente (il dolce, l’amaro e l’acido, rispettivamente).

Presi insieme, questi studi rivelano tre caratteristiche fondamentali della codifica del gusto alla periferia. Innanzi tutto, comprovano la segregazione funzionale delle singole modalità gustative a livello cellulare, come veniva proposto anche negli studi originali di espressione dei recettori (6, 24, 49, 60). Inoltre, tali esperimenti dimostrano l’assoluta necessità di cellule TRCs esprimenti il T1R2, i T2Rs e il PKD2L1 per il funzionamento dei gusti dolce, amaro e acido. Infine, viene dimostrato che gli animali riconoscono e rispondono agli stimoli gustativi (con significato di codifica e decodifica dei segnali) senza il bisogno di patterns di attività combinatoriali alla periferia (“across-fibre pattern”) (Fig. 5).

3.4.8. “L’eccitante viaggio” dalla rilevazione alla percezione.

La scoperta che le singole modalità gustative vengano codificate da differenti subsets di cellule TRCs, renderebbe possibile individuare i pathways comunicativi di ogni qualità gustativa individualmente. Come risultato, sarebbe possibile tracciare linee di informazione definite dalla lingua alla corteccia per comprendere non solo dove vanno questi segnali, ma dove e come si combinano nel circuito che crea il gusto e il sapore.

Due studi recenti hanno fornito promettenti aspettative sull'esplorazione della comunicazione tra cellule TRCs e stazioni neuronali centrali. Nel primo, viene dimostrato che tutte le risposte nervose al dolce, amaro, acido, salato ed umami vengono perse in topi doppio-knockouts per i geni dei recettori purinergici P2x2 e P2x3 (P2x2/P2x3) ed implicando come potenziale neurotrasmettitore gustativo l'antagonista purinergico ATP (90). La disponibilità di questi topi dal gusto schermato potrebbe nell'odierno essere utilizzato come piattaforma sperimentale per ingegnerizzare animali che funzionano solo in determinati sets di fibre, cosicché da tracciare la risposta dei rispettivi gangli neuronali selettivi. Nel secondo, è stato usato un tracciante transneuronale fluorescente codificato geneticamente per aiutare nella rivelazione del circuito che collega le cellule TRCs al cervello (91). L'interpretazione dei risultati di questo studio era complicata a causa delle numerose difficoltà tecniche (trasmissione limitata del tracciante, marcatura singola per i pathways dolce e amaro, mancanza di correlazioni anatomiche per molti dei neuroni marcati); comunque, questo tipo di approccio, utilizzato anche in studi successivi (92, 93), aiuterà nella decifrazione dell'impianto neuronale dei gusti dolce, umami, amaro, acido e salato.

Ciascuno di noi può apprezzare da solo come la percezione del gusto possa variare a seconda del contesto. Ad esempio, l'aggiunta di zucchero al succo di limone nella limonata maschera la sua acidità, senza modificarne l'acidità. Oltretutto, la nostra percezione del gusto viene significativamente modificata ed estesa da altri inputs, come quelli olfattivi, visivi e somatosensoriali, e dalle esperienze precedenti, dalla sazietà e dall'essere affamato (94). Tutto questo indica che la combinazione e la comparazione fra le qualità gustative, insieme all'informazione derivante da altri sistemi sensoriali, dovrà prima o poi convergere al cervello dopo essersi trasformata nella percezione finale. Sebbene gli studi elettrofisiologici dei profili di risposta dei neuroni del tronco dell'encefalo, del talamo e della corteccia cerebrale legati al gusto stiano fornendo importanti indizi sulle proprietà di base dello schema circuitale centrale del gusto (95, 96), le difficoltà tecniche inerenti nell'ottenimento dei rispettivi dati (spesso dovuti alla ridottezza dei campioni), stanno allontanando dalla formulazione di una visione sensata di tale circuito (97).

Sicuramente approcci fisiologici, genetici e molecolari che prevedano l'uso di nuovi geni reporter e di attivatori e inibitori geneticamente codificati dell'attività neuronale, combinati con imaging funzionale ad alta risoluzione cellulare (98-103), sarebbero preziosissimi per aiutare a decifrare come le informazioni fluiscano dalla lingua ai centri di integrazione sensoriale del cervello e per imporre infine un comportamento specifico.

3.5. Il sistema chemosensoriale diffuso (diffuse chemosensory system - DCS)

La disponibilità di nuovi markers molecolari permette una dettagliata esplorazione delle cellule gustative dei calici della cavità oro-faringea e, recentemente, delle cellule "gustative", più

precisamente “chemorecettoriali”, descritte anche in altri organi di origine endodermica siti negli apparati respiratorio e digerente. Questi elementi “chemosensoriali” sono cellule isolate, che non sono raggruppate in calici. La loro presenza in un epitelio di origine endodermica suggerisce l’esistenza di un sistema chemosensoriale diffuso (DCS) che condivide con i “classici” organi gustativi meccanismi di segnale comuni. Lo studio del DCS è di evidente importanza per conoscere meglio gli apparati digerente e respiratorio, e potrebbe essere anche pertinente per la comprensione della patogenesi di malattie che possano interessarli.

Gli elementi chemosensoriali del DCS sono principalmente equidistribuiti o localizzati in aree specifiche in base al punto dell’apparato digerente o respiratorio considerato; inoltre presentano un polimorfismo morfologico correlato alla localizzazione. Sono stati descritti due tipi cellulari appartenenti al DCS, che hanno le tipiche caratteristiche delle cellule gustative: le “brush cells” (BCs) e le cellule chemosensoriali solitarie (T.E. Finger, “solitary chemoreceptor cells” o A. Sbarbati, “solitary chemosensory cells” – SCCs). Le BCs e le SCCs, nonostante ne venga riportata l’esistenza già nel passato, sono state riscoperte solo recentemente per la loro somiglianza a livello molecolare con le cellule gustative. La correlazione fra BCs e SCCs non è molto chiara, e la situazione viene ulteriormente confusa dall’uso in letteratura di nomenclature diverse per indicare lo stesso tipo cellulare (“BCs”, “tuft cells”, “caveolated cells”, “fibrillovesicular cells” e altre).

3.5.1. Anatomia del sistema gustativo periferico.

Il sistema gustativo periferico include gli organi sensoriali del gusto o calici gustativi, le loro innervazioni e le papille nei quali i calici gustativi sono assemblati (104). Sulla lingua, come detto in precedenza, i calici gustativi sono associati con le papille fungiformi nel margine anteriore, con quelle foliate lateroposteriormente e con quelle vallate posteriormente. I calici gustativi inoltre non sono solo confinati nella lingua, ma se ne riscontrano anche in palato molle, faringe, esofago, laringe ed altri tessuti. I calici gustativi nei vertebrati hanno dimensioni molto simili e nei mammiferi sono costituiti da una cinquantina di cellule divise in 4 tipi cellulari (Tipo I, II, III e IV) con funzioni e morfologia differenti.

3.5.2. Marcatori associati al gusto.

Studi recenti hanno reso possibile l’identificazione delle molecole coinvolte nella trasduzione del gusto, che possono essere utilizzate come marcatori gustativi di putative cellule chemosensoriali nell’epitelio di differenti apparati, permettendo di creare un collegamento molecolare tra le cellule gustative classiche e le cellule chemosensoriali solitarie, le SCCs (105-107). Fra queste molecole sono inclusi i recettori gustativi, l’ α -gustducin, il PLC- β 2 (108), l’IP3R3 (109), ed il TRPM5 (110). Quest’ultimo è coespresso con molecole di segnale gustative come l’ α -gustducin, la G β 3 e la G γ 13,

il PLC- β 2 e l'IP3R3. La definizione di cellule correlate al gusto viene ottenuta dalla codifica dei meccanismi di trasduzione del segnale di questi elementi chiariti da una serie di studi morfologici e molecolari (111, 112). Esempi recenti di questo approccio sono la dimostrazione dell'espressione, sia a livello di mRNA che di proteina, dell' α -gustducin e di membri della famiglia recettoriale del dolce T1Rs nelle cellule epiteliali dell'intestino (113, 114).

3.5.2.1. Subunità α della G protein “*gustducina*“ (α -gustducin).

Una molecola chiave nella cascata di eventi che guidano la trasduzione dell'amaro è la gustducina, una “guanine-binding protein” eterotrimerica (G-protein). La sua presenza come G-protein specifica del gusto venne dimostrata per la prima volta in ratto (70) e successivamente confermata in uomo (115), bovino (116) e molti altri. La subunità alfa della gustducina (α -gustducin) viene specificamente espressa nella lingua di ratto in cellule gustative delle papille circumvallata, foliata e fungiforme. Nei calici gustativi della papilla circumvallata di ratto, l' α -gustducin è stata trovata in cellule con caratteristiche tipiche delle cellule di Tipo II (luminose) (117). L' α -gustducin viene quindi considerata un marcatore molto valido delle cellule chemosensoriali con un ruolo molto importante in particolare nei meccanismi di trasduzione dei gusti amaro, dolce e umami (111).

3.5.2.2. Espressione di elementi del meccanismo di trasduzione del gusto amaro fuori dai calici gustativi.

Recenti studi hanno mostrato che molecole appartenenti al meccanismo di trasduzione del gusto amaro vengono espresse fuori dai calici gustativi. La presenza di α -gustducin fuori dai calici gustativi venne riportata per la prima volta in stomaco ed intestino di ratto (118); successivamente è stato anche dimostrato che vari elementi della cascata recettoriale colocalizzano fra loro, come l' α -gustducin, alcuni recettori del gusto, il PLC- β 2 (105) e l'IP3R3 (106). Questi elementi correlati alle cellule gustative sono stati anche in parte descritti in elementi isolati di tessuti di origine endodermica (ad esempio gli apparati digestivo e respiratorio). E' il caso di alcuni degli elementi della famiglia di recettori del gusto amaro (T2Rs), i cui trascritti genici sono stati trovati in cellule epiteliali dello stomaco e del duodeno di ratto e in linee cellulari enteroendocrine (cellule STC-1)(119, 120).

3.5.3. Un'elemento “classico” del DCS: le “*brush cells*”.

Le brush cells (BCs) sono elementi isolati con caratteristiche ultrastrutturali che suggeriscono un ruolo chemosensoriale. Nel passato, l'identificazione di queste cellule era morfologica e basata sulla presenza di un pennello di microvilli apicali rigidi (Fig. 8).

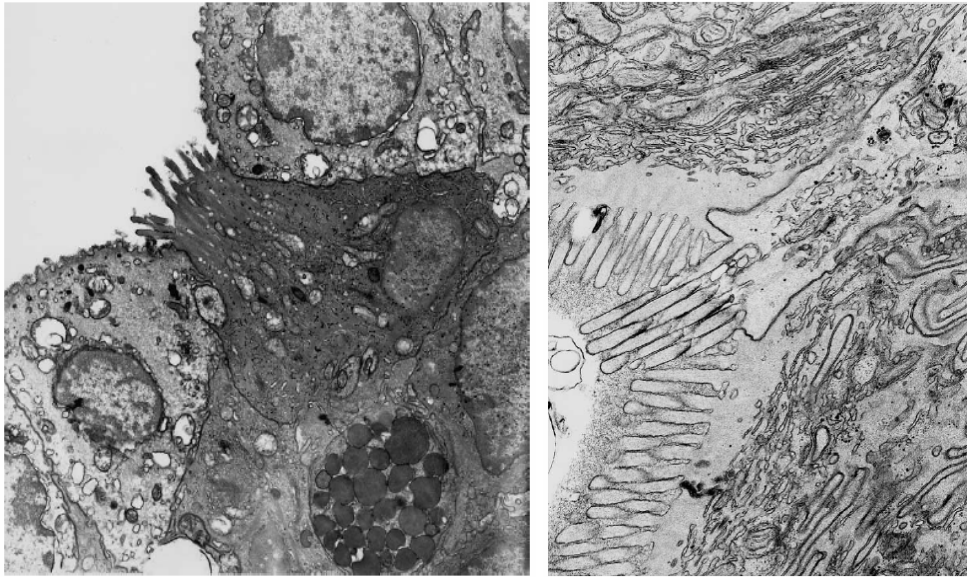


Fig.8. Pennello di microvilli di una “brush cell” nella trachea di ratto e nel duodeno umano.

Comunque, in altri organi, cellule con caratteristiche simili sono state designate con altri nomi: nel tratto gastrointestinale, “tuft cells” (121, 122); nella mucosa gastrica, “caveolated cells” (123); sempre nello stomaco, “fibrillovesicular cells 2” (124-127). Altri termini usati per indicare elementi simili alle BCs sono: “multivesicular cells” (128), “undifferentiated cells” (129), “s-cells” (130) e “agranular light cells” (131).

3.5.3.1. Localizzazione delle BCs in diversi organi.

Le BCs sono presenti nella trachea di varie specie di mammiferi, nell’epitelio alveolare del polmone e nell’epitelio non sensoriale dell’organo vomeronasale. Molti studi ne hanno confermato la presenza anche nell’apparato respiratorio umano. Le “tuft cells” dei dotti salivari presentano forti analogie con le BCs. BCs sono state trovate nello stomaco di varie specie, nei dotti biliari e nelle gallbladder, nell’intestino di ratto e nei dotti escretori pancreatici maggiori.

3.5.3.2. Caratteristiche fenotipiche e morfologiche delle BCs.

La caratteristica ultrastrutturale più importante delle BCs è la presenza di un ciuffo di microvilli rigidi, che spesso mostra lunghe radichette che non sembrano integrarsi in una membrana terminale. Normalmente queste cellule esprimono citocheratina 18, NO-sintetasi, neurofilamenti o villina e fimbrina. In stomaco, intestino e dotti pancreatici di ratto, le BCs esprimono l’ α -gustducin ed altre molecole correlate al gusto condividendo caratteristiche del citoscheletro apicale delle TCRs della lingua (132, 133). L’ α -gustducin è concentrata nel ciuffo apicale dei microvilli delle BCs e specifiche porzioni dell’apparato digerente presentano una densità maggiore di questi elementi (nelle porzioni terminali del dotto extralobulare e nel dotto pancreatico maggiore fino al 22%

dell'epitelio). La presenza di molte altre molecole del pathway di trasduzione del gusto supportano fortemente il ruolo chemorecettivo delle BCs. La presenza, poi, in queste cellule della NO-sintetasi suggerisce un coinvolgimento nel controllo chemosensoriale delle secrezioni pancreatiche. Presi insieme, questi dati dimostrano la presenza di chemorecettori solitari nell'intestino, indicando che le BCs sono coinvolte nel signaling chemorecettivo e fornendo un legame fra BCs e cellule dei calici gustativi (134). Sebbene non tutte le BCs presentino immunoreattività per la gustducina (135), una situazione simile sembra esistere anche nelle vie aeree, dove sono state trovate BCs esprimenti gustducina nella laringe (106). Questi dati suggeriscono che questi elementi potrebbero avere un ruolo chemosensoriale simile in entrambe gli apparati digestivo e respiratorio; nel primo caso per "gustare" il complesso ambiente gastrointestinale e tutte le sostanze esogene di passaggio o del secreto endogeno, nel secondo caso per guidare i riflessi protettivi contro sostanze volatili o solide che potrebbero entrare nelle vie aeree.

3.5.3.3. Considerazioni generali sulle BCs.

Una quantità enorme di dati ha dimostrato l'ampiezza di distribuzione delle BCs in grandi regioni dell'apparato respiratorio e di quello digestivo, sebbene queste cellule vengano spesso chiamate con nomi differenti. Nel passato, la maggioranza degli autori ha concluso che queste cellule abbiano un ruolo chemorecettoriale, anche se sono stati proposti altri ruoli (meccanocettivo; secretorio paracrino, esocrino, endocrino; assorbimento; rigenerativo). Le recenti applicazioni con marcatori tipici delle cellule gustative hanno fortemente supportato l'ipotesi chemorecettoriale di questi elementi, come già suggerito dalle loro caratteristiche strutturali. Questo ovviamente non esclude la coesistenza di altri ruoli in elementi con capacità chemorecettoriale.

3.5.4. Elementi chemosensoriali solitari del DCS: le "solitary chemosensory cells – SCCs". Le SCCs sono elementi epiteliali sottili, recentemente scoperti nei mammiferi, che mostrano caratteristiche citologiche che suggeriscono un ruolo chemosensoriale e che posseggono meccanismi di trasduzione del segnale tipici delle cellule gustative (Fig. 9)(105, 106, 136).

3.5.4.1. Considerazioni anatomiche comparative.

I vertebrati hanno chemorecettori differenti per olfatto e gusto, presenti alla loro estremità cefalica come mucosa olfattiva e calici gustativi, ai quali si aggiungono le terminazioni libere del nervo trigeminale. Molti vertebrati acquatici inoltre posseggono un ulteriore tipo di sistema chemosensoriale basato su elementi sensoriali secondari chiamati solitamente SCCs (137-139). Nei pesci, le SCCs formano un sistema di cellule epiteliali sensoriali differenziate, che non sono organizzate in strutture o organi e possono ritrovarsi nell'epitelio orofaringeo, branchie e pelle.

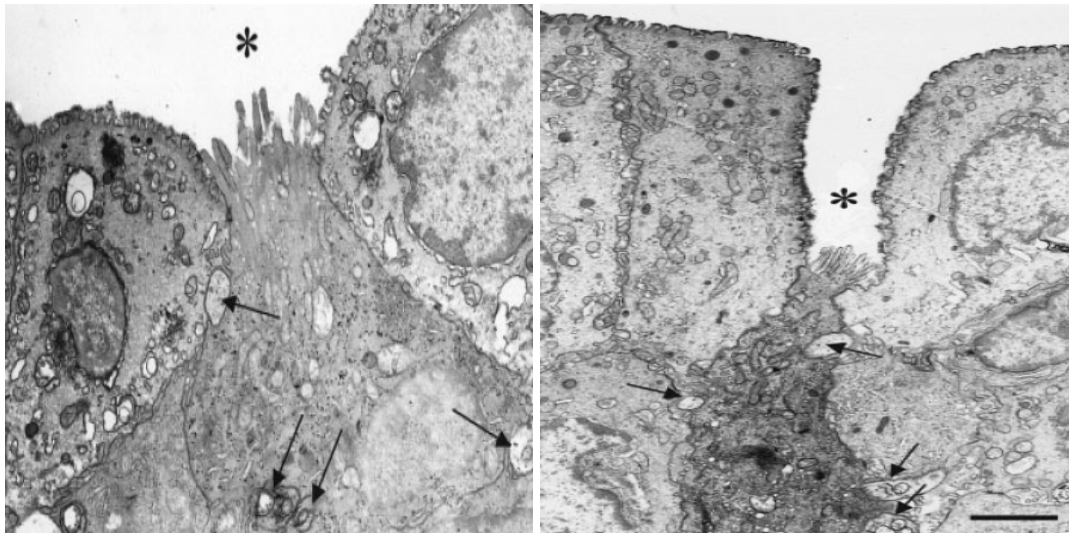


Fig.9. Pennello di microvilli di una "SCCs" nella laringe e nelle vie respiratorie di ratto.

Le unità elementari di questo sistema chemorecettoriale differiscono da quelle dei calici gustativi, in quanto sono costituite da cellule epiteliali bipolari singole a contatto con terminazioni nervose e non presentano un tessuto di sostegno connettivo specializzato essendo semplicemente inserite fra le altre cellule epiteliali. C'è comunque la possibilità che cellule epiteliali simili a quelle gliali (glial-like) circondino le SCCs. Nei pesci, queste cellule sono innervate da nervi facciali o spinali (140) e il modello animale più usato per studi sulla funzionalità delle SCCs sono le pinne anteriori dorsali e pettorali del "rockling" (specie *Gaidropsarus mediterraneus* e *Ciliata mustela* del superordine dei Teleostei), che sono coperte da un numero grandissimo di queste cellule (141, 142). La risposta chimica poteva essere registrata elettrofisiologicamente solo da pinne in movimento ed era suscitata da un ampio spettro di stimoli; i risultati ottenuti supportavano l'ipotesi del ruolo chemosensoriale delle SCCs (143) e che queste cellule rispondessero prevalentemente a stimoli correlati alla ricerca di cibo o alla presenza di predatori, sebbene non si riscontrasse risposta a molti dei tipici stimoli gustativi (144). Fino a poco tempo fa, comunque, le SCCs erano considerate prerogativa dei pesci. Solo recentemente è stato suggerito che siano presenti anche in altre specie. Ad esempio fra gli anfibi, il *Bufo alvarius* era in grado di discriminare il gusto salato per mezzo della funzionalità chemosensoriale della pelle ventrale (145), dove molte cellule putativamente chemosensoriali erano innervate dai nervi spinali (146). Nella cavità orale degli anfibi, così come era stato descritto nei pesci, studi effettuati hanno riportato la sovrapposizione somiglianza strutturale delle SCCs con le cellule dei calici gustativi. Elementi cellulari con caratteristiche ultrastrutturali vicine a quelle delle SCCs (cellule bipolari con microvilli, vescicole apicali, reticolo endoplasmatico liscio con cisterne impaccate e contatti nervosi) sono stati trovati nel disco gustativo della rana (*Rana esculenta*), nel quale è stata dimostrata la presenza di tre differenti sistemi neuroepiteliali (147, 148).

3.5.4.2. SCCs nella cavità orale.

Nei pesci, sebbene le SCCs siano localizzate nella pelle dell'intero corpo, un altro sito preferenziale sembra essere la cavità orale, dove viene riportata una frequente associazione con i calici gustativi. Nel passato, è stato osservato che i calici gustativi si siano sviluppati durante la filogenesi dei vertebrati per mezzo di accumulazione di SCCs (137, 149). In varie specie sono state descritte strutture a morfologia intermedia fra calici gustativi e SCCs. Ad esempio, nelle valve orali di *Raja clavata*, sono stati trovati solo gruppi di cellule chemosensoriali bipolari, ma non calici gustativi (150). Più recentemente, in *Dario rerio* (zebrafish), è stato confermato che alcune SCCs possano circondare i calici gustativi (151). E' stato anche suggerito che alcune cellule nei calici gustativi potrebbero essere correlate al sistema delle SCCs sulla base della morfologia e del sito recettoriale del loro polo apicale (152). In accordo con questa ipotesi, i calici gustativi potrebbero essere considerati degli organi sensoriali contenenti svariati tipi cellulari, uno dei quali potrebbe essere correlato al sistema delle SCCs (152). Nei mammiferi è stato descritto un set specifico di SCCs associato con l'epitelio gustativo. Durante i primi giorni di vita dopo la nascita, l'epitelio della papilla circumvallata di ratto contiene cellule isolate con forma bipolare, contatti nervosi e granuli di tipo neuroendocrino (136). Le caratteristiche ultrastrutturali di queste cellule provano che sono elementi epiteliali con una spiccata omologia alle SCCs descritte nei vertebrati acquatici. E' stata poi riportata durante la prima settimana di vita postnatale la presenza di SCCs immunoreattive all' α -gustducin nella papilla circumvallata di ratto (Fig. 10) (153).



Fig.10. "SCCs" immunoreattive all' α -gustducin nell'epitelio gustativo di lingua di ratto in sviluppo.

In ratti appena nati, cellule isolate immunoreattive all' α -gustducin sono state trovate in varie parti dell'epitelio, e nei giorni successivi in aggiunta a cellule isolate immunoreattive all' α -gustducin di forma bipolare, compaiono anche piccoli calici gustativi. Studi successivi sulla differenziazione dell'epitelio della cavità orale in ratti appena nati, hanno dimostrato che cellule solitarie immunoreattive all' α -gustducin erano frequentemente presenti nelle papille circumvallata, foliata e

nasoincisiva, ma raramente nel palato molle (154, 155). Inoltre, suggeriscono che le cellule solitarie immunoreattive all' α -gustducin potrebbero essere correlate con la precoce capacità di risposta alle sostanze dolci precedentemente descritta in ratti appena nati (156). La differenza tra chemorecezione gustativa nel neonato e adulto di mammifero è ben conosciuta, e risiede nel fatto che in topi appena nati le cellule recettoriali sono caratterizzate da una ridotta velocità di ripolarizzazione accompagnata da una bassa capacità di "firing" (scarica) ripetitiva (157). Questi dati sono probabilmente relazionabili alla nutrizione particolare dei neonati di mammifero. Nella papilla vallata di ratti appena nati, la presenza di SCCs corre in parallelo al rapido sviluppo di nervi e neuroni (158, 159), suggerendo che una relazione anatomica e funzionale dovrebbe esistere tra le cellule chemosensoriali e il sistema nervoso intrinseco dell'apparato gustatorio in sviluppo.

Presi tutti insieme, i dati ottenuti sui ratti appena nati dimostrano che un sistema filogeneticamente primitivo di SCCs si sviluppa alla nascita, poi rapidamente rimpiazzato dai calici gustativi. Tutto questo suggerisce che tre differenti pathways sono coinvolti nella chemorecezione orale di ratti neonati, che succhiano latte: il sistema gustativo, il senso chimico comune e sistema delle cellule chemosensoriali solitarie. Nell'uomo, dati pertinenti le SCCs mancano quasi completamente e si riducono alla presenza di cellule sottili individuali, durante le prime fasi dell'ontogenesi della lingua, che sono immunopositive alla citocheratina 20, una "intermediate filament protein" che è presente esclusivamente nei calici gustativi e nelle cellule di Merkel epidermali (104).

3.5.4.3. SCCs nelle cavità nasali.

Nei mammiferi, le cellule solitarie immunoreattive all' α -gustducin di forma bipolare non sono presenti unicamente nell'apparato digestivo, ma vengono anche trovate nell'epitelio respiratorio e nell'organo vomeronasale della cavità nasale di topo (160). Le cellule immunoreattive sono state trovate solo nella porzione del neuroepitelio vicino al confine con il limitrofo epitelio non recettoriale. Questa localizzazione sembra simile a quella descritta nei pesci, dove le SCCs spesso si trovano al confine tra epitelio gustativo ed epitelio non recettoriale (151). Comunque, differenze specie-specifiche sembrano esistere, come riportato da uno studio parallelo a quello sopra citato, dove non sono state trovate cellule immunoreattive all' α -gustducin nell'organo vomeronasale, usando le stesse tecniche (135).

Nell'epitelio nasale, in ogni caso, recenti esperimenti hanno dimostrato una estesa popolazione di cellule solitarie chemosensoriali sia in topo, che in ratto (105). Tale popolazione di SCCs si estende lungo tutto l'epitelio nasale, forma contatti sinaptici con fibre del nervo afferente trigeminale ed esprimono recettori del gusto amaro (T2R8 di topo) e l' α -gustducin (Fig. 11). Studi funzionali indicano che sostanze amare applicate sull'epitelio nasale causano una risposta del nervo

trigeminal e provocano cambiamenti nella velocità di respirazione, dando alle SCCs dell'epitelio nasale un ruolo nell'attivazione dei riflessi trigeminali protettivi.

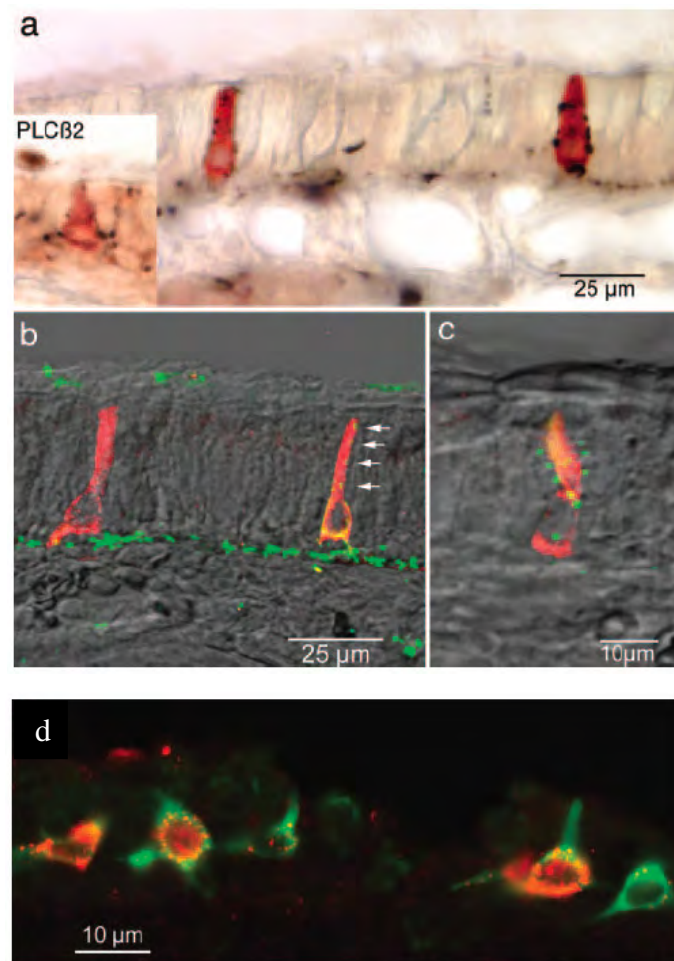


Fig.11. Innervazioni di cellule epiteliali nasali immunoreattive all' α -gustducin e coespressione di un T2Rs e α -gustducin in "SCCs" di epitelio nasale di topo. In a. due cellule di forma allungata immunoreattive all' α -gustducin (rosso) e al PGP-9.5 (nero). Inoltre nel riquadro piccolo si vede una situazione simile per cellule immunoreattive per il PLC β 2 (rosso). In b. e c. varie cellule immunoreattive all' α -gustducin (rosso-giallo) vengono contattate da fibre nervose immunoreattive al CGRP (verde). In d. infine il T2R8 di topo e l' α -gustducin vengono coesprese in "SCCs" di epitelio nasale murino.

In un successivo esperimento, per dimostrare se nuove SCCs vengono generate nell'epitelio nasale di topi adulti, topi wild type sono stati iniettati con il BrdU (5-bromo-2'-deossipuridina), un analogo della timidina che marca le cellule in divisione (1). Cellule marcate sia per il BrdU che per l' α -gustducin venivano riscontrate non prima dei tre giorni dopo l'iniezione dell'analogo e non rimanevano più a lungo dei 12 giorni dopo l'iniezione, suggerendo che le SCCs sottostavano ad un "turnover" simile al resto delle cellule dell'epitelio nasale (Fig. 12).

Nessuna cellula marcata con BrdU veniva trovata dopo 24 giorni dall'iniezione, suggerendo un relativamente rapido rimpiazzo delle SCCs. Questi risultati suggeriscono che le SCCs vengono rigenerate in topo adulto e che le nuove cellule maturano ad una velocità simile a quella delle cellule gustative di Tipo II.

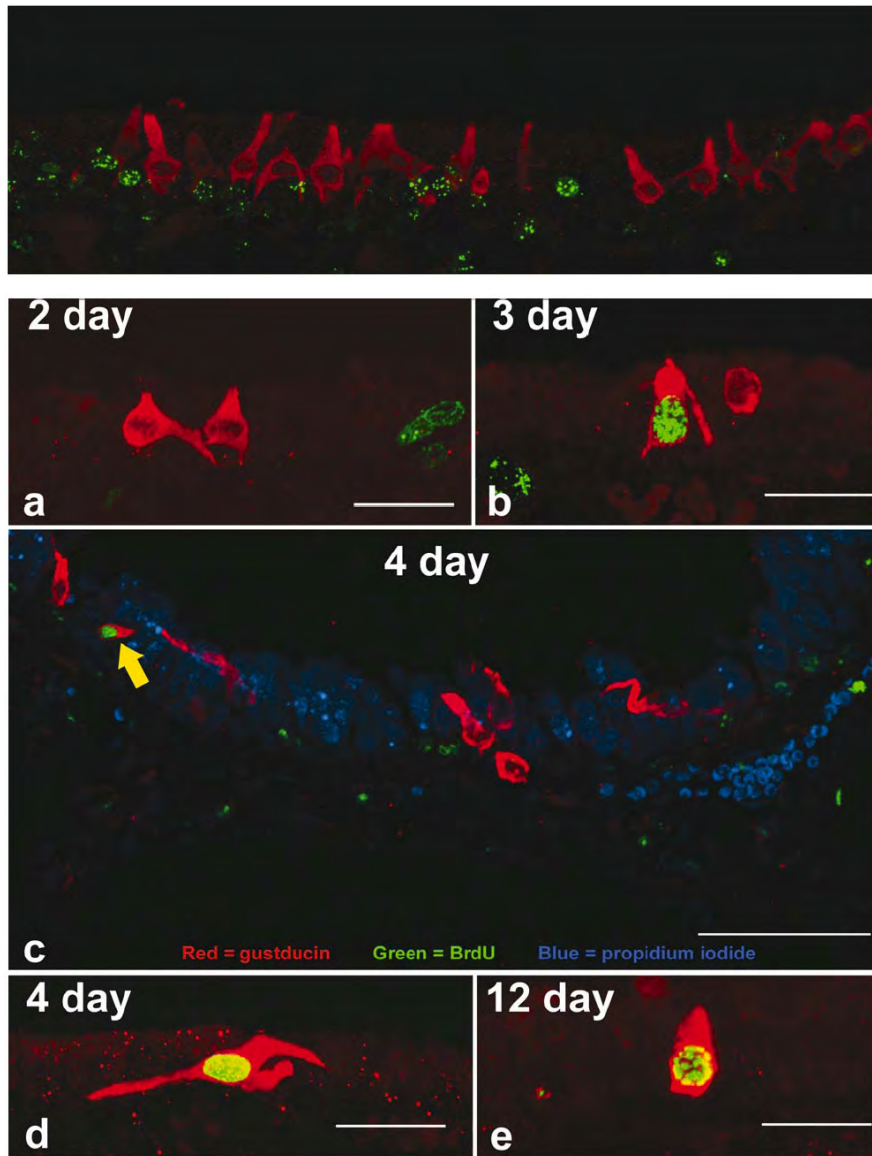


Fig.12. Doppie e triple immunocitochimiche sono state usate per identificare le SCCs (anti- α -gustducin = rosso), cellule che incorporano BrdU (anti-BrdU = verde) e cellule colorate con ioduro di propidio (blu). Poco dopo l'iniezione di BrdU, le cellule che lo incorporano sono localizzate nella lamina basale, ma nessuna è anche immunoreattiva all' α -gustducin. Dopo pochi giorni, anche cellule epiteliali più in alto sono marcate con il BrdU e alcune sono immunoreattive all' α -gustducin. Molte più cellule immunoreattive all' α -gustducin e che hanno incorporato il BrdU sono visibili dopo 10-12 giorni dall'iniezione del BrdU.

3.5.4.4. SCCs nella laringe.

Recentemente è stato descritto nella regione sopra-glottica della laringe di ratto un epitelio sensoriale specifico (specific laryngeal sensory epithelium – SLSE), nel quale si riscontrano schiere di SCCs (106). Due placche di SLSE sono state trovate, una ad ognuno dei due lati della laringe; la prima placca si trova nella parete ventro-laterale della laringe, mentre la seconda nella regione inter-aritenoidale. SCCs immunoreattive all' α -gustducin sono state facilmente localizzate e analisi ultrastrutturali hanno mostrato cellule con microvilli apicali impaccati, vescicole citoplasmatiche chiare e giunzioni citoneurali. Sono state poi riscontrati molti elementi immunoreattivi al PGP-9.5,

che è un marcatore delle cellule endocrine nelle vie aeree, dei quali solo una parte colocalizzavano con elementi immunoreattivi all' α -gustducin (Fig. 13).

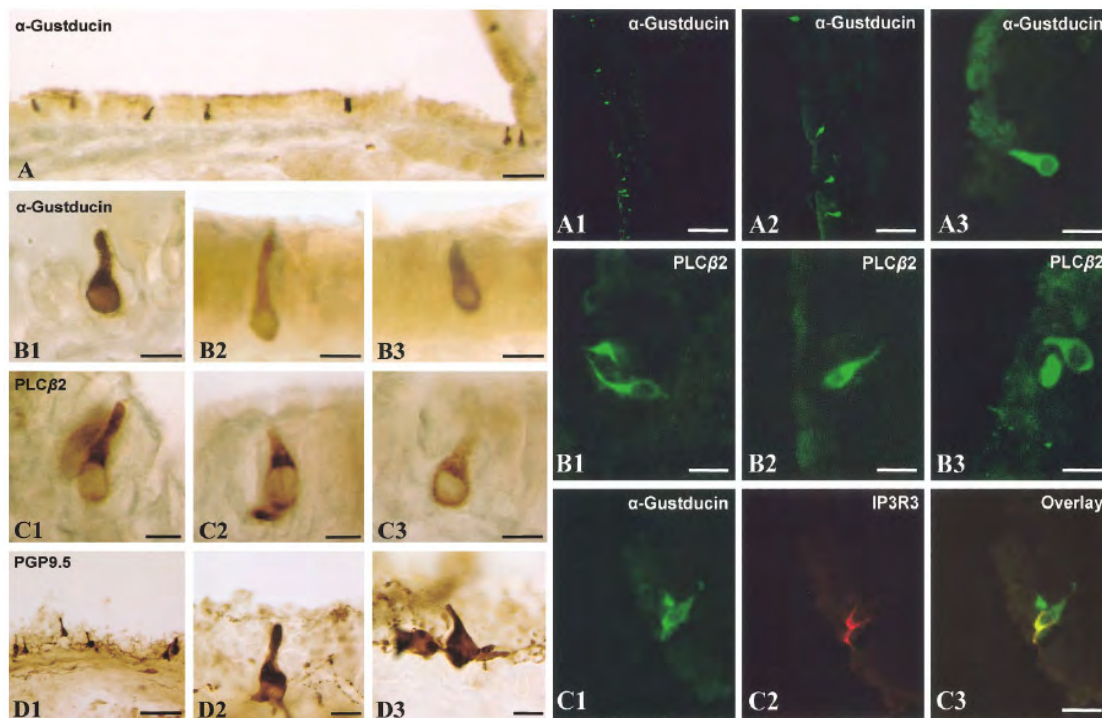


Fig.13. L'immunoperoxidasi dentata SCCs immunoreattive per l' α -gustducin, il PLC β 2 e il PGP-9.5 nell'epitelio sensoriale specifico della laringe. L'immunofluorescente conferma i dati dell'immunoperoxidasi e mostra la coespressione dell' α -gustducin e dell'IP3R3.

Comunque, le SCCs immunoreattive all' α -gustducin generalmente colocalizzano con il PGP-9.5. Questi dati, suggeriscono che l'SLSE è un epitelio chemorecettoriale localizzato in una posizione ottimale per rilevare l'entrata di sostanze nella laringe da entrambe le direzioni, faringa e tracheale rispettivamente.

3.5.4.5. SCCs nella trachea e bronchi.

Come negli epiteli di naso e laringe, anche in altre parti delle vie aeree sono presenti SCCs. E' il caso di recenti studi dove SCCs immunoreattive all' α -gustducin e/o al PLC β 2 sono state trovate in epiteli di trachea e bronchi di ratto (161). L'espressione di α -gustducin era concentrata nei processi apicali e lungo la superficie baso-laterale in cellule solitarie con caratteristiche ultrastrutturali tipiche delle cellule chemorecettoriali: forma a fiasca, a pera o bipolari con un processo apicale di microvilli molto fini che protendono nel lume cellulare (Fig. 14).

Comunque, essendo disponibili dati sulle SCCs di mammifero ottenuti solo nei roditori, la possibile presenza di questi elementi nelle vie aeree è stata investigata in un grande mammifero, il *Bos taurus* (116), la cui citologia è molto più simile a quella umana rispetto a quella dei roditori. SCCs immunoreattive all' α -gustducin o al PLC β 2 sono state osservate in tutte le vie aeree di bovino considerate (laringe, trachea e bronchi) (Fig. 15). Molto importante è stata la rilevazione di aree con

un'alta densità di SCCs nei bronchi di bovino, dimostrando la presenza di elementi ancillari a differenza dell'oversemplicazione di considerare il DCS fatto di semplici elementi isolati.

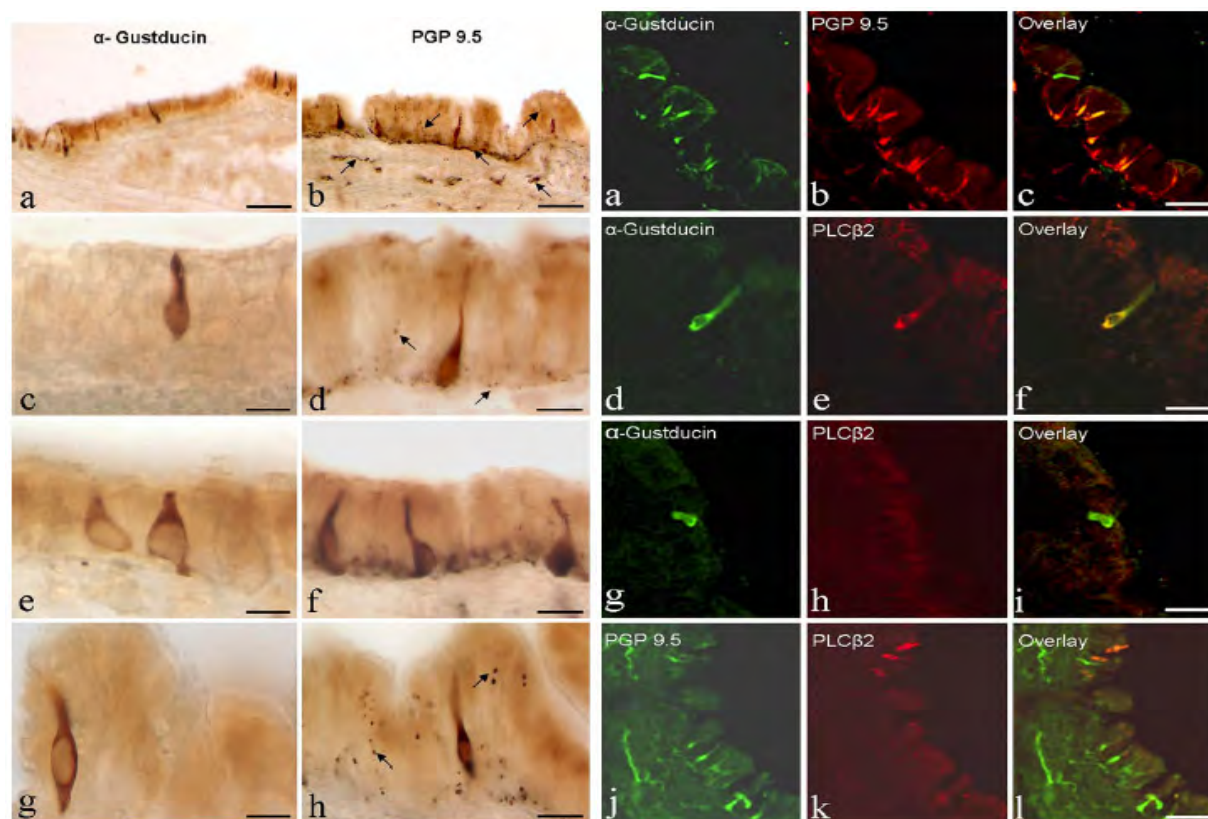


Fig.14. L'immunoperoxidasi dentota SCCs immunoreattive per l' α -gustducin e il PGP-9.5 nella regione subglottica della laringe (a,b) e nella parte prossimale (c,d), mediana (e,f) e distale (g,h) della trachea. L'immunofluorescente doppia conferma i dati dell'immunoperoxidasi e mostra inoltre nella trachea l'espressione dell' α -gustducin concomitante a quella del PGP-9.5 (a,b,c) o del PLC β 2 (d,e,f)(non sempre l' α -gustducin colocalizza con il PLC β 2 (g,h,i) e la coespressione del PGP-9.5 e del PLC β 2 o l'espressione del PGP-9.5 da solo (j,k,l).

Questi studi dimostrano che un sistema chemosensoriale diffuso composto da SCCs esiste lungo tutte le vie aeree dei mammiferi e non solo nella cavità nasale e nella laringe. Inoltre, molto recentemente è stato riportato che cellule epiteliali non ciliate delle vie aeree (fra cui le cellule di Clara, "Clara cells") di ratto esprimono componenti di pathways di segnale distinti fra loro (marker di secrezione e di chemorecezione) e viene suggerito che gli eventi secretori possano essere guidati da un meccanismo molecolare attivato dal legame di sostanze luminali a recettori accoppiati alle G-protein (G protein coupled receptor –GPCR) (162). Cellule non ciliate di trachea e bronchi di ratti adulti immunoreattive all' α -gustducin, lo erano anche per marker secretori tipici delle vie aeree, CC10 e CC26. Inoltre il regolatore transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), che è un trasportatore di ioni cloro correlato alla secrezione, veniva osservato nella stessa popolazione di cellule non ciliate immunoreattive all' α -gustducin e al PLC β 2 a tutti i livelli dell'epitelio delle vie aeree.

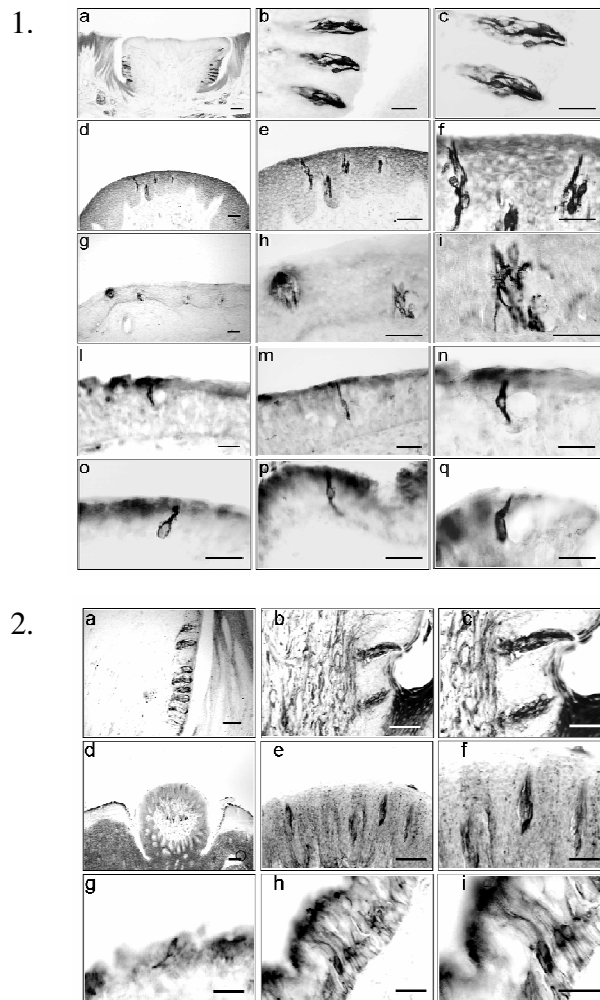


Fig.15. Calici gustativi e “SCCs” immunoreattivi all’ α -gustducin (1.) o al PLC β 2 (2.) osservati nelle papille circumvallata (1. e 2.a-c) e fungiforme (1. e 2.d-f) e negli epiteli di laringe (1.g-i), trachea (1.l-n e 2.g) e bronchi (1.o-q e 2.h,i), rispettivamente.

3.5.4.6. Considerazioni generali riguardo le SCCs.

Stabilire un’omologia fra SCCs di pesci, anfibi e mammiferi è difficile, in parte perché queste cellule fanno parte di sistemi eterogenei. Comunque, le scoperte in mammifero hanno pienamente confermato le precedenti fatte in pesce riguardanti la morfologia generale delle SCCs, anche se nei mammiferi le SCCs vengono usate come chemorecettori interni piuttosto che esterni. Nella cavità orale, l’omologia tra le SCCs delle diverse specie descritte risulta evidente, anche se la loro relazione con il sistema gustativo richiede chiarificazioni future. E’ interessante, inoltre, notare che le SCC si sviluppano prima dei calici gustativi nei mammiferi, cosiccome è stato mostrato anche nei pesci nelle prime fasi dell’ontogenia (151, 163).

Una questione più complessa riguarda il possibile parallelismo fra sistemi chemosensoriali di vertebrati ed invertebrati. Molti sistemi chemosensoriali di invertebrati utilizzano proteine recettoriali con sette domini transmembrana, allo stesso modo nei vertebrati le proteine recettoriali nelle cellule gustative e nelle SCCs sono sette-transmembranali (164). In generale, l’organizzazione anatomica del DCS assomiglia molto ai sistemi utilizzati degli invertebrati. Il numero di sensori

chimici che possiede un invertebrato può essere enorme e i recettori possono coprire aree anche molto grandi della loro superficie corporea, conferendo una serie di vantaggi: estensione della percezione spaziale, maggior numero di stimoli discriminabili e aumento della sensibilità come somma di risposta (165). Simili considerazioni potrebbero essere applicabili anche al DCS dei vertebrati.

3.5.5. Somiglianze e differenze fra il sistema gustativo primario e il DCS

Sia il sistema gustativo primario che il DCS sono comunemente composti da cellule epiteliali bipolari con un ruolo chemorecettoriale, indicato dalla loro morfologia. Oltretutto, i meccanismi molecolari della trasduzione del segnale nei due sistemi hanno evidenti analogie. In base a queste somiglianze, il sistema gustativo primario potrebbe essere visto come una porzione specializzata del DCS localizzata nella cavità orofaringea e differenziatasi per l'analisi del cibo.

D'altra parte ci sono anche delle differenze notevoli fra i due sistemi, dovute principalmente alla differente organizzazione anatomica. Altre differenze sono riscontrabili nell'apparente assenza di strutture ancillari intorno alle SCCs e ai cluster chemosensoriali (107, 166) e nel fatto che il DCS copre un'area molto ampia e polimorfica. Cosiccome succede negli invertebrati e nei vertebrati minori (165), dove le cellule chemosensoriali sono elementi isolati o piccoli cluster non organizzati in organi differenziati, localizzati in siti strategici (dotti secretori del pancreas, fegato e ghiandole salivari, ma non nel rispettivo parenchima), anche le cellule del DCS dei vertebrati mostrano un'organizzazione semplice e cellule solitarie chemorecettoriali vengono trovate nei dotti delle ghiandole sierose di von Ebner durante lo sviluppo della lingua.

3.5.6. Clusters chemosensoriali

Recentemente, è stata descritta la presenza di una nuova struttura chemosensoriale nella laringe, dove ai calici gustativi (167) e alle SCCs (106) si aggiungono i "clusters chemosensoriali" (107, 166). Questi clusters sono organizzati come i calici gustativi in strutture multicellulari, composte a differenza di quest'ultimi da solo 2-3 cellule chemorecettoriali. Hanno diametro più piccolo e sono più bassi dei calici gustativi. I clusters della laringe hanno cellule immunoreattive all' α -gustducin o al PLC β 2, più corte di quelle dei calici gustativi, con processi basali poco sviluppati, e processo apicale più corto e fino. Molte cellule mostrano forma simile ad una fiasca con un corpo molto largo e assenza di processi basali. Nei clusters mancano il poro ed una precisa delimitazione dall'epitelio circostante, facendo assomigliare queste strutture più ad una aggregazione di SCCs, che ad un calice gustativo vero e proprio. La dimostrazione dell'esistenza di clusters chemosensoriali rafforza l'ipotesi di un legame filogenetico fra cellule gustative e SCCs, facendo apparire i clusters come strutture di transizione tra i calici gustativi della laringe in posizione rostrale e le SCCs distalmente

localizzate nelle aree specifiche della laringe chiamate SLSE (106). Sia le SCCs che le cellule chemosensoriali dei clusters sono localizzate in aree molto ricche di assoni intraepiteliali. Inoltre sembra che nella laringe l'espressione dell' α -gustducin nei clusters e negli altri due sistemi chemorecettoriali (SCCs e calici gustativi) sia correlata all'età (166). Le SCCs immunoreattive all' α -gustducin sono abbondanti in ratti di 5 settimane, ma diminuiscono drasticamente in numero in ratti più vecchi ritrovandone solo alla base dell'epiglottide, mentre i clusters chemosensoriali e i calici gustativi che contengono cellule immunoreattive all' α -gustducin non presentano differenze in numero e localizzazione correlati all'età e se ne ritrovano principalmente nella parte alta dell'epiglottide e nei canali laterali faringei del cibo. Questa distribuzione rispecchia anche la funzione delle SCCs, dei clusters e dei calici gustativi laringei: ricezione nocicettiva le prime e ricezione gustativa gli altri due.

3.5.7. Il ruolo del DCS

Come già detto, se il sistema gustativo classico gioca un ruolo determinante nella percezione del cibo, il DCS sembra piuttosto un sistema d'allarme. Gli apparati respiratorio e digestivo hanno un'autonomia relativamente alta dal sistema nervoso centrale dovuta ad un sistema nervoso intrinseco, che regola strutture motorie e secretorie (168). Nei due apparati, il DCS potrebbe procurare l'informazione riguardante il microambiente luminale o intramurale, facendo da braccio afferente per secrezione ghiandolare, contrazione muscolare ed altri meccanismi intrinseci. I riflessi locali potrebbero essere generati dall'interazione tra il DCS e gli elementi circostanti. La trasmissione di informazione fra il DCS e il sistema nervoso centrale è possibile, ma appare limitata alle cellule chemosensoriali innervate tramite assoni afferenti. Tali cellule sembrano essere una minoranza e solitamente sono site nella lingua e nella laringe in aree ricche di innervazioni intraepiteliali. Gli elementi non innervati hanno probabilmente un'azione paracrina.

La capacità chemorecettoriale del DCS probabilmente protegge contro l'entrata di sostanze esogene e ne permette la rilevazione una volta entrate. Inoltre potrebbe avere un ruolo importante nella difesa contro i batteri patogeni che entrano nei due apparati, soprattutto di quelli che operano per mezzo della strategia del "quorum sensing" (169). Per le sue caratteristiche strutturali e biochimiche, il DCS potrebbe intercettare le molecole che i batteri utilizzano per comunicare fra loro (ad esempio gli acyl homoserine lactones, dove la parte lattonica ha molta importanza essendo un composto percepibile come amaro), usandole per indurre la risposta protettiva contro i batteri stessi. Con le conoscenze attuali, sembra che a livello filogenetico le SCCs e i clusters siano i componenti più antichi di tutto il sistema chemosensoriale diffuso, probabilmente coinvolto nei meccanismi difensivi e digestivi.

Il DCS, infine, sembra un target per la terapia medicinale potenzialmente nuovo, dato che le informazioni ottenute da questo sistema inducono riflessi e secrezione. Ne deriva che gli apparati respiratorio e digestivo possano essere modulati da sostanze che agiscono sui chemorecettori del DCS, fattore molto importante nel possibile trattamento di patologie congenite e/o metaboliche, quali la fibrosi cistica, l'asma e stati di sofferenza legati al metabolismo.

3.6. Patologie congenite dell'apparato respiratorio e gastrointestinale, rigenerazione del fegato, chemorecezione e sistema chemosensoriale diffuso

Molte patologie congenite possono interessare l'apparato respiratorio e quello digestivo, ma fra tutte solo alcune sono di particolare interesse agli scopi del dottorato di ricerca da me svolto per la loro correlazione con il sistema chemosensoriale diffuso. Una patologia congenita molto interessante ed importante che colpisce le vie aeree è la Fibrosi Cistica (CF), mentre una patologia metabolica congenita dell'apparato gastrointestinale probabilmente collegata alla chemorecezione è l'iperprolinemia di tipo II (HPII).

La CF è la causa più comune di patologia cronica dei polmoni di bambini e giovani adulti della popolazione caucasica, provocando una risposta infiammatoria abnorme e uno squilibrio antiossidante nel polmone, e viene causata da mutazioni del gene CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator), che è il canale di ioni cloro dominante localizzato nelle membrane apicali di cellule di tessuto epiteliale, specialmente del polmone e del colon (170, 171). Il CFTR viene regolato dalla concentrazione di cAMP ed è un membro della superfamiglia di trasportatori ABC (ATP-binding cassette). La secrezione e i riflessi protettivi delle vie aeree sono il risultato della stimolazione chimica di tipo non salino, legata a pH e tonicità della soluzione stimolante e non alle sue proprietà gustative. Oltre a sostanze chimiche, anche microrganismi, virus ed altri agenti ambientali possono stimolare la secrezione. La secrezione delle vie aeree viene mantenuta da cellule epiteliali non ciliate specializzate, i cui fenotipi variano con la loro localizzazione topografica: cellule di Clara specialmente a livello dei bronchioli, ed altre cellule di tipo sieroso a livello di laringe, trachea e bronchi. Come spiegato fino ad ora, le vie aeree presentano anche altri tipi cellulari epiteliali specializzati (SCCs) che contengono gli elementi molecolari della cascata chemorecettoriale (106, 161). Vari studi hanno dimostrato che cellule esprimono marcatori specifici della secrezione, come le proteine secretorie specifiche delle cellule di Clara (CC10 e CC26), esprimevano anche il CFTR (172, 173). Le SCCs posseggono caratteristiche ultrastrutturali tipiche delle cellule chemorecettoriali ed esprimono l' α -gustducin (indice di una funzione recettoriale). Il modo in cui queste cellule trasmettono il segnale rilevato non è ancora chiaro, ma potrebbe coinvolgere il rilascio di molecole di segnale che potrebbero modulare l'attività di cellule secretorie vicine oppure operare in sinergia con le stesse. In ogni caso, non è da scartare la possibilità che

anche le stesse cellule secretorie potrebbero possedere la capacità chemorecettoriale ed essere quindi capaci di rilevare sostanze esogene nel contenuto extracellulare tramite le loro protusioni apicali prominenti. Quest'ultimo caso suggerirebbe la presenza di riflessi intracellulari causati dalla presenza simultanea dei meccanismi secretori e chemosensoriali nello stesso tipo cellulare. Un recente studio ha riportato che cellule epiteliali non ciliate delle vie aeree di ratto esprimono componenti di pathways di secrezione e di chemorecezione e viene suggerito che gli eventi secretori possano essere guidati da un meccanismo molecolare attivato dal legame di sostanze luminali a recettori accoppiati alle GPCR (162). Cellule non ciliate di trachea, bronchi e bronchioli di ratto adulto immunoreattive all' α -gustducin, lo erano anche per marker secretori tipici delle vie aeree, CC10 e CC26. Inoltre il CFTR veniva osservato nella stessa popolazione di cellule non ciliate immunoreattive all' α -gustducin e al PLC β 2 a tutti i livelli dell'epitelio delle vie aeree (Fig. 16). Presi insieme questi dati suggeriscono che la modulazione con nuovi medicinali delle cellule sierose, esprimenti componenti molecolari di tipo chemorecettoriale, potrebbe essere utile nella terapia di pazienti affetti da Fibrosi cistica.

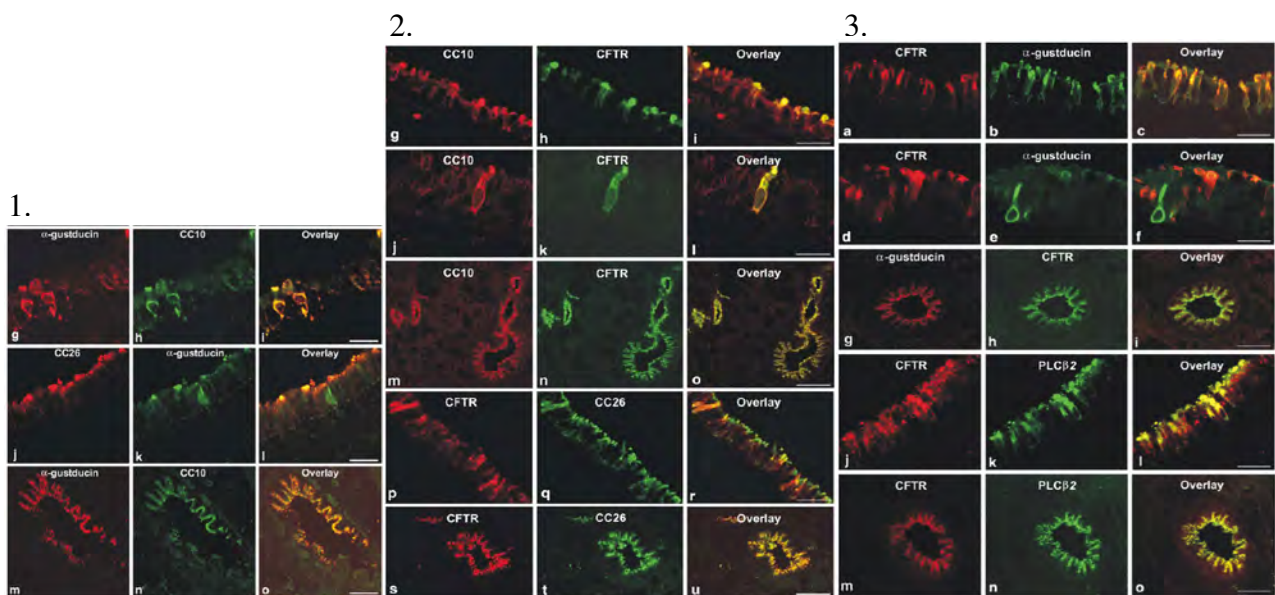


Fig.16. L'immunofluorescente doppia mostra negli epiteli di trachea, bronchi e bronchioli extrapulmonari l'espressione dell' α -gustducin concomitante a quella del CC10 (1.g-i e 1.m-o), del CC26 (1.j-l) e del CFTR (3.a-i); l'espressione del CFTR concomitante a quella del CC10 (2.g-o), a quella del CC26 (2.p-u) o a quella del PLC β 2 (3.j-o).

L'iperprolinemia di tipo II (HPII) è un errore congenito del metabolismo a ereditarietà autosomale recessiva, dovuto alla mutazione del gene codificante l'enzima P5CDh, che è una [Delta]1-pirrolina-5-carbossilato deidrogenasi (174-176). Questo enzima, una deirogenasi della matrice mitocondriale NAD(+) dipendente, catalizza il secondo step del pathway degradativo della prolina, che converte la pirrolina-5-carbossilato (P5C) in glutammato. Altri pathways connessi con il catabolismo della prolina sono i ciclo dell'urea e degli acidi tricarbossilici. Nell'uomo, sebbene

molti adulti con HPII appaiono normali, la deficienza dell'enzima P5CDh può essere correlata a manifestazioni di tipo neurologico, come attacchi epilettici e ritardo mentale (177). A livello biochimico c'è un accumulo di prolina e di P5C nel sangue: nel caso della prolina di 10-15 volte superiore al normale (100-350 mM) e nel caso della P5C di 10-40 volte superiore al normale (0.2–2 mM). Inoltre viene osservato anche un loro accumulo nell'urina e nel fluido cerebrospinale. L'enzima P5CDh è una proteina ubiquitaria, che nel fegato è presente in due varianti: una forma P5CDh classica e una forma inducibile chiamata LRRP Ba1-651 (178). La LRRP Ba1-651, una proteina correlata alla rigenerazione del fegato indotta da epatectomia parziale, è classificata come membro della superfamiglia dell'aldeide deidrogenasi (ALDh) di tipo 4A1. Questa proteina mostra basicamente tre domini strutturali e funzionali: parte della intermediate filament like-protein, la [Delta]1-pirrolina-5-carbossilato deidrogenasi e il recettore del fattore atriale natriuretico (recettore ANF), con dei residui del dominio 7tm_3 (Fig. 17).

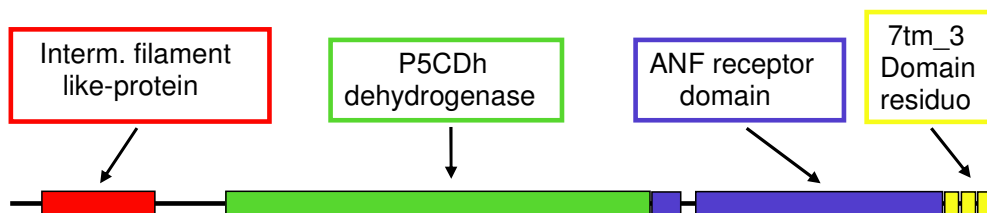


Fig.16. Rappresentazione schematica dei domini strutturali della LRRP Ba1-651.

Sembra che tutti i mammiferi amniotici posseggano l'ortologo di ratto della forma P5CDh inducibile. Molto importante è il dominio del recettore AFN, in quanto fa parte della famiglia di recettori con una regione di legame, che mostra un'altissima omologia di sequenza col dominio extracellulare amminotermine del recettore del gusto dolce di mammifero T1R2. La forma P5CDh inducibile conserva nella sua sequenza tutto il dominio amminotermine extracellulare del T1R2, parte del dominio a nove cisteine per la dimerizzazione della famiglia 3 dei GPCRs e solo alcuni piccolissimi motivi del dominio 7tm_3 transmembranale. Quindi a livello evolutivo la forma P5CDh inducibile non è altro che la fusione a livello di transcriptoma della forma P5CDh classica e della parte recettoriale del T1R2. Ne deriva che la LRRP Ba1-651 di fegato verrebbe indotta dal cambiamento della concentrazione di molecole di tipo dolce (come il glutammato o il glucosio). Tramite il cambio conformazionale della struttura proteica del sito di legame per la molecola dolce, viene reso accessibile al P5C il sito catabolico dell'enzima P5CDh. Il significato biologico nel fegato di questa proteina inducibile non è ancora chiaro, però essendo il fegato l'unico organo in grado di rigenerare in risposta a epatectomia parziale o danno epatico, caratterizzando ulteriormente la forma P5CDh inducibile si aprirebero prospettive molto importanti nel trattamento del HPII e nel trapianto del fegato.

4. Scopi del dottorato

Gli studi sull'alimentazione umana hanno un ruolo molto importante a livello mondiale. Da un lato l'industria alimentare e quella farmaceutica sviluppano nuovi modi per rendere più appetibile il loro prodotto alimentare o meno disgustosa l'assunzione una medicina; dall'altro le popolazioni più povere o del terzo mondo non hanno la stessa accessibilità alle fonti di sostentamento come i paesi industrializzati e più avanzati tecnologicamente (e quindi anche più ricchi). Ci sono quindi motivi economico/sociali che spingerebbero gli studi verso il filone alimentare. Sarebbe bello risolvere la fame nel mondo, ma non è fra gli obiettivi principali delle società più avanzate, anzi la maggior parte ha per unico scopo il profitto. Fortunatamente la ricerca universitaria copre in parte il disinteresse sociale per le popolazioni povere, cercando di scoprire come curare molte malattie, come sfruttare al massimo le risorse alimentari e di altro tipo, e come ottenere cibo in modo più semplice anche nelle regioni più svantaggiate.

Gli studi su gusto e olfatto in questo senso, sono stati e saranno molto utili per permettere di capire come funzionano i sistemi gustativo e olfattivo sia in persone normali che in persone affette da disturbi di questi sensi. Alcuni esempi molto significativi sono legati a patologie a carico del sistema nervoso connesso al gusto e all'olfatto, a malattie metaboliche congenite, a malattie degli apparati respiratorio e digerente, a malattie causate da virus e batteri, ecc. Questi disturbi possono essere provocati da svariate cause ed eventi che danneggiano direttamente o indirettamente il sistema gustativo, olfattivo e nervoso, ed è per questo che ci sono infiniti filoni di studio, che si occupano degli argomenti più vari riguardanti gusto e olfatto.

Per quanto riguarda il mio dottorato mi sono dedicato alla caratterizzazione delle cellule chemorecettoriali delle vie aeree di mammifero, che come riportato nella parte introduttiva della tesi sembrano essere correlate con le cellule sierose delle vie respiratorie, condividendo nella stessa cellula sia il meccanismo sensoriale che secretorio. Tali cellule sono immunopositive al CFTR, che in caso non sia funzionante a seguito di mutazione, è la causa diretta della malattia congenita delle vie aeree chiamata Fibrosi Cistica.

Inoltre, fra le moltissime malattie metaboliche congenite, mi sono dedicato all'iniziale caratterizzazione di un enzima del fegato chiamato P5CDh-T1R2 inducibile (LRRP Ba1-651) - visto che la mutazione dell'enzima P5CDh costitutivamente presente provoca l'iperprolinemia di tipo II (HPII) - per capire se l'enzima inducibile possa essere il responsabile (in termini positivi) del quadro sintomatologico (lieve ritardo mentale e crisi epilettiche) non tanto severo come nel caso dell'iperprolinemia di tipo I (mutazione della prolina-ossidasi), che può provocare grave ritardo mentale, anomalie renali e schizofrenia. Il motivo di interesse da parte mia, per l'enzima P5CDh-T1R2 inducibile, risiede nel fatto che parte consistente di questa proteina è un recettore del gusto dolce, il T1R2. A livello evolutivo potrebbe essersi sviluppata questa proteina chimerica, che conserva ed unisce

la funzione enzimatica del P5CDh e la funzione recettoriale di sostanze dolci. La sua espressione permetterebbe al fegato in particolare di aumentare il catabolismo della prolina, che è connesso al ciclo degli acidi tricarbossilici (fonte di energia per la cellula), durante stati patologici o nel caso di rigenerazione dell'organo e per sopperire alla mancanza dell'enzima P5CDh costitutivo in caso di HP11.

Riassumendo, il lavoro svolto si è articolato nel caratterizzare:

- le cellule chemorecettoriali e il sistema DCS di ratto, topo e bovino (quest'ultimo per la somiglianza con le vie aeree dell'uomo);
- l'enzima P5CDh-T1R2 inducibile, studiando ratto e uomo, per capire la sua correlazione con stati patologici come l'HP11 e la metastasi del fegato e traumatici come l'epatectomia parziale.
- La funzione dei feromoni batterici prodotti durante in "quorum sensing", per capire se gli acyl homoserine lactones (AHLs) dei batteri gram negativi possano direttamente provocare stati infiammatori o apoptosi delle cellule dell'epitelio delle vie aeree o se servano unicamente per la comunicazione fra batteri.

5. Materiali e Metodi

5.1. Materiali

5.1.1. Animali da laboratorio

Sono stati utilizzati sia animali wild type che transgenici. Sono stati scelti animali di specie differenti in base allo scopo dell'esperimento e al tipo di metodi utilizzati: animali semplici da maneggiare, che diano risultati riproducibili e che siano il più vicini geneticamente all'uomo. Durante il mio dottorato sono stati utilizzati precisamente roditori come topo e ratto, ma per confermare in altri mammiferi i medesimi risultati, anche bovino. Per quanto riguarda gli animali transgenici, sono stati scelti dei topi che esprimono una proteina fluorescente, l'eGFP (green fluorescence protein), sotto il controllo della sequenza promotore di alcuni geni della cascata chemorecettoriale. Come risultato, la fluorescenza di colore verde verrà osservata solo nei tessuti dove il promotore è attivo e il transgene venga tradotto nella proteina GFP funzionante.

5.1.2. Strumenti da laboratorio

Sono stati utilizzati sia strumentazioni specificamente studiate per la biologia molecolare, sia macchinari per l'ottenimento di sezioni di tessuto su vetrino, sia strumenti per la visualizzazione di preparati citologici e tissutali e la cattura delle immagini di interesse. Fra gli strumenti da biologia molecolare: termociclatore per PCR (reazione di polimerizzazione a catena), bagnetto termostato, incubatori a diverse temperature, micro centrifughe; fra quelli per l'ottenimento di sezioni tissutali: microtomo e criostato; fra quelli per l'imaging: microscopio ottico ad alta risoluzione Olympus BX50, stereo microscopio Olympus SZX12 e confocale FV300 e camere digitali SpotCam RT Slider Diagnostic Instruments e color KY-F58 JVC; altri: freezer -80°C (per stoccaggio campioni), micro pompa (per perfusione animali), spettrofotometro (per misurare la concentrazione dei campioni) e agitatore orbitale.

5.1.3. Softwares utilizzati

- Per il disegno dei primers utilizzati per la PCR: Primer Designer v2.0 della Scientific & Educational Software e Amplify per Macintosh di Bill Engels dell'Università del Wisconsin.
- Per l'allineamento di sequenza: ClustalX v1.81, versione per Windows di ClustalW e BLASTP o BLASTN del sito della NCBI (National Center for Biotechnology Information).
- Per la cattura di immagini: ImagePro Plus v4.0 della Media Cybernetics e Fluoview v5.0 della Olympus Corporation.
- Vari: PhotoShop v7.0; Corel v11; PowerPoint Win2003.

5.1.4. Links di pagine internet utilizzati

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Ricerca bibliografica: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

Biblioteca Meneghetti: <http://meneghetti.univr.it/rivistesito.php>

BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

UniGene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Pager&DB=unigene>

Oligo Analyzer: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

Elettronic PCR: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/>

5.2. Metodi

5.2.1. Perfusione degli animali, fissaggio con paraformaldeide e crioprotezione dei tessuti fissati

Gli animali, dopo essere stati anestetizzati, vengono perfusi infilando nel ventricolo sinistro del cuore un ago attaccato al tubo di perfusione, nel quale viene pompata una soluzione di 1xPBS, fino a completo dissanguamento dell'animale (si apre la vena cava superiore per permettere il deflusso del sangue). Quando il fegato e l'animale sono impalliditi e gli occhi dell'animale sono completamente bianchi, si ferma la pompa, si mette il tubo di perfusione in una soluzione al 4% di PFA (paraformaldeide) in 1xPBS, e si perfonde l'animale il tempo necessario alla completa fissazione dei tessuti. Si prelevano gli organi che servono per gli esperimenti successivi e si post-fissa da 2 ore a tutta la notte (ON) in 4% PFA con il 25% di saccarosio per la crioprotezione.

8% Paraformaldeide (PFA): scaldare 100 mL di H₂O distillata a 60°C; aggiungere 8g di PFA in polvere; mescolare 5-10 min fino a che sia completamente disciolta; spegnere la parte riscaldante dell'agitatore e aggiungere 2 gocce di 10N NaOH ogni 100mL di soluzione 8% PFA; mescolare 5-10 min fino a che la soluzione non si chiarifica; filtrare e conservare a 4°C; per fare la 4% PFA, diluire 1:1 la soluzione all'8% con 0.2M di PB (pH7.2).

5.2.2. Epatectomia parziale di fegato di ratto

Il ratto viene anestetizzato (cloralidrate 7.2% in soluzione salina → inniettati 0.5mL/100gr di peso corporeo), viene depilato l'addome e si prepara l'animale per la successiva chirurgia. Viene aperto l'addome un centimetro sotto il diaframma con un taglio da un lato all'altro, viene clampata l'arteria celiaca, vengono rimossi rapidamente i 2/3 del fegato (193), suturati con Histoacryl (adesivo tissutale costituito da enbucrilato) della Braun Aesculap, Germania, e l'arteria celiaca viene liberata in modo che tutti gli organi connessi con questa arteria non vadano in ischemia. Si controlla che non vi siano perdite vistose di sangue e si richiude l'animale suturando con filo chirurgico. Il fegato rimosso, viene subito congelato in azoto liquido per essere utilizzato come controllo a tempo 0 per

gli esperimenti di RT-PCR. Successivamente, dopo 72 ore dall'epatectomia parziale viene sacrificato il ratto e prelevato il fegato rimanente per sottoporlo agli stessi esperimenti del controllo a tempo 0.

5.2.3. Produzione di sezioni su vetrino al microtomo per immunoistochimica (IHC)

Il tessuto, dopo post-fissazione e crioprotezione con saccarosio, viene lavato in 1xPBS e sistemato sul blocchetto congelante del microtomo. Si attende che il tessuto sia completamente congelato, si tagliano sezioni dai 20 ai 40 μm , si raccolgono con un pennellino in una piastra petri riempita di 1xPBS e si sistemano ordinatamente su dei vetrini carichi positivamente per permettere un'adesione molto forte al vetrino stesso dopo disidratazione delle sezioni ON. Per esperimenti ripetibili, si sistemano le sezioni in modo seriato su vetrini numerati in modo che un vetrino sia il consecutivo dell'altro. I vetrini se non vengono utilizzati immediatamente per esperimenti di IHC, possono essere conservati a -20°C per almeno un anno.

5.2.4. Produzione di sezioni su vetrino al criostato per ibridizzazione insitu (ISH) e immunoistochimica (IHC)

Dopo post-fissazione e crioprotezione con saccarosio, i tessuti vengono immersi in mezzo di inclusione e congelati omogeneamente in isopentano mantenuto freddo da ghiaccio secco o azoto liquido. A questo punto gli organi possono essere conservati per mesi a -80°C . Si sistema il tessuto incluso su un blocchetto per criostato, si tagliano sezioni di 6-20 μm alla temperatura di -20°C e si sistemano in modo seriato su dei vetrini carichi positivamente. Dopo aver raccolto tutte le sezioni di cui si ha bisogno, si lasciano qualche minuto ad asciugare a temperatura ambiente e si possono conservare per qualche settimana a -80°C . L'unica differenza nella preparazione dei vetrini fra quelli utilizzabili per l'ISH e l'IHC, risiede nel fatto che a partire dalla perfusione fino all'ottenimento delle sezioni su vetrino tutte le soluzioni, i materiali e gli strumenti utilizzati devono essere necessariamente RNAsi "free" per evitare che l'RNA, utilizzato come stampo per produrre la sonda da ibridizzare, venga degradato provocando la non riuscita dell'esperimento di ISH.

5.2.5. Estrazione dell'RNA totale e purificazione dell'RNA messaggero

Le istruzioni per l'isolamento dell'RNA con il reagente TRIzol (Invitrogen) sono riassunte qui di seguito: (Reagenti richiesti: Cloroformio; Isopropanolo; 75% Etanolo in acqua RNasi free)

1. Omogeneizzazione: Omogeneizzare i campioni di tessuto in 1 mL di TRIzol per ogni 50-100 mg di tessuto usando dei potter di vetro. Rimuovere il materiale insolubile

- dall'omogeneizzato centrifugando a 11500 rpm (12000 x g)(rcent = 8.4 cm) per 10 min a 2-8°C → Il supernatante contiene l'RNA.
2. Fase di separazione: Incubare i campioni omogeneizzati per 5 min a 15-30°C per permettere la dissociazione completa dei complessi nucleoproteina. Aggiungere 0.2 mL di Cloroformio per ogni mL di TRIzol utilizzato. Tappare le eppendorf , agitarle vigorosamente con le mani per 15 secondi e incubarle per 2-3 min a 15-30°C. Centrifugare il tutto a non più di 11500 rpm per 15 min a 2-8°C → La soluzione acquosa superiore incolore contiene l'RNA.
 3. Precipitazione dell'RNA: Trasferire la fase acquosa in una nuova eppendorf e conservare se si desidera la fase organica per un successivo isolamento di DNA e proteine. Precipitare l'RNA aggiungendo 0.5 mL di Isopropanolo per ogni mL di TRIzol inizialmente usato. Mescolare bene, incubare per 10 min a 15-30°C e centrifugare a non più di 11500 rpm per 10 min a 2-8°C → L'RNA precipita come pellet gelificato a lato e nel fondo dell'eppendorf.
 4. Lavaggi dell'RNA: Rimuovere il supernatante delicatamente e lavare il pellet con almeno 1 mL di 75% Etanolo per ogni mL di TRIzol inizialmente usato. Vortexare e centrifugare a non più di 8000 rpm (7500 x g) per 5 min a 2-8°C.
 5. Risospensione dell'RNA: Alla fine della procedura, rimuovere il supernatante delicatamente e lasciare asciugare brevemente all'aria l'RNA (IMP: non lasciare asciugare completamente l'RNA perché diminuirebbe drasticamente la sua solubilità). L'RNA parzialmente disciolto mostra un rapporto A260/280 < 1.6. Aggiungere 75-100 µL di acqua RNasi free e risospendere l'RNA pipettando la soluzione su e giù alcune volte (in aggiunta si può incubare la soluzione per 10 min a 55-60°C). Si può risospendere anche in 100% Formamide (deionizzata) e conservare il tutto a -80°C.
 6. Misurazione della concentrazione dell'RNA: Diluire in 3 ripetizioni l'RNA 1:100 (1µL di RNA + 99 µL di acqua), misurare con Biofotometro e utilizzare la media delle tre letture come concentrazione dell'RNA espressa in µg/µL (rapporto A260/280 non deve essere < 1.6). Caricare 1µg di ogni campione su gel di agarosio al 2% per visualizzare la qualità dell'RNA (x µL di RNA + 1 µL di 30% Glicerolo e portare a volume di 6 µL con acqua).
 7. Fino a questo punto è stato estratto l'RNA totale. Per purificare l'RNA messaggero è stato usato l'ArrayGrade mRNA purification kit della SuperArray Bioscience Corporation che prevede l'uso di beads (micropalline) magnetiche coniugate con sequenze di oligo-dT che catturano solo gli mRNA, che possiedono una coda di poliA. Come riportato nel manuale del kit, partendo dall'RNA totale si cattura l'mRNA per mezzo delle beads, vengono fatti una serie di lavaggi, si fa l'eluizione dell'mRNA a 70°C e se ne misura la quantità e la purezza (il rapporto A260/A280 dovrebbe essere ≥ almeno a 1.7). L'mRNA purificato va mantenuto a -20°C fino al suo utilizzo.

5.2.6. RT-PCR (reverse transcriptase - PCR)

Per la produzione dei cDNA, si parte dall'RNA totale estratto in precedenza, si digerisce il DNA genomico con Dnasi I e si retrotrascrive il primo filamento del cDNA sia con primers oligo-dT che con random hexamers:

1. Digestione con DNasi I

Per ogni campione si faranno 4 ripetizioni dove 2 prevedono la presenza di oligo dT e di random hexamers rispettivamente senza però la successiva aggiunta di enzima RT superscript II e altri 2 prevedono sempre la presenza di oligo dT e di random hexamers rispettivamente però con la successiva aggiunta di enzima RT superscript II. Questo serve per avere la sicurezza al 100% che le successive PCR saranno ottenute da uno stampo di cDNA e non di DNA genomico non digerito completamente:

- 1 µg di RNA dove si aggiungeranno oligo dT e enzima RT superscript II;
- 1 µg di RNA dove si aggiungeranno oligo dT senza enzima RT superscript II;
- 1 µg di RNA dove si aggiungeranno random hexamers e enzima RT superscript II;
- 1 µg di RNA dove si aggiungeranno random hexamers senza enzima RT superscript II.

Nel nostro caso faremo solo 2 ripetizioni utilizzando esclusivamente gli oligo dT in modo da avere successivamente dei prodotti di PCR migliori e sicuramente specifici, cosa che non è sempre vera utilizzando i random hexamer e mescolando alla fine i cDNA ottenuti da oligo dT e quelli ottenuti da random hexamers. Le ripetizioni quindi saranno 2 e con doppia quantità di RNA per avere più cDNA per le PCR:

- 2 µg di RNA dove si aggiungeranno oligo dT e enzima RT superscript II;
- 2 µg di RNA dove si aggiungeranno oligo dT senza enzima RT superscript II;

Quindi si prendono 4 µg di RNA per ogni campione e si procede alla digestione del DNA con la DNasi I:

- x µL di RNA corrispondenti ai 4 µg sopra citati;
- 4 µL di 10X DNasi I reaction buffer;
- 4 µL di enzima DNasi I;
- x µL di acqua RNasi free per portare il volume a 40 µL.

Si mescola bene pipettando la soluzione e si lascia agire l'enzima per 15 min a RT. Si aggiungono 4 µL di 25 mM EDTA ad ogni reazione per bloccare l'azione dell'enzima e si mette a 65°C per 10 min → RNA pronto per la retrotrascrizione (abbiamo per ogni campione 44 µL di RNA senza DNA).

2. Sintesi del first strand cDNA

Questa procedura è studiata per convertire da 1 ng fino a 5 µg di RNA totale in un cDNA first strand: (Mescolare e spinnare tutti i componenti che verranno utilizzati)

1. Preparare in tubini da PCR la mix di RNA + dNTPs + oligo dT:

Per la reazione con RT superscript II

- 16 µL di RNA ottenuto nel passaggio con DNasi I
- 2 µL di 10 mM dNTPs mix
- 2 µL di 0.5 µg/µL Oligo (dT)12-18

Per la reazione senza RT superscript II

- 8 µL di RNA ottenuto nel passaggio con DNasi I
- 1 µL di 10 mM dNTPs mix
- 1 µL di 0.5 µg/µL Oligo (dT)12-18

Incubare a 65°C per 5 min e immediatamente mettere in ghiaccio per almeno 1 min.

2. Preparare la mix di reazione nell'ordine indicato di seguito (preparare mix per 3 reazioni):

Componente	Per ogni reazione	Per 3 reazioni
• 10X RT buffer	2 µL	6 µL
• 25 mM MgCl ₂	4 µL	12 µL
• 0.1 M DTT	2 µL	6 µL
• RNaseOUT Recombinant RNase Inibitor	1 µL	3 µL

Aggiungere 18 µL della mix di reazione ai 20 µL di RNA + dNTPs + Oligo dT che serviranno per la reazione con enzima RT superscript II e aggiungere 9 µL della mix di reazione ai 10 µL di RNA + dNTPs + Oligo dT che serviranno per la reazione senza enzima RT superscript II. Mescolare gentilmente e spinnare. Incubare a 42°C per 2 min.

3. Aggiungere 2 µL di enzima RT superscript II (100 unità in questo caso) nei tubini che prevedono l'aggiunta dell'enzima, mescolare e incubare a 42°C per 50 min.
4. Terminare la reazione mettendo a 70°C per 15 min per inattivare l'enzima. Mettere in ghiaccio immediatamente.
5. Spinnare i tubini e aggiungere 2 µL di RNasi H nei tubini che prevedevano l'aggiunta dell'enzima RT superscript II e 1 µL di RNasi H nei tubini che non prevedevano l'aggiunta dell'enzima. Incubare per 20 min a 37°C e conservare in aliquote a -20°C.

3. PCR:

A questo punto che i cDNA sono pronti, si può passare alla reazione di polimerizzazione a catena (PCR) per amplificare specifici frammenti dei geni che si vogliono studiare. Questo è possibile dopo aver disegnato dei primers specifici forward e reverse. In caso di amplificazioni aspecifiche si possono disegnare altri 2 primers internamente ai primi due forward e reverse per fare una “nested PCR”, che permette di riamplicare il prodotto di PCR della prima amplificazione per vedere se era specifico o meno. Le PCR sono state fatte con una Taq polimerasi della Eppendorf (Germania) chiamata Hot Master Taq, che possiede due caratteristiche molto utili:

- L'enzima è una proteina di fusione fra l'enzima stesso e una sequenza che lo inibisce, fino a quando una temperatura molto denaturante (95°C) non toglie l'inibizione e permette all'enzima di amplificare. Questa è una caratteristica basilare per evitare amplificazioni aspecifiche, che si possono avere addirittura durante la stessa preparazione della mix di reazione e anche se si lavora in ghiaccio. Con questa Taq si evitano tali prodotti aspecifici, perché inizia ad amplificare solo dopo il primo ciclo di denaturazione del termociclatore a gradiente della Eppendorf.
- Il buffer di reazione (la cui formula è ancora coperta da patente) contiene un agente chelante che rilascia il magnesio del quale ha bisogno quella particolare reazione di PCR. Quindi non serve studiare la concentrazione di Mg^{2+} da utilizzare ad ogni esperimento, perché tale buffer darà sempre la concentrazione corretta per il funzionamento ottimale della Taq.

La mix di reazione è così composta:

- | | |
|-------------------------------|--------------------------|
| • Buffer di reazione 10x | 2.5μL |
| • Miscela di dNTPs 2mM | 2.0μL |
| • Ogni primers 10μM | 1.0μL |
| • Hot Master Taq Eppendorf | 0.5U |
| • H ₂ O RNAsi free | portare a volume di 25μL |

Il programma impostato sul termociclatore varia a seconda dei fattori da considerare:

- La temperatura di denaturazione deve essere di almeno 95°C per la Hot Master Taq;
- La temperatura di annealing o appaiamento dei primers con il template varia a seconda della coppia di primers considerata. Viene calcolata con delle PCR a gradiente per ogni coppia di primers;
- Il tempo di estensione varia a seconda dell'enzima (Hot Master) e della lunghezza del frammento da amplificare (si danno 60 sec. circa ogni 1000 paia di basi).

Il programma tipo è:

1. Denaturazione a 95°C	5 min	} 30 cicli dal punto 2 al 4.
2. Denaturazione a 95°C	30 sec	
3. Anneling fra i 55 e i 65 °C	30 sec	
4. Estensione a 72°C	~60 sec/1Kb	
5. Estensione finale a 72°C	7 min	

Dopo la PCR, vengono caricati i campioni su un gel di agarosio 1-2%, si lascia correre l'elettroforesi per 15-20 min a 140V e si fotografa il gel al trans-illuminatore.

5.2.7. Elettroforesi su gel di agarosio

Il gel di Agarosio viene usato per separare elettroforeticamente frammenti di DNA, sia a scopo analitico che preparativo. L'elettroforesi viene effettuata in un tampone 1x TAE con concentrazioni di agarosio dipendenti dalla dimensione dei frammenti di DNA da separare (generalmente 1.0-2.0% agarosio). Le separazioni elettroforetiche sono state ottenute applicando un campo elettrico di 5 V/cm e con un voltaggio costante di 140V con amperaggio variabile per un tempo di corsa fra i 15 e i 20 minuti. La miscela di Agarosio e di 1x TAE viene fatta sciogliere in un forno a microonde mescolando accuratamente. Durante il raffreddamento della miscela, viene aggiunto l'Etidio Bromuro alla concentrazione finale di 0.8 µg/mL (1 µL di EtBr concentrato/50 mL della miscela) al fine di evidenziare il DNA dopo esposizione alla luce UV di un trans-illuminatore. Per effettuare l'incorporazione di Etidio Bromuro dopo la corsa elettroforetica, il gel viene immerso in tampone 1x TAE con EtBr alla concentrazione di 0.8 µg/mL.

Buffer TAE 10X (Tris-Acetato)

Tris-Acetato	24.2 % (w/v)
acido acetico glaciale	0.057 % (v/v)
EDTA 0.5 M, pH 8.0	0.05 M

I marcatori di peso molecolare che sono stati usati sono:

- Il pGEM DNA Marker della Promega, usato come marcatore di basso peso molecolare (da 2645bp a 126bp);
- 1 Kb Plus DNA Ladder della promega, usato come marcatore di basso/alto peso molecolare (da 12Kb a 100bp).

5.2.8. Estrazione del DNA plasmidico (con S.N.A.P. miniprep kit della Invitrogen)

Prima di partire:

- Risospendere l'RNase A in 200µL di Resuspension Buffer e aggiungere il tutto al rimanente Resuspension Buffer.
- Aggiungere 75 mL di 95% etanolo ai 25 mL di 4X Final Wash per ottenere 100 mL di 1X Final Wash.
- Vedere se il Lysis Buffer ha un precipitato bianco; se presente riscaldare in acqua a 37°C per 5 minuti fino a chiarificazione della soluzione.

Lisi e Precipitazione:

- Centrifugare 1-3 mL di coltura ON per pelletare le cellule.
- Risospendere in 150µL di Resuspension Buffer vortexando o pipettando gentilmente su e giù.
- Aggiungere 150µL di Lysis Buffer e mescolare gentilmente per inversione il tubo 5-6 volte. Incubare per 3 minuti a RT.
- Aggiungere 150µL di Precipitation Salt freddo di ghiaccio e invertire 5-6 volte per assicurare la mescolanza di tutti i componenti.
- Centrifugare a RT per 5 minuti a 12500 rpm.

Binding del Plasmide:

- Pipettare il surnatante in un tubo sterile e buttare il pellet gelatinoso.
- Aggiungere 600µL di Binding Buffer e mescolare per inversione 5-6 volte. Mettere tutta questa soluzione nelle colonne SNAP.
- Centrifugare i tubi SNAP a RT per 30 secondi a 500 rpm. Alternativamente lasciare uscire per gravità dopo 10-15 minuti.
- Buttare il liquido del tubo inferiore. Aggiungere 500µL di Wash Buffer.
- Centrifugare i tubi SNAP a RT per 10-30 secondi a 500 rpm. Alternativamente lasciare uscire per gravità dopo 7 minuti. Buttare il liquido del tubo inferiore.
- Aggiungere 900µL di 1X Final Wash e centrifugare come al punto precedente.
- Centrifugare i tubi SNAP a RT alla velocità massima per 1 minuto per asciugare la resina.

Eluizione del Plasmide:

- Trasferire i tubi SNAP in un tubo sterile e aggiungere 60µL di TE Buffer o di acqua sterile direttamente sulla resina. Incubare per 3 minuti a RT.
- Centrifugare i tubi SNAP a RT alla massima velocità per 30 secondi. Buttare il tubo SNAP.
- Conservare il DNA plasmidico eluito a -20°C.

5.2.9. Purificazione del DNA plasmidico da gel d'agarosio (con S.N.A.P. miniprep kit della Invitrogen)

Preparare una soluzione di melting costituita da un 6M di NaI e un 10mM NaSO₃ in acqua RNAsi free autoclavata. Il solfito di sodio previene l'ossidazione del ioduro di sodio.

- Dopo elettroforesi dei campioni di plasmide su un gel d'agarosio regolare fra l'1 e il 5 %, si taglia la banda di interesse e si mette a 65°C in 2 volumi di soluzione di melting. Il gel deve essere fatto con buffer TAE, perché l'acido borico contenuto nel buffer TBE interferisce con l'NaI.
- Aggiungere 1.5 volumi di binding buffer.
- Caricare la soluzione (non più di 1mL per volta) nella colonnina SNAP, centrifugare 1 min alla massima velocità in una microcentrifuga e buttare il supernatante.
- Ripetere i due passaggi precedenti se la soluzione era più di 1mL.
- Aggiungere 900µL di final wash buffer, centrifugare 1 min alla max velocità, buttare il supernatante e ripetere la centrifugata.
- Eluire il plasmide purificato in 40µL di TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) o acqua sterile. Conservare a -20°C.

5.2.10. Clonaggio con vettori plasmidici di espressione in *E. coli* chimicamente competenti (Kit TOPO TA CLONING della Invitrogen)

1. Produzione dei prodotti di PCR

Dopo l'ultimo ciclo aggiungere da 7 a 30 min di estensione a 72 °C

- | | | |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| • DNA stampo (cDNA) | 10-100 ng | 2.0 µL |
| • 10X PCR buffer | 5.0 µL | 5.0 µL |
| • MgCl ₂ (50 mM) | 2.0 µL | 2.0 µL |
| • 5 mM dNTPs | 5.0 µL | 5.0 µL |
| • Primers 1 (10 pmoli/µL; 10 µM) | 1 µM (se prendo 5 µL) | 2.5 µL (solo 0.5 µM) |
| • Primers 2 (10 pmoli/µL; 10 µM) | 1 µM (se prendo 5 µL) | 2.5 µL (solo 0.5 µM) |
| • Acqua sterile | portare a volume di 49.8 µL | 30.8 µL |
| • Taq polymerase (5U/µL) | 0.2 µL | 0.2 µL |

Gel di agarosio per vedere la qualità dei prodotti di PCR: si deve ottenere una singola banda. In caso contrario si procede alla purificazione con colonnine a scambio ionico direttamente da gel.

2. Clonaggio del prodotto di PCR nel vettore pCRII-TOPO

Preparare tutte le soluzioni e materiali di cui si ha bisogno prima di iniziare il clonaggio.

L'inclusione di una soluzione salina aumenta di 2-3 volte il numero di trasformanti (NaCl 200 mM e MgCl₂ 10 mM); questo perché per lunghi tempi di incubazione l'aggiunta di sali previene che la topoisomerasi I si rileghi al DNA appena legato e lo tagli facendolo staccare di nuovo.

- Prodotto di PCR 0.5-4.0 μ L
- Soluzione di Sali 1 μ L
- Acqua sterile portare a volume di 5 μ L
- Vettore pCRII-TOPO 1 μ L

Conservare tutti i reagenti a -20°C dopo aver finito di utilizzarli; acqua sterile e soluzione di Sali si possono conservare a 4°C.

- Mescolare gentilmente la miscela di reazione e incubare per 5 min a RT (22-23°C)(per una maggiore efficienza di clonaggio incubare per soli 30-40 sec: si ottiene < numero di colonie ma > probabilità che l'inserito sia dentro il plasmide)(se il prodotto di PCR è molto diluito si può aumentare il tempo di clonaggio a 20-30 min).
- Mettere la reazione in ghiaccio se si procede con la trasformazione delle cellule competenti o conservare ON a -20°C.

3. Trasformazione delle cellule chimicamente competenti one shot Mach1-T1

Il ceppo Mach1-T1 permette di visualizzare colonie 8 ore dopo aver piastrato su piastre selettive per l'Ampicillina e dopo incubazione ON nel caso si usino piastre selettive per la Kanamicina.

Con questo ceppo è possibile preparare del DNA plasmidico già 4 ore dopo aver inoculato una singola colonia cresciuta ON sia su terreno selettivo per Ampicillina che per Kanamicina.

Preparare:

- piastre contenenti 50 μ g/mL (mg/L) di Ampicillina o 50 μ g/mL di Kanamicina.
- 40 mg/mL di X-gal in dimetilformamide (DMF) (Conservare a -20°C).
- bagnetto termostato a 42°C

Per ogni trasformazione c'è bisogno di 1 boccetta di cellule competenti e di 2 piastre selettive.

Portare a RT una boccettina del mezzo SOC dal box 2.

Scaldare a 37°C per 30 min le piastre selettive.

Spargere 40 μ L della soluzione di X-gal in ogni piastra e incubare a 37°C fino al loro utilizzo.

Scongelare in ghiaccio 1 boccettina di cellule competenti per ogni trasformazione.

- Aggiungere 2 μ L della reazione di clonaggio in 1 boccettina con cellule competenti di E. coli e mescolare gentilmente. Non usare la pipetta.
- Incubare in ghiaccio da 5 a 30 min (maggiore efficienza di trasformazione con soli 5 min).

- Fare lo shock termico delle cellule per 30 secondi a 42°C senza agitazione.
- Trasferire immediatamente il tubo in ghiaccio.
- Aggiungere 250 µL di mezzo SOC portato a RT.
- Tappare saldamente la boccettina e mescolarla orizzontalmente (200 rpm) a 37°C per 1 ora.
- Spargere 10-50 µL di ogni trasformazione su piastre selettive preriscaldate. Si raccomanda di piastrare 2 differenti volumi per assicurare che almeno una piastra avrà colonie ben spaziate.
- Incubare le piastre a 37°C. Se si sta usando la selezione con ampicillina appariranno colonie visibili dopo 8 ore e lo screening blu/bianche potrà essere fatto dopo 12 ore. Per la selezione con kanamicina incubare le piastre ON.
- Una reazione di trasformazione efficiente dovrebbe produrre varie centinaia di colonie. Pizzicare per successive analisi solo le colonie bianche o leggermente blu, ma non le blu scuro. Conservare le piastre capovolte e chiuse con parafilm a 4°C (fino ad 1 mese, oltre si produrrebbero delle muffe).

4. Analisi dei trasformanti

Analisi delle colonie positive:

- Prendere 10 colonie bianche o leggermente blu e farne una coltura ON a 37°C in terreno LB contenente 50 µg/mL di Ampicillina o 50 µg/mL di Kanamicina. Nel caso di questo ceppo Mach1-T1 si può inoculare delle colonie cresciute ON in terreno LB preriscaldato (contenente le succitate quantità di antibiotico) lasciandole a 37°C per 4 ore prima di isolare il plasmide. Inoculare più di una colonia per essere sicuri di avere un ottimo risultato.
- Isolare il DNA plasmidico usando lo SNAP MiniPrep Kit.
- Analizzare il plasmide attraverso analisi con enzimi di restrizione per confermare la presenza e la corretta orientazione dell'inserto. Usare un enzima che tagli una volta nell'inserto e una nel plasmide (al limite usare 2 enzimi diversi).
- Si possono usare i primers M13 fwd e M13 rev per sequenziare l'inserto.

Alternativamente si può usare un'analisi diretta dei trasformanti positivi tramite PCR:

Come primers utilizzare o l'M13 rev o l'M13 fwd insieme ad uno dei primer che ibridizzano con l'inserto. Artefatti possono essere ottenuti a causa di mancanza di appaiamento o per un template contaminato (come riprova usare in parallelo una digestione con enzimi di restrizione).

- Preparare una mix senza il DNA per PCR da 50 µL (1 µL di ogni primers).

- In ogni tubino mettere 50 μ L di mix e risospenderli individualmente 10 colonie bianche o leggermente azzurre (prepararsi già dei tubini con dentro tips sporchi della colonia prescelta). Conservare la piastra e segnare quali colonie sono state prelevate.
- Incubare le reazioni per 10 min a 94°C per lisare le cellule e inattivare le nucleasi.
- Amplificare per 20-30 cicli.
- Per l'estensione finale incubare a 72°C per 10 min. Conservare a 4°C.
- Visualizzare le bande su gel.

Una volta identificati i cloni corretti si provvederà a preparare uno stock di glicerolo per la conservazione a lungo termine (si raccomanda di conservare a -20°C uno stock di DNA plasmidico).

- Strisciare la colonia originaria su una piastra contenente 50 μ g/mL di Ampicillina o 50 μ g/mL di Kanamicina.
- Isolare una singola colonia e inocularla in 1-2 mL di terreno LB contenente 50 μ g/mL di Ampicillina o 50 μ g/mL di Kanamicina.
- Crescere la colonia fino alla fase stazionaria.
- Mescolare 0.85 mL di coltura con 0.15 mL di glicerolo sterile o 0.70 mL di coltura con 0.30 mL di glicerolo 50% sterile in boccette per la crioconservazione. Conservare a -80°C.

5. *Per fare la maxyprep:*

mettere in ghiaccio le cellule crioconservate fino a che non si scioglie un pò il liquido in superficie, prelevare con un puntale un pò di cellule per strisciare una piastra, isolare una singola colonia e crescere ON in 100 mL di LB liquido con antibiotico. Successivamente utilizzare il kit della Qiagen per isolare il plasmide e per sottoporlo alla produzione della sonda.

6. *Purificazione dei prodotti di PCR e clonaggio diretto di cellule chimicamente competenti*

Metodo del Low-Melt Agarose:

1. Caricare su gel di agarosio low-melt TAE (0.8-1.2%) tutta la reazione di PCR.
2. Visualizzare la banda di interesse e tagliarla dal gel.
3. Mettere il gel in un tubo da microcentrifuga e incubare a 65°C fino allo scioglimento del pezzettino di gel.
4. Mantenere a 37°C il tubo perché il gel resti disciolto.
5. Usare 4 μ L di questo gel contenente i prodotti di PCR nella reazione di clonaggio con la topoisomerasi.

6. Incubare la reazione di clonaggio a 37°C per 5-10 min. Questo per mantenere il gel disciolto.

7. Trasformare direttamente le cellule competenti con 2-4 µL della reazione di clonaggio.

Notare che l'efficienza di clonaggio diminuisce con la purificazione dei prodotti di PCR.

7. Preparazione del terreno LB

- Dissolvere 20 g di LB in polvere in 950 mL di acqua deionizzata.
- Aggiustare il pH della soluzione a 7.0 con NaOH e portare a volume di 1 L (di solito non serve pHare).
- Autoclavare con ciclo liquido per 20 min a 15 psi. Lasciare raffreddare la soluzione fino ai 55°C e aggiungere l'antibiotico.
- Conservare a RT o a 4°C.

8. Preparazione delle piastre

- Dissolvere 35 g di LB/Agar in polvere in 950 mL di acqua deionizzata.
- Aggiustare il pH della soluzione a 7.0 con NaOH e portare a volume di 1L (di solito non serve pHare).
- Autoclavare con ciclo liquido per 20 min a 15psi. Lasciare raffreddare la soluzione fino ai 55°C, aggiungere l'antibiotico e versare la soluzione in piastre da 10 cm fino ad un terzo della sua altezza.
- Lasciare indurire col coperchio aperto a metà, poi invertire le piastre e conservare a 4°C al buio.

5.2.11. Taglio del DNA plasmidico con enzimi di restrizione

È stata seguita la metodologia riportata da Sambrook et al., nel Molecular cloning, Vol. 1, pp. 5.31-5.32, 1989. Le digestioni enzimatiche sul DNA plasmidico vengono effettuate mescolando:

DNA plasmidico	10 µg
Enzima di restrizione	1U
Tampone 10X specifico per l'enzima	5 µL
Acqua MilliQ autoclavata	Fino al volume finale di 50 µL

La miscela, ben mescolata, viene messa ad incubare alla temperatura ottimale per l'attività enzimatica (normalmente 37 °C) in bagnetto termostato per 2-16 ore.

L'esito della digestione sarà evidenziato caricando i prodotti della reazione su un gel di agarosio.

5.2.12. Sequenziamento dei prodotti di PCR e dei plasmidi

Il sequenziamento dei prodotti di PCR e del DNA plasmidico, estratti e purificati da gel d'agarosio, è stato affidato ad una ditta esterna: il CRIBI presso l'Università di Padova. Le sequenze pervenute dopo sequenziamento, sono state analizzate con programmi forniti nel sito internet del CRIBI stesso e/o tramite ricerca nella banca genomica di ratto e topo con un "Blast nucleotide search". Inoltre, viene studiata l'orientazione degli inserti contenuti nei plasmidi per capire quale enzima RNA polimerasi (T7 o SP6) sia necessario per produrre la sonda antisenso, da usare nell'ISH, del frammento di gene contenuto nel plasmide.

5.2.13. Produzione di sonde antisenso marcate con digossigenina per esperimenti di ISH.

Dopo aver analizzato l'orientamento dell'inserto nel plasmide e deciso quale RNA polimerasi si necessita per l'ottenimento della sonda antisenso, si procede con la produzione della sonda.

1. Primo giorno:

Digerisco 2 ore o ON con l'enzima di restrizione più adatto a valle dell'inserto, 10 µg di plasmide della maxiprep preparata in precedenza e conservata a -20°C. Faccio correre su un gel d'agarosio i plasmidi digeriti per controllare la riuscita o meno del taglio enzimatico di restrizione.

Successivamente recupero da gel con le colonnine SNAP della Invitrogen il plasmide linearizzato, che verrà utilizzato per la reazione di RNA polimerasi. Vengono fatti correre su un gel d'agarosio i plasmidi linearizzati per la quantifica dopo il recupero: ottengo ~3 µg di plasmide lineare (conservo a -20°C).

2. Secondo giorno:

Reazione della RNA polimerasi T7 o SP6:

Plasmide lineare	0.5-1 µg (fino a 12.5 µL)	
Buffer 10 X	2 µL	
ATP 10 mM	1 µL	} 2µL di DIG-dNTPs Mix
CTP 10 mM	1 µL	
GTP 10 mM	1 µL	
UTP 6.5 mM	1 µL	
UTP-DIG 3.5 mM	1 µL	
Enzima T7 o SP6 RNA Polimerasi	2 µL	
RNase inhibitor	1.5 µL	
Acqua autoclavata RNAsi free	portare il volume finale a 20 µL	

Se ho già la mix dei dNTPs marcati con digossigenina (DIG) metto 2 µL in totale.

Metto a 37 gradi centigradi per 2 ore nella macchina da PCR (tenerla in carta di alluminio perché la DIG si degrada). Aggiungendo, dopo le 2 ore, un altro μL di enzima RNA polimerasi si può ottenere, dopo un'ulteriore ora di incubazione, un incremento sostanziale della sonda prodotta.

Carico 2 μL su gel d'agarosio per vedere la banda dell'RNA antisenso prodotto. Se è di buona qualità, procedo con il passaggio successivo, che prevede la digestione con DNAsi degli altri 18 μL rimasti dopo la corsa su gel (2 μL di DNAsi per 20 min a 37°C). Come precedentemente fatto, carico 2 μL su gel per vedere se il DNA plasmidico viene digerito effettivamente. La banda della sonda di RNA anti senso (RNAas) deve essere netta durante la migrazione su gel d'agarosio e della lunghezza molecolare attesa.

Porto il volume, ottenuto dopo la digestione, a 50 μL e purifico la sonda con la colonnina ProbeQuant G-50 della Amersham Biosciences per rimuovere tutti i dNTPs non incorporati, i sali e gli enzimi usati nei passaggi precedenti. Ne carico 5 μL su gel d'agarosio per quantificare la sonda ottenuta visivamente (cosa possibile solo dopo aver acquisito molta esperienza).

Per confermare, prelevo una piccola aliquota di sonda purificata e ne misuro la concentrazione analiticamente: si fanno diluizioni seriali della sonda marcata con digossigenina e si misurano con lo spettrofotometro oppure si spottano su membrana di nylon (hybond-N+), si fanno reagire con 1:5000 dell'anticorpo antiDIG-AP e si visualizzano aggiungendo il substrato della fosfatasi alcalina, la soluzione NBT/BCIP. La concentrazione viene fornita rispetto ad uno standard di RNA-DIG, del quale si conosce la concentrazione.

Successivamente, le sonde-DIG vengono aliquotate, diluendole a 5ng/ μL con acqua RNAsi free e conservate a -80°C.

5.2.14. Immunoistochimica (IHC)

i. Immunoperoxidase con ABC e substrato diamminobenzidina (DAB)

Le sezioni su vetrino carico positivamente vengono immerse, dopo acclimatamento (erano a -20°C), in 0.1M PB per 1 minuto. I vetrini vengono poi fatti asciugare quasi completamente a 40°C su piastra calda. Vengono fatti 3 lavaggi di 10 min in 1X PBS, inattivate le perossidasi endogene con 0.5% di H₂O₂ in metanolo o 1X PBS per 15-20 min, rifatti 3 lavaggi di 10 min in 1X PBS e fatto il bloccaggio dei siti aspecifici con soluzione di bloccaggio (BBuffer), contenente il siero normale adeguato all'anticorpo secondario, per 1 ora a RT. Vengono fatte reagire le sezioni ON o più a lungo a 4°C con l'anticorpo primario in BBuffer. Si effettuano 3 lavaggi di 10 min in 1X PBS e vengono fatte reagire le sezioni 1 ora a RT con l'anticorpo secondario biotinilato in BBuffer. Rifatti 3 lavaggi di 10 min in 1X PBS, si fanno reagire le sezioni con l'ABC-perossidasi (Vector Elite Kit) per 1 ora a RT, seguendo il relativo protocollo. Lavare 3 volte per 10 min in Tris Buffer pH7.6. Far

reagire al buio le sezioni con substrato diaminobenzidina (DAB) diluito in Tris Buffer pH7.6 per un tempo variabile dei 5 ai 20 min (osservare al microscopio gli sviluppi della reazione dopo 5 min per decidere quando fermare la reazione). Lavare 2 volte per 10 min in 1X PBS e 1 volta per 10 min in 0.1M PB, disidratare le sezioni e montare con mounting medium il coprivetrino.

ii. Immunofluorescente (con dyes della Molecular Probe)

Le sezioni su vetrino carico positivamente vengono immerse, dopo acclimatamento (erano a -20°C), in 0.1M PB per 1 minuto. I vetrini vengono poi fatti asciugare quasi completamente a 40°C su piastra calda. Vengono fatti 3 lavaggi di 10 min in 1X PBS e il bloccaggio dei siti aspecifici con soluzione di bloccaggio (BBuffer), contenente il siero normale adeguato all'anticorpo secondario, per 1 ora a RT. Vengono fatte reagire le sezioni ON o più a lungo a 4°C con l'anticorpo primario in BBuffer. Si effettuano 3 lavaggi di 10 min in 1X PBS e vengono fatte reagire le sezioni 1 ora a RT con l'anticorpo secondario coniugato con il dye fluorescente (Molecular Probe) in BBuffer. Lavare 2 volte per 10 min in 1X PBS e 1 volta per 10 min in 0.1M PB, montare con Fluoromount-G il coprivetrino e conservare i vetrini a 4°C.

iii. Soluzioni per IHC

• PBS:

Preparare un buffer fosfato (PB) 0.5M pH 7.2-7.4 (106.5g di fosfato di sodio dibasico anidro + 34.5g di fosfato di sodio monobasico monoidrato, in 2L d'H₂O distillata; a pH con NaOH) e una soluzione di NaCl 5M (292.2g di NaCl in 1L d'H₂O distillata). Il PBS per i lavaggi dell'IHC, ha una concentrazione 0.1M (chiamata 1X) che si ottiene mescolando 200mL di 0.5M PB e 30mL di 5M NaCl, portando il volume a 1L con H₂O distillata.

• Soluzione di bloccaggio (BBuffer):

0.2M PB	50mL
5M NaCl	3mL
10% TritonX	3mL
BSA	100mg
H ₂ O distillata	fino a 100mL

Aliquotare in tubi da 15 mL e conservare a -20°C. Una volta aperta, l'aliquota va conservata a 4°C.

L'adeguato siero normale va aggiunto solo al momento dell'esperimento.

iv. Lista degli anticorpi primari, secondari e dei sieri normali utilizzati negli esperimenti di immunohistochimica

Anticorpi primari:

- α -gustducin 1:500 – 1:1000
- Plc β 2 1:500 – 1:1000
- PGP-9.5 1:500
- CGRP 1:1000

Anticorpi secondari:

- HRP - Swine anti rabbit 1:2000 – 1:5000
- Alexa568 - goat anti rabbit 1:400

Sieri normali:

- Swine normal serum 2%
- Goat normal serum 3%

5.2.15. ISH non radioattiva con substrato NBT/BCIP

Nel metodo da me messo a punto, partendo da protocolli disponibili online in internet, non vengono usati lavaggi con TritonX, si permeabilizza la membrana cellulare con proteinasi K, si usa una sonda molto diluita, non si digerisce con RNasi dopo ibridizzazione e viene usata una sonda lunga il più possibile (>1Kb). Il protocollo prevede che la durata dell'esperimento sia di tre giorni:

1. Primo giorno: (tutti i trattamenti e lavaggi in jar di vetro con soluzioni RNase free e al buio)
 - Fissare subito le criosezioni dal -80°C mettendole a 4°C per 20 min in 4% PFA e PBS 1X.
 - Lavare in 1X PBS 2 volte per 5 min a RT.
 - Permeabilizzare con 10 μ g/mL di proteinasi K in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 min a RT.
 - Lavare in 1X PBS una volta per 5 min a RT.
 - Lavare in 0.1M TEA per 2 min a RT.
 - Acetilare in 0.25% di anidride acetica in TEA per 10 min a RT.
 - Lavare in 2X SSC per 10 min a RT.
 - Seccare all'aria i vetrini a 60°C per 5-10 min mentre ci si prepara per lo step successivo.
 - Mescolare il buffer di ibridazione con la sonda (conc. Finale di 5-30 ng/mL)
 - Denaturare a 80°C per 5-10 min.

- Circondare le sezioni con rubber cement per non far uscire la mix di ibridizzazione che aggiungeremo.
- Mettere i vetrini dentro ad un box umido e pipettare 50 μ L di mix di ibridizzazione sopra ogni sezione.
- Ibridizzare nell'incubatore (16-20 ore) a 40-65°C in base al contenuto in G-C della sonda.

2. Secondo giorno: (tutti i trattamenti e lavaggi in box piani con agitazione lieve e al buio)

- Lavare in 2X SSC per 10 min a 45°C.
- Lavare di stringenza 2 volte per 15 min in 50% formamide e 1X SSC alla temperatura di ibridazione.
- Lavare in soluzione di lavaggio per 1 min a RT.
- Bloccare in soluzione di bloccaggio 1 per 60 min a 37°C.
- Incubare in anti-DIG-AP (diluito 1:750 in soluzione di bloccaggio 1) per 90 min a RT.
- Lavare in soluzione di lavaggio tre volte per 5 min a RT.
- Lavare in soluzione di detection per 10 min a RT.
- Incubare al buio in soluzione di substrato in camera umida dalle 4 alle 48 ore a RT o a 4°C.

3. Terzo giorno:

- Fermare la reazione di colorazione con un lavaggio di TE.
- Risciacquare in acqua poi montare in GelMount.
- Conservare i vetrini a 4°C.

Soluzioni utilizzate:

- PBS: 145 mM NaCl
1.4 mM KH₂PO₄
8 mM Na₂HPO₄
pH 7.4
- 20X SSC: 3M NaCl
300mM sodium citrate
pH 7.0 con acido citrico
- 50X Denhardt's: 1% BSA
1% Polyvinylpyrrolidone
1% Ficoll

- Hybridization buffer: 50% formamide
2X SSC
1X Denhardt's
10% dextran sul fate
0.5 mg/mL yeast tRNA
0.5 mg/mL salmon sperm DNA idrolizzato
Aliquote di 1 mL messe a -20°C.
- Wash buffer: 100 mM maleic acid
150 mM NaCl
0.3% Tween-20
pH 7.5
- Blocking buffer 1: 1% blocking reagent (Roche) in wash buffer
- Blocking buffer 2: 0.5% blocking reagent (PerkinElmer)
150 mM NaCl
100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- Detection buffer: 100 mM NaCl
100 mM Tris-HCl (pH 9.5)
50 mM MgCl₂
- Substrate solution: 337 µg/mL NBT
175 µg/mL BCIP
5 mM levamisole
in detection buffer
- TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
1 mM EDTA

5.2.16. Estrazione delle proteine, elettroforesi degli estratti proteici su gel di acrilammide e Western immunoblotting

I tessuti utilizzati per gli esperimenti di Western immunoblotting sono stati omogenizzati in RIPA buffer contenente gli inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF). Dopo centrifugazione, il supernatante è stato passato ripetutamente attraverso un ago di 22 gauge per frammentare il DNA. Le proteine sono poi state quantificate mediante metodo di Lowry. Uguali quantità di proteine (10µg) da ciascun lisato sono state separate con SDS-PAGE e trasferite elettroforeticamente in un supporto di nitrocellulosa. Per l'immunoblotting dell' α -gustducin l'esperimento è stato così impostato:

- Gel AA/bisAA al 10% (peso molecolare dell' α -gustducin è 40-42KDa)
- Corsa elettroforetica: 2 ore a 80/120V
- Blotting: 75 min a 300mA
- Bbuffer: 3% BSA in 0.1% Tween20 TBS (tris buffered saline)
- Anticorpo I° rabbit anti rat α -gustducin 1:2000
- Anticorpo II° anti rabbit coniugato HRP 1:5000

5.2.17. Microarray su estratti di mRNA

L'mRNA purificato dall'RNA totale estratto da tessuti trattati e di controllo viene utilizzato come stampo per generare una libreria di cDNA. Viene successivamente retroscritto, con il kit TrueLabeling-AMP 2.0 della SuperArray il cRNA marcato con dUTP-biotina (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Dopo purificazione col SuperArray ArrayGrade cRNA Cleanup kit, il dUDP-biotin-cRNA dei tessuti di ratto viene ibridizzato, seguendo il protocollo Oligo GEMArray Assay, su dei microarrays ad oligonucleotidi specifici per i geni correlati a pathways di vario tipo. Il pattern di ibridizzazione viene rilevato tramite streptavidin-HRP conjugated reagent in blocking buffer (0.5% blocking reagent)(PerkinElmer, Boston, MA, USA) usando l'ECL Detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) su film fotografico per raggi X. I dati dei microarrays vengono analizzati usando il programma GEMArray Expression Analysis Suite della SuperArray. I valori quantitativi di espressione genica vengono corretti rispetto al background, normalizzati rispetto ai valori dei geni di controllo positivo inclusi nei microarrays e riportati come rapporto ai valori medi dei geni normalizzati. Geni con valori <0.1 vengono considerati come non espressi, con valori ≥ 0.10 ma ≤ 0.20 come moderatamente espressi e con valori ≥ 0.20 come espressi. Solo le differenze di espressione di 2.5 volte o maggiori tra i geni espressi da tessuti trattati e di controllo sotto analisi erano considerate significative.

5.2.18. Lista dei primers utilizzati negli esperimenti di RT-PCR

Gene	Nome Primer	Sequenza del Primer	Tan °C	Prodotto di PCR
α-Gustducin (Gnat3)	G25F	CTGCTCTGACGATCTATCTC	61	1443 bp
	G1468R	GGTCACTTACAGCTCACTTC		
Tas2R10 (rT2R4)	T2R4F2	CAGGATGCTTACTTACCTCG	58	472 bp
	T2R4R2	CTTCAAGGAGGCTTGCTTCA		
Tas2R105 (rT2R9)	T2R9F2	GCCAAGAACAAGAAGCTCTC	61	710 bp
	T2R9R2	GGATAGACGGATGCAGTTGT		
Tas2R13 (rT2R8)	T2R8F1	TAGTCACTTCAGCCTCTGGT	59	605 bp
	T2R8R2M	GTATCCAACGAGAAGTCTGC		
Tas2R134 (rT2R34)	T2R134F1	CGGTAAGAGTGGAGTCAGTC	62	945 bp
	T2R134R1	CGCCTCTTGTCTTGTGATCT		
Tas2R14 (rT2R2)	T2R2F1	CATGGACTGGCTCAAGAGGA	62	855 bp
	T2R2R1	CTAAGACAAGGCAGCACAGA		
Tas2R34 (rT2R16)	T2R16F	GCTTGGCCATCACTAGATTC	59	629 bp
	T2R16R	GGCTCTCAGATTCTTCCTCA		
Tas2R41 (rT2R12)	T2R12F1	GGCTTCATTGTGCTGATGCT	60	809 bp
	T2R12R1	GTGCCTCGGAAGTTGAGATT		
Tas2R5 (rT2R5)	T2R5F2	TCATTCTCACTGGCTTGGCA	54	701 bp
	T2R5R1	TAGGATAAGTGAGTGGCAGC		
Tas2R7 (rT2R7)	T2R7F2M	TCGGAGCTGTGACCAATGGA	57	666 bp
	T2R7R1	AGAGTAAGAGGAAGGAGACC		
Tas2R1 (rT2R1)	RR1F	GATCTGCTTCATTTTGCCTG	55,5	544 bp
	T2R1R3	AGCATTGCACTGATGTCAGC		
PKD2L1	Fw2L1	ACACAGCCGAGAACAGAGAG	62	980 bp
	Rw1L1	CCATCAGTCGGTTCCTTCC		
PKD2L2	Fw2L2	CATGACCTGCATTACCGAAG	68	498 bp
	Rw1L2	GAGCCGAGTGCCTCCATTCT		
Tas1R1 (rT1R1)	T1R1F1	CGGTTCACTGTTGAGGAGAT	60	618 bp
	T1R1R1	CCTGAAGAACAACCTCTAGCCA		
Tas1R2 (rT1R2)	T1R2F2	CAGTTCTGCATAACCTCACG	57	716 bp
	T1R2R2	CTTGTAGGACCACATGGAAC		
Tas1R3 (rT1R3)	T1R3F2	ATGTGCTACGCCAAGTGAAC	58	855 bp
	T1R3R2	AGGTGAAGTCATCTGGATGC		
LRRP Ba1-65 rat (P5CDh-T1R2)	Ba1-F1	CTGCAGTGATTGATGCCAAG	57,1	1044 bp
	Ba1-R2	GGGCCAATGACAGCCACCAC		
	Ba1-F2V	ATCCTCTACGGCTGTCACTT	55	420 bp (nested)
	Ba1-R1	ATGGCCTGCATGAGGTCCTA		
Dominio AIDh4A1 rat (P5CDh)	Ba1-F5 rat	GAGCCCATCTTAGCGTTTACT	58,2	1184 bp (Ba1-651) 1071 bp (P5CDh)
	Ba1-R5	ACTGCAGAGAAGAAGGTCCC		
	Ba1-F4	GTCGCCAAGTTCTGTTATGC	60,7	744 bp (Ba1-651)(nested) 630 bp (P5CDh)(nested)
	Ba1-R4	CTGGGCCACCTGCTTCCACA		
Dominio AIDh4A1 umano (P5CDh)	Ba1-F5 umano	GACGTGCAGTACCAAGTGTC	60	787 bp (Ba1-651) 672 bp (P5CDh)
	Ba1-R4	CTGGGCCACCTGCTTCCACA		
GADPH	GADF	ACTGGCGTCTTACCACCAT	60	273 bp
	GADR	ATCCACAGTCTTCTGGGTGG		

6. Risultati e Discussione

Il sistema chemosensoriale diffuso descritto negli apparati respiratorio e digestivo di roditore è composto di cellule recettoriali secondarie, le SCCs, che ricordano le cellule dei calici gustativi, però non sono organizzate in organi finiti (179, 180). Le SCCs sono presenti anche nei pesci; in mammifero presentano le tipiche molecole del pathway chemorecettoriale dei calici gustativi: α -gustducin, PLC β 2, IP3R3, e altre (105-107, 118, 136, 153-155, 160, 161). Purtroppo mancano molti dati sulle SCCs e il DCS e ulteriori studi servirebbero a chiarire il loro ruolo e se sono o meno cellule recettoriali. Nel mio dottorato ho cercato di approfondire la conoscenza sulle SCCs e altri argomenti correlati alla chemocezione. Fra i più importanti, scoprire: se altri mammiferi presentino SCCs con caratteristiche simili alle cellule solitarie dei roditori; quali sono le proteine recettoriali (recettori del dolce, dell'umami, dell'amaro, dell'acido, del salato o di altro tipo?) e le altre molecole coinvolte nel pathway chemorecettoriale presenti nelle SCCs; se molecole tipicamente presenti in cellule chemorecettoriali siano presenti, anche parzialmente, in altri organi che non sono comunemente considerati di sensing, e se abbiano un ruolo in qualche patologia; infine, se gli AHLs sono coinvolti solo nel quorum sensing batterico o anche nella comunicazione intraspecifica.

6.1. SCCs e DCS nelle vie aeree di *Bos taurus*

L'apparato respiratorio dei mammiferi di piccola taglia, come i roditori, è considerevolmente diverso da quelli di uomo o di mammiferi di taglia grande, soprattutto per la scarsità nelle vie aeree dei roditori di cellule mucose (la maggior parte sono sierose). Essendo disponibili, quindi, solo dati ottenuti da roditori, ho pensato di investigare la presenza di un DCS e SCCs in bovino (*Bos taurus*), nel quale la citologia delle vie aeree risulta essere simile a quella umana. La mia attenzione si è focalizzata sulla rivelazione nelle vie aeree di alcune delle molecole coinvolte nella cascata di trasduzione dei segnali gustativi, quali l' α -gustducin e il PLC β 2. Il mio tentativo è stato quello di estendere la conoscenza della chemorecezione nelle vie aeree e comparare l'organizzazione del DCS in mammiferi di grossa taglia con quella precedentemente osservata nei roditori.

Nell'immunoperoxidasi per l' α -gustducin (Fig. 1.1) su tessuti di bovino, sono state trovate immunoreattive a questo anticorpo nella lingua le cellule dei calici gustativi di papilla circumvallata (Fig. 1.1.a-c) e papilla fungiforme (Fig. 1.1.d-f). Numerosi calici gustativi positivi all' α -gustducin erano visibili nell'epitelio aritenoidale (Fig. 1.1.g-i). Nella trachea (Fig. 1.1.l-n) e bronchi (Fig. 1.1.o-q) di bovino, cellule solitarie (SCCs) immunoreattive all' α -gustducin venivano frequentemente trovate a tutti i livelli. Nella trachea, queste cellule si presentavano come elementi bipolari di forma allungata con processi apicali che raggiungono la superficie libera delle vie

respiratorie. Nei bronchi, vengono ritrovati inoltre elementi a forma di fiasca, che non posseggono un processo basale.

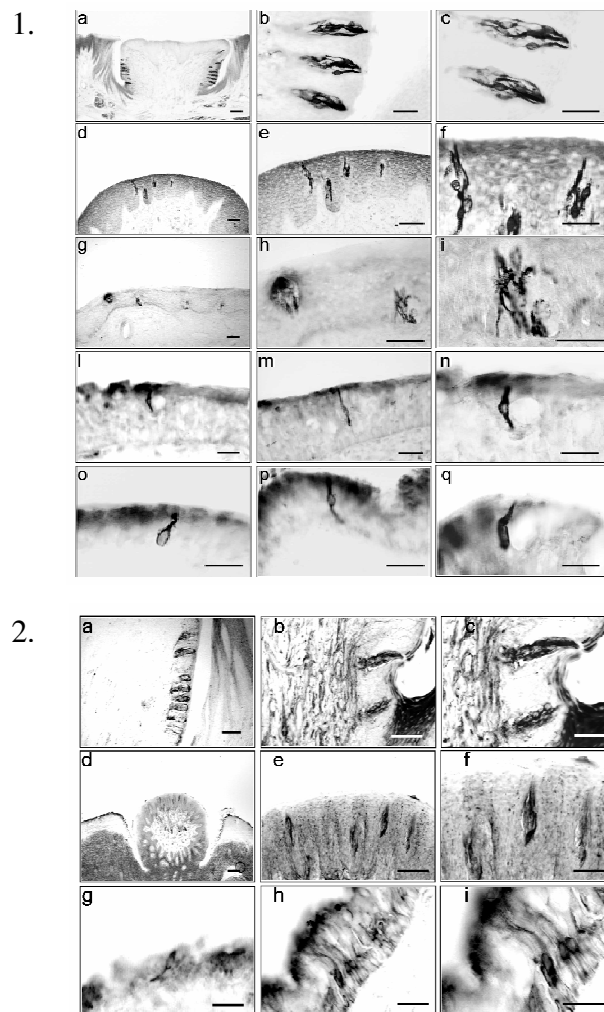


Fig.1. Calici gustativi e “SCCs” immunoreattivi all’ α -gustducin (1.) o al PLC β 2 (2.) osservati nelle papille circumvallata (1. e 2.a-c) e fungiforme (1. e 2.d-f) e negli epiteli di laringe (1.g-i), trachea (1.l-n e 2.g) e bronchi (1.o-q e 2.h,i), rispettivamente.

Per quanto riguarda l’immunocitochimica per il PLC β 2 (Fig.1.2), il pattern di reattività dell’anticorpo era sostanzialmente molto simile a quello visto per l’ α -gustducin. Sia i calici gustativi (Fig. 1.2.a-f), che le SCCs (Fig. 1.2.g-i) di bovino sono immunoreattive al PLC β 2 e ci sono aree ad alta densità di SCCs arrangiate in linee parallele, con i processi apicali che corrono fino alla superficie libera (Fig. 1.2.h,i). Con un esperimento di immunoblotting è stata confermata l’espressione dell’ α -gustducin nella lingua e nelle vie aeree di bovino (Fig. 2).

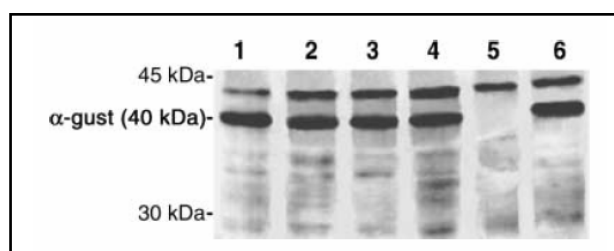


Fig.2. Immunoblotting con anticorpo anti- α -gustducin su tessuti di bovino: 1, papilla circumvallata; 2, epiglottide; 3, aritenoidi; 4, trachea; 5, rene; 6, bronchi. Marcatori di peso molecolare (kDa): 45 000 e 30 000 Dalton, rispettivamente.

Il blotting di estratti proteici di papilla circumvallata, epiglottide, aritenoidi, trachea e bronchi era positivo all'anticorpo, dando una banda del peso molecolare atteso (40KDa). Come controllo negativo è stato utilizzato il rene. Non si sono notate differenze dovute al sesso nella distribuzione dei calici gustativi e delle SCCs.

Sebbene le cellule gustative di bovino siano già state usate per esperimenti di biologia molecolare (181), studi precedenti sul sistema gustativo di bovino sono molto rari (182). In questi studi, la presenza di calici gustativi nella laringe viene descritta per la sua correlazione con la ruminazione. Questo dato è stato confermato dai miei esperimenti, che dimostrano come aritenoidi e lingua posseggano un epitelio pluristratificato, e nella laringe un sufficiente numero di calici gustativi, a conferma del probabile ruolo funzionale di questi recettori laringei come di protettori della vie aeree profonde dei ruminanti, prevenendo che particelle di cibo e altre sostanze entrino dalla laringe durante la fase del rigurgito. Per mezzo di esperimenti di immunocitochimica è stato dimostrato che i calici gustativi della papilla circumvallata di bovino contengono α -gustducin (183). I miei esperimenti confermano ed espandono i risultati precedenti a tutta la cavità orale e non solo, mostrando come un'altra molecola della cascata chemorecettoriale, il PLC β 2, sia anche espressa. Presi insieme, i miei dati mostrano che marcatori del gusto precedentemente descritti in roditori e umani vengano espressi anche nella cascata chemorecettoriale del bovino, sia nella lingua che nelle vie aeree. Questo studio, inoltre, è la prima dimostrazione della presenza di SCCs in mammiferi di grossa taglia. L'organizzazione generale del sistema descritto nei roditori (180) sembra venir confermato anche in bovino. Comunque, esistono alcune differenze sostanziali. In *B. taurus*, le SCCs sembrerebbero molto più lunghe di quelle dei roditori; inoltre, hanno un accentuato profilo bipolare mentre in roditori sono più a fiasca. In ogni caso queste differenze sono probabilmente correlate allo spessore dell'epitelio, più grande in bovino che nei roditori. Comunque, le SCCs di bovino presentano un pattern organizzativo molto singolare, soprattutto nei bronchi (dove sono disposte parallelamente e intercalate ad elementi epiteliali), molto diverso da quello osservato nelle vie aeree distali dei roditori. Questa organizzazione ricorda fortemente quella delle SCCs di pesce, particolarmente nelle aree dove le SCCs sono più comuni, nei raggi vibratili (139). Tutto questo sembra suggerire che nei mammiferi di taglia grossa, nonostante la grande estensione delle branche respiratorie, ci sono aree distali di sensibilità inusuali.

Concludendo, sebbene siano state scoperte solo recentemente, la ricerca riguardo le SCCs nelle vie aeree di mammifero è in rapida espansione e i dati ottenuti da vari gruppi di ricerca sono molto consistenti. La presenza di SCCs è stata verificata in tutte le specie di mammifero studiate, deducendone che esse siano comunemente presenti in tutti i mammiferi. La somiglianza fra le SCCs e vari elementi che nel passato venivano chiamati in diversi modi (180), rappresenta una conferma molto forte a questa ipotesi. La scoperta di aree ad alta densità di SCCs nei bronchi di bovino

indicherebbe che considerare il DCS come costituito da semplici elementi separati, totalmente sprovvisti di elementi ancillari, sia probabilmente un'over-semplificazione.

6.2. I calici gustativi della laringe e i chemorecettori delle vie aeree dimostrano bassi livelli di espressione dei recettori del dolce e dell'umami (T1Rs), ma esprimono molti dei recettori dell'amaro (T2Rs)

Il sistema gustativo è stato selezionato durante l'evoluzione per rilevare composti nutritivi e benefici cosiccome sostanze potenzialmente dannose o pericolose. In particolare, il gusto amaro si è evoluto come un sistema d'allarme per segnalare l'ingestione di potenziali sostanze tossiche (alcaloidi di piante e altre tossine ambientali). I recettori specializzati nella percezione del gusto amaro sono i T2Rs, espressi in cellule gustative recettoriali neuroepiteliali specializzate organizzate all'interno dei calici gustativi o presenti come entità solitarie (SCCs). Anche il gusto dolce e quello umami vengono percepiti da cellule simili a quelle dell'amaro, con l'unica differenza che i tre recettori posseggono un dominio extracellulare molto grande (famiglia dei T1Rs). L'eterodimero T1R2/T1R3 è il recettore del gusto dolce, mentre il T1R1/T1R3 percepisce il gusto umami. A valle dei recettori giocano un importante ruolo, non ancora pienamente compreso, nella trasduzione del segnale una serie di molecole: α -gustducin, G β 3/ γ 13, Plc β 2, IP3R3 e TrpM5. Una serie di lavori, fatti fino ad oggi con l'intento di studiare la distribuzione e localizzazione dei recettori T1Rs e T2Rs nei vari tessuti gustativi, ne hanno dimostrato la presenza in tutta la cavità orale (papille della lingua e calici gustativi del palato), in cellule solitarie dell'apparato digerente e nelle SCCs dell'epitelio nasale. Nessun dato è disponibile sulla presenza di questi recettori a livello della laringe o della vie aeree più profonde (ricche di calici gustativi e SCCs, rispettivamente), nonostante una serie di studi di elettrofisiologia abbiano dimostrato che il nervo superiore della laringe non venga stimolato da sostanze dolci, umami o salate, ma funzioni nella rilevazione di stimoli provocati da sostanze acide o amare; quindi i possibili chemorecettori delle cellule della laringe non giocano un ruolo nella percezione del gusto, ma si sono adattati per la rilevazione di sostanze chimiche di tipo non salino, che provocherebbero i tipici riflessi protettivi delle vie aeree. Per sopperire alla mancanza di dati relativi ai recettori coinvolti nella chemocezione delle vie aeree, ho cercato di confermare la correttezza dei dati elettrofisiologici sulla laringe, ampliando l'area di studio anche a tutte le vie aeree e per conferma alla cavità orale. Ho cercato altresì di studiare la distribuzione e localizzazione dei calici gustativi e delle SCCs che esprimano i recettori T1Rs, T2Rs e PKD2L1-2, partendo dalla punta della lingua e dall'epitelio nasale, passando per la laringe, fino ad arrivare ai bronchi. Successivamente ho tentato di caratterizzare le cellule chemorecettoriali per vedere se coesprimano insieme al recettore anche altre molecole correlate alla trasduzione dei segnali, che portano alla percezione dello stimolo gustativo.

6.2.1. Espressione dei T1Rs e di alcune molecole della cascata chemorecettoriale tipiche della percezione del gusto nella cavità orale e nelle vie aeree

Tramite l'uso di primers specifici per i recettori T1R1, T1R2 e T1R3 di ratto, ho potuto dimostrare che le cellule gustative della cavità orale esprimono tutti e tre i T1Rs, mentre le vie aeree li esprimono a livello molto basso o nullo. Infatti esperimenti di RT-PCR su tessuti della cavità orale e delle vie aeree hanno dato come risultato (Fig. 3):

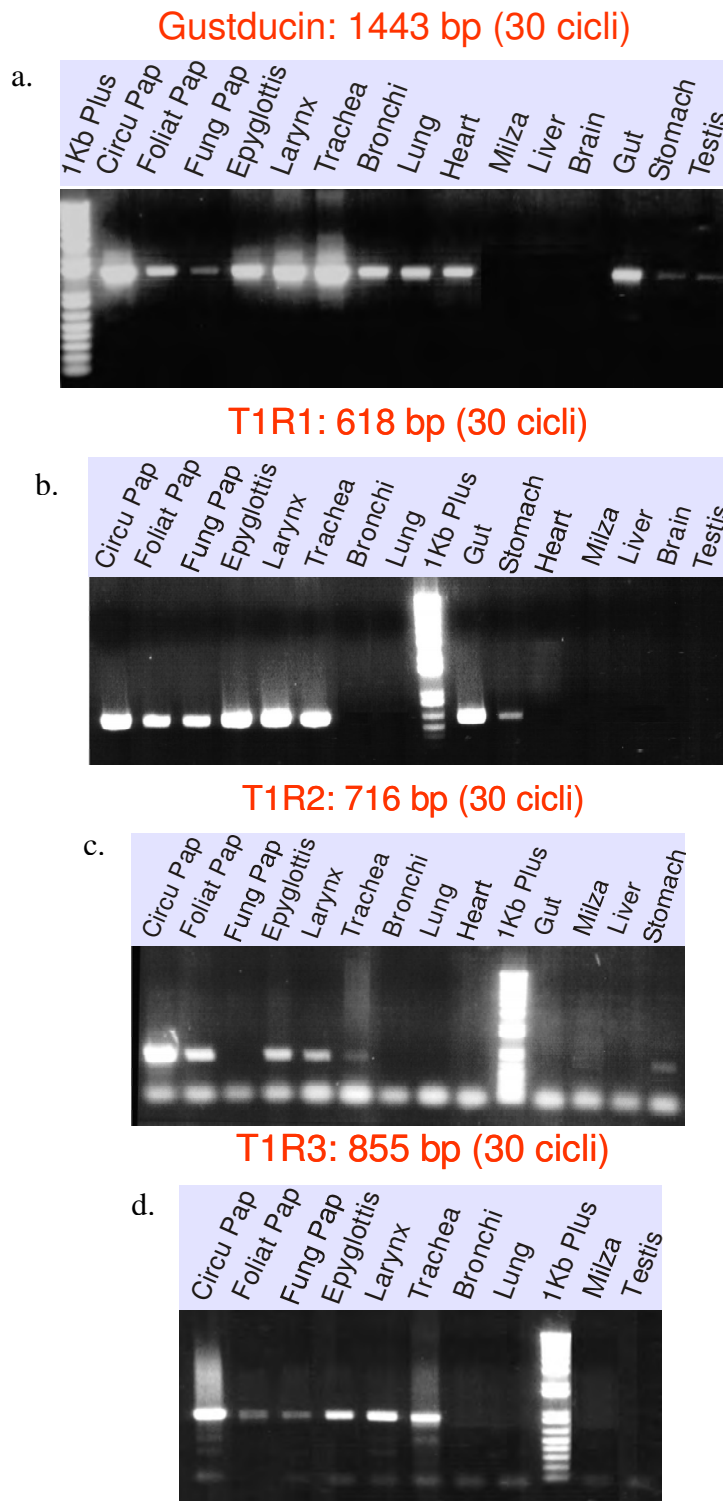


Fig.3. Esperimenti di RT-PCR su tessuti della cavità orale e delle vie aeree di ratto con primers specifici contro α -gustducin (a) e T1Rs (b-d).

- Espressione dell' α -gustducin nelle tre papille, nell'epiglottide, nella laringe, nella trachea, nei bronchi, nei polmoni, nel cuore, nell'intestino, nello stomaco e nel testicolo, e nessuna espressione negli organi di controllo negativo (milza, cervello e fegato)(Fig. 3a);
- Espressione del T1R1 nelle papille circumvallata, foliata e fungiforme, nell'epiglottide, nella laringe, nella trachea, nell'intestino e nello stomaco, e nessuna espressione nei bronchi, nei polmoni e negli organi di controllo negativo (cuore, milza, fegato, cervello, testicolo)(Fig. 3b);
- Espressione del T1R2 nelle papille circumvallata e foliata, nell'epiglottide, nella laringe e nella trachea, e nessuna espressione nella papilla fungiforme, nei bronchi, nei polmoni, nell'intestino, nello stomaco e negli organi di controllo negativo (cuore, milza e fegato)(Fig. 3c);
- Espressione del T1R3 nelle papille circumvallata, foliata e fungiforme, nell'epiglottide, nella laringe e nella trachea, e nessuna espressione nei bronchi, nei polmoni e negli organi di controllo negativo (milza e testicolo)(Fig. 3d).

Gli esperimenti di RT-PCR non davano nessun prodotto se venivano amplificati con primers specifici per l' α -gustducin, il T1R1, il T1R2, il T1R3 e il GAPDH (gliceraldeide-fosfato-deidrogenasi) i cDNA di controllo nei quali era stato omissa l'enzima di trascrizione inversa (dati non mostrati). Inoltre, il prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione con primers specifici per il GAPDH, su cDNA nei quali era stato aggiunto l'enzima di trascrizione inversa, era presente in tutti i cDNA dei tessuti considerati (dati non mostrati).

Questo primo dato, denota che l'espressione dei T1Rs è limitata alla cavità orale e alla prima parte dei laringe e trachea, ma non vi è nessuna espressione nelle vie aeree profonde, e che altri recettori devono essere presenti nelle cellule delle vie aeree al disotto della laringe vista la presenza dell' α -gustducin in tali tessuti.

Per confermare questo dato si sono scelte due strade separate: l'ibridizzazione insitu per confermare la presenza del trascritto genico dei tre recettori e dell' α -gustducin e l'uso di animali transgenici che esprimano la proteina fluorescente GFP sotto il controllo del promotore specifico di geni correlati alla chemoccezione.

Dopo aver inserito in un vettore plasmidico i prodotti di PCR ottenuti da primers specifici per i geni dei T1Rs e dell' α -gustducin e aver isolato la colonia batterica con i plasmidi desiderati, sono state prodotte le sonde di RNA antisense marcate con digossigenina partendo da una maxi-preparazione di plasmide con inserto. Le sonde avevano la seguente lunghezza: α -gustducin 1443bp; T1R1 2400bp; T1R2 2400bp; T1R3 1500bp. L'ibridizzazione su vetrino è stata fatta alla temperatura di 55-61°C, in base al contenuto in basi GC della sequenza della sonda. Dopo lavaggi di stringenza e riconoscimento con un anticorpo anti-digossigenina coniugato con una fosfatasi alcalina, i tessuti

sul vetrino sono stati fatti reagire con il substrato dell'enzima e si sono ottenuti i seguenti risultati (Fig. 4):

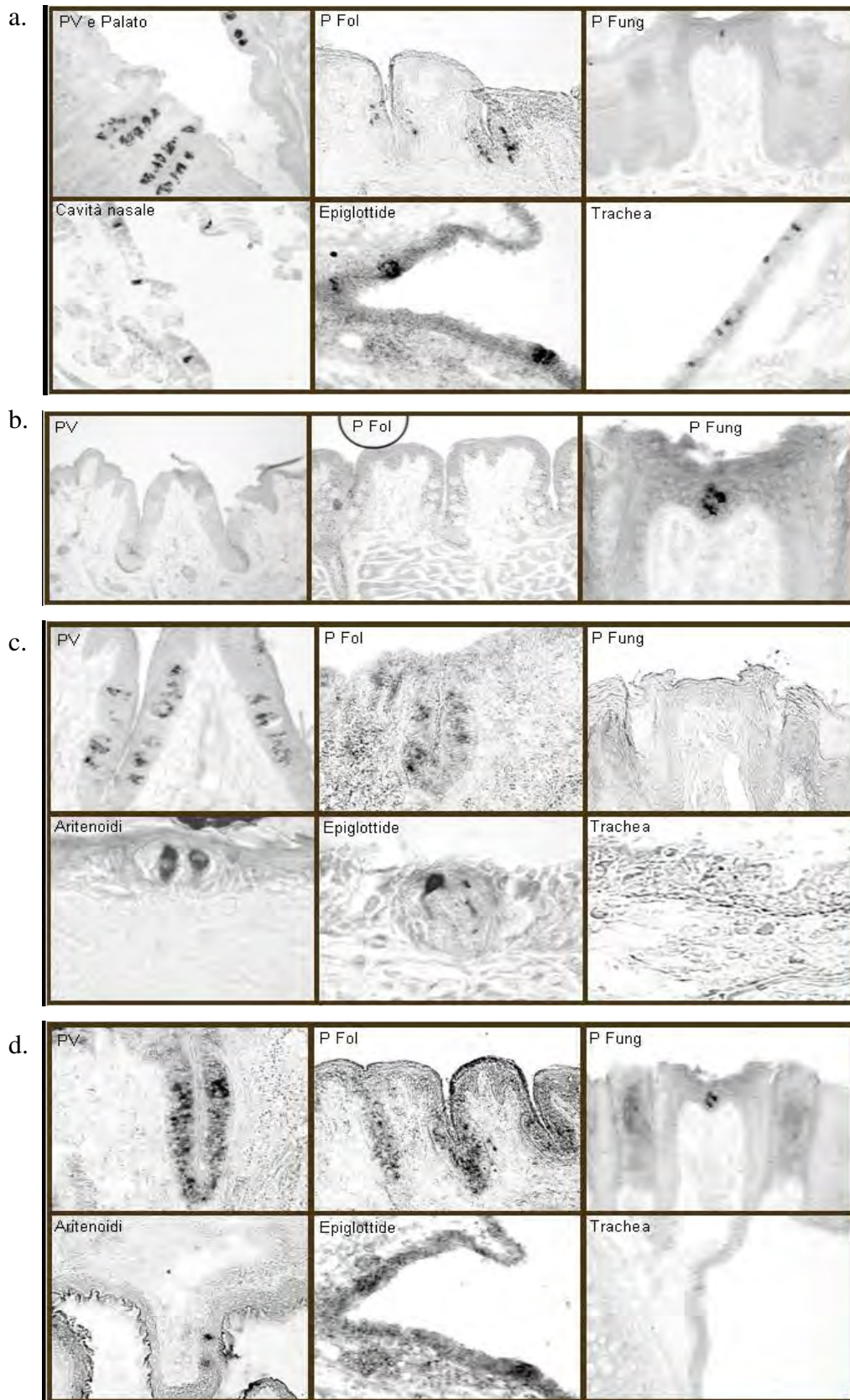


Fig.4. Esperimenti di Ibridizzazione insitu su tessuti della cavità orale e delle vie aeree di ratto con sonde specifiche per l' α -gustducin (a), il T1R1 (b), il T1R2 (c) e il T1R3 (d).

- La sonda dell' α -gustducin antisenso ha ibridizzato in tutte e tre le papille, nel palato molle e negli altri tessuti delle vie aeree, dove sia nei calici gustativi dell'epiglottide e della laringe che nelle SCCs di laringe, trachea e bronchi la sonda T1R2as da una serie di segnali netti (Fig. 4a). Sono state ritrovate varie SCCs, che esprimevano l' α -gustducin, anche nell'epitelio della cavità nasale. La sonda dell' α -gustducin senso non ibridizza in nessun caso;
- La sonda del T1R1 antisenso (T1R1as) ha ibridizzato nella papilla fungiforme e molto poco o nulla nelle papille circumvallata e foliata (6) (Fig. 4b). Negli altri tessuti delle vie aeree l'ibridizzazione si confonde con il background e non sono visibili calici gustativi o SCCs che esprimano il T1R1 (dati non mostrati). La sonda T1R1 senso (T1R1s) non ibridizza in nessun caso;
- La sonda del T1R2as ha ibridizzato nelle papille circumvallata e foliata e per nulla nella papilla fungiforme (6). Negli altri tessuti delle vie aeree solo nell'epiglottide e nella laringe sono distinguibili dal background alcuni calici gustativi nei quali l'ibridizzazione della sonda T1R2as da un segnale netto (Fig. 4c). Non sono visibili nelle vie aeree SCCs che esprimano il T1R2. La sonda T1R2s non ibridizza in nessun caso;
- La sonda del T1R3as ha ibridizzato in tutte e tre le papille (6). Negli altri tessuti delle vie aeree solo nei calici gustativi dell'epiglottide e della laringe l'ibridizzazione della sonda T1R2as da un segnale netto. Nella trachea alcune SCCs danno dei segnali deboli a volte poco evidenti a causa del background (Fig. 4d). La sonda T1R3s non ibridizza in nessun caso.

Questi esperimenti confermano totalmente i dati ottenuti con la RT-PCR, anche se nelle vie aeree in alcuni casi il dato non è chiaro per colpa del background. Inoltre, i risultati ottenuti con la sonda per l' α -gustducin aggiungono valore all'ipotesi che esista un sistema chemosensoriale diffuso costituito da SCCs che non esprimono recettori del dolce/umami, ma come supportato dai dati di elettrofisiologia esse probabilmente posseggono recettori del gusto amaro o del gusto acido. La figura 5 mostra i vari livelli a cui sono state prese sezioni di laringe e trachea. La colorazione è stata fatta con blu di bromofenolo e l'immagine della laringe/trachea è stata presa con stereo microscopio dopo fissazione dei tessuti e taglio longitudinale degli stessi per mostrarne l'epitelio all'interno.

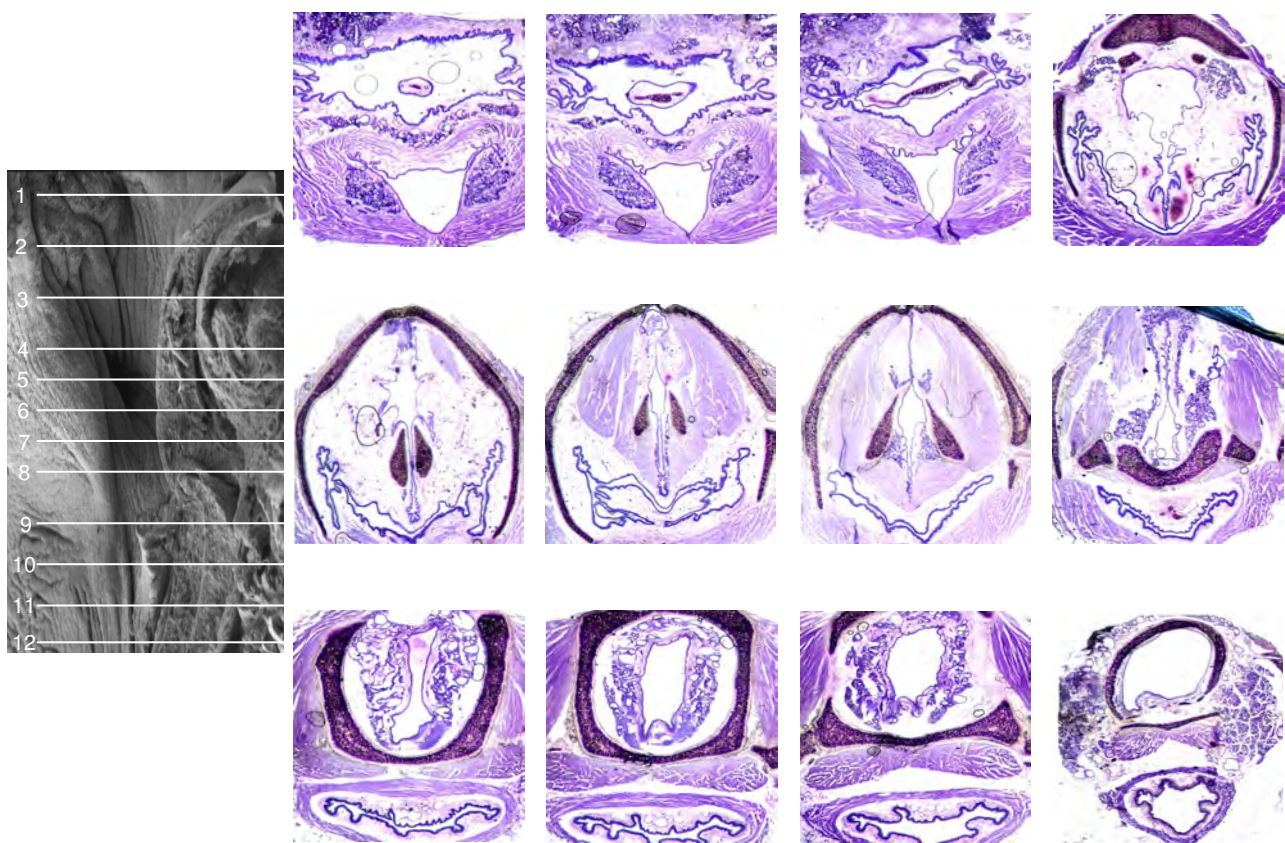


Fig.5. Anatomia della laringe e della trachea di ratto allo stereo microscopio e dopo aver fatto sezioni seriate degli stessi.

Come detto sopra, l'alternativa per dimostrare se e quali recettori erano presenti nelle vie aeree e per confermare i dati di RT-PCR, viene dalla possibilità di utilizzare animali transgenici che esprimono la proteina fluorescente GFP sotto il controllo della sequenza promotore di geni coinvolti nella chemoccezione. A questo scopo mi sono recato presso il laboratorio del prof. T.E. Finger del Rocky Mountain Taste & Smell Center (University of Colorado Health Science Center - Aurora CO USA) per una collaborazione fra i nostri laboratori nel tentativo di caratterizzare ulteriormente il DCS e le SCCs delle vie aeree. Sono stati usati topi transgenici esprimenti il GFP sia sotto il controllo del promotore del T1R3 (subunità in comune fra gli eterodimeri del recettore del dolce e del recettore dell'umami), che sotto il promotore del TrpM5 (canale che viene espresso in tutto il subset di cellule che esprimono il PLC β 2), per caratterizzarne la distribuzione dei calici gustativi e delle SCCs nella cavità orale, nella laringe, nella faringe e nella trachea. Inoltre, l'uso di topi transgenici è stato di notevole importanza per la possibilità di osservare direttamente nello stesso animale le somiglianze fra il macchinario chemosensoriale tipico delle cellule neuroepiteliali gustative dell'epitelio della lingua e i trasduttori molecolari localizzati nelle SCCs, che sentono la composizione chimica dell'aria e del muco sopra l'epitelio.

Sono stati fatti esperimenti a due livelli differenti:

- Dopo aver sacrificato il topo, è stata fatta la dissezione di tessuti della lingua, del palato, della laringe, della faringe e della trachea e sono stati immediatamente immersi in una soluzione di Tyrode's buffer a pH 7.2 (la proteina GFP si degrada e perde la sua fluorescenza al di fuori del range di pH 7.0-7.4) e conservati alla temperatura di 4°C per alcuni giorni. Successivamente, i tessuti montati su un vetrino ricoperto di resina e mantenuti in piano da aghi molto fini, sono stati visualizzati allo stereo microscopio con luce fluorescente per vedere dove erano localizzate le cellule che esprimevano il GFP (modalità "whole mount").
- Gli stessi tessuti, mantenuti in Tyrode's buffer, sono stati poi fissati per 2 ore a RT in 4% PFA, crioprotetti ON a 4°C in saccarosio 20%, congelati velocemente con ghiaccio secco in mezzo di inclusione e sezionati con un criostato per preparare dei vetrini seriati da sottoporre ad esperimenti di immunofluorescenza con anticorpi contro l' α -gustducin, il PLC β 2, il PGP-9.5 e il CGRP.

La figura 6 mostra la fluorescenza "whole mount" dei tessuti del topo T1R3-GFP.

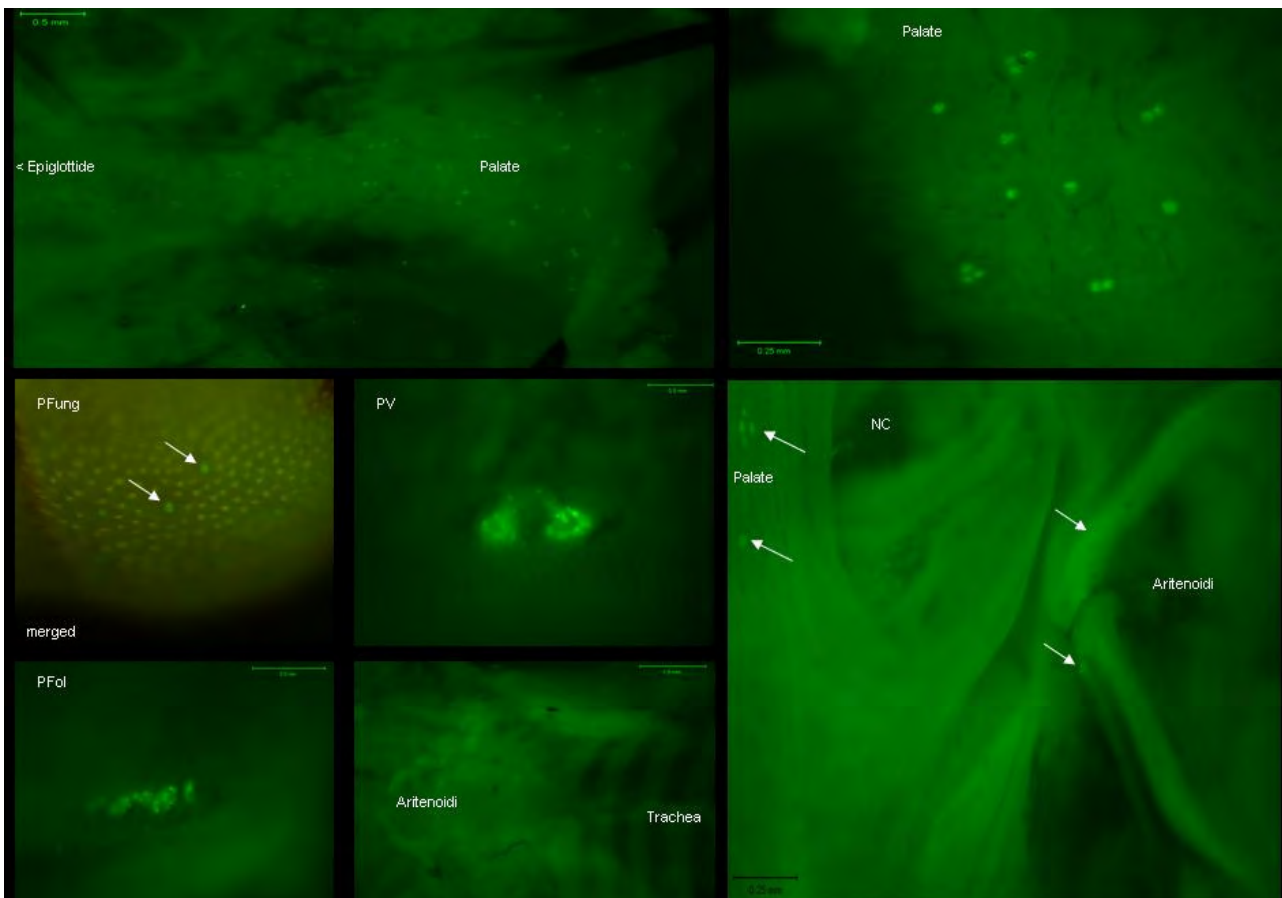


Fig.6. "Whole mount" fluorescente del topo transgenico T1R3-GFP, che mostra dei segnali netti nei calici gustativi del palato, delle tre papille e a bassa espressione nelle aritenoidi, ma non sembra esprimere la proteina GFP a livelli apprezzabili nell'epitelio delle vie aeree. NC=cavità nasale. Merged=immagine verde e rossa sovrapposte per eliminare la fluorescenza di background delle papille filiformi.

Come si può vedere si ha un'espressione elevata del recettore T1R3 nei calici gustativi del palato e della lingua, bassa nei calici gustativi di laringe e faringe e molto bassa/assente nelle SCCs delle vie aeree. In contrasto, i topi transgenici TrpM5-GFP mostrano un'espressione ed una distribuzione molto simile a quella del T1R3 nei calici gustativi del palato, della lingua, della laringe e della rinofaringe (Fig. 7), mentre lungo tutte le vie aeree si possono ritrovare un numero spropositatamente alto di SCCs esprimenti il TrpM5 (nella cavità nasale, nella trachea e nei bronchi).

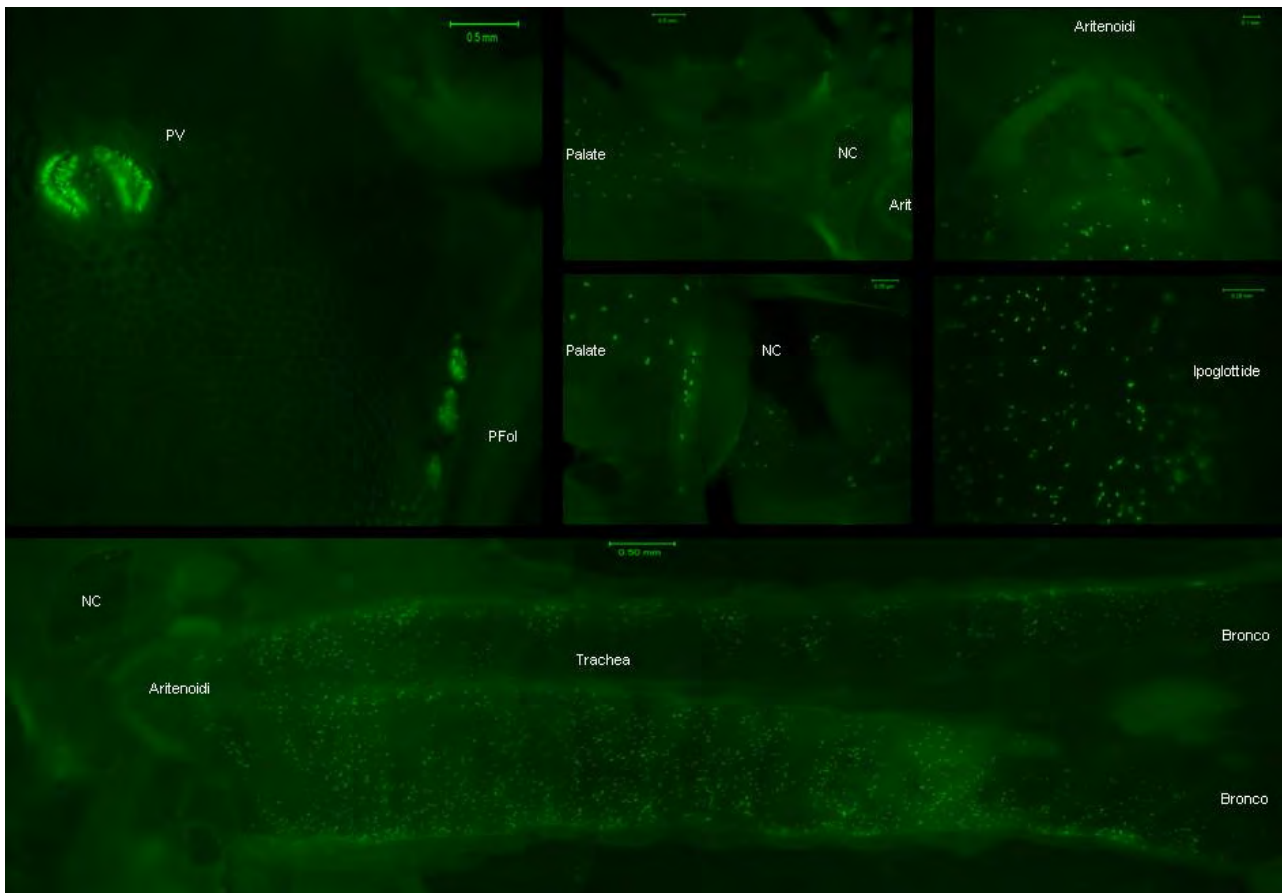


Fig.7. “Whole mount” fluorescente del topo transgenico T1R3-GFP, che mostra dei segnali netti nei calici gustativi del palato, delle tre papille, della cavità nasale e delle aritenoidi, e nelle SCCs della cavità nasale, dell'ipoglottide, della trachea e dei bronchi.

Precedentemente a questi miei esperimenti, vari studi sulle vie aeree di roditori (105, 106, 161) e di bovino (116) avevano dimostrato la presenza di alcuni recettori e di vari elementi della cascata di trasduzione dei segnali del gusto amaro (α -gustducin, PLC β 2 e IP3R3). Per coprendere i risultati della fluorescenza “whole mount”, ottenuti con i due tipi di topi transgenici, ho eseguito degli esperimenti di immunofluorescenza sui tessuti dei topi T1R3- e TrpM5-GFP per vedere se le cellule GFP fluorescenti esprimessero anche l' α -gustducin, il PLC β 2, il PGP-9.5 e il CGRP.

La figura 8a mostra sia SCCs immunoreattive (IR) all' α -gustducin che colocalizzano con SCCs TrpM5-GFP, sia SCCs IR solo all' α -gustducin. La figura 8b mostra come le SCCs TrpM5-GFP, marchino l'intero subset di SCCs IR al PLC β 2, come già descritto in letteratura per le cellule gustative.

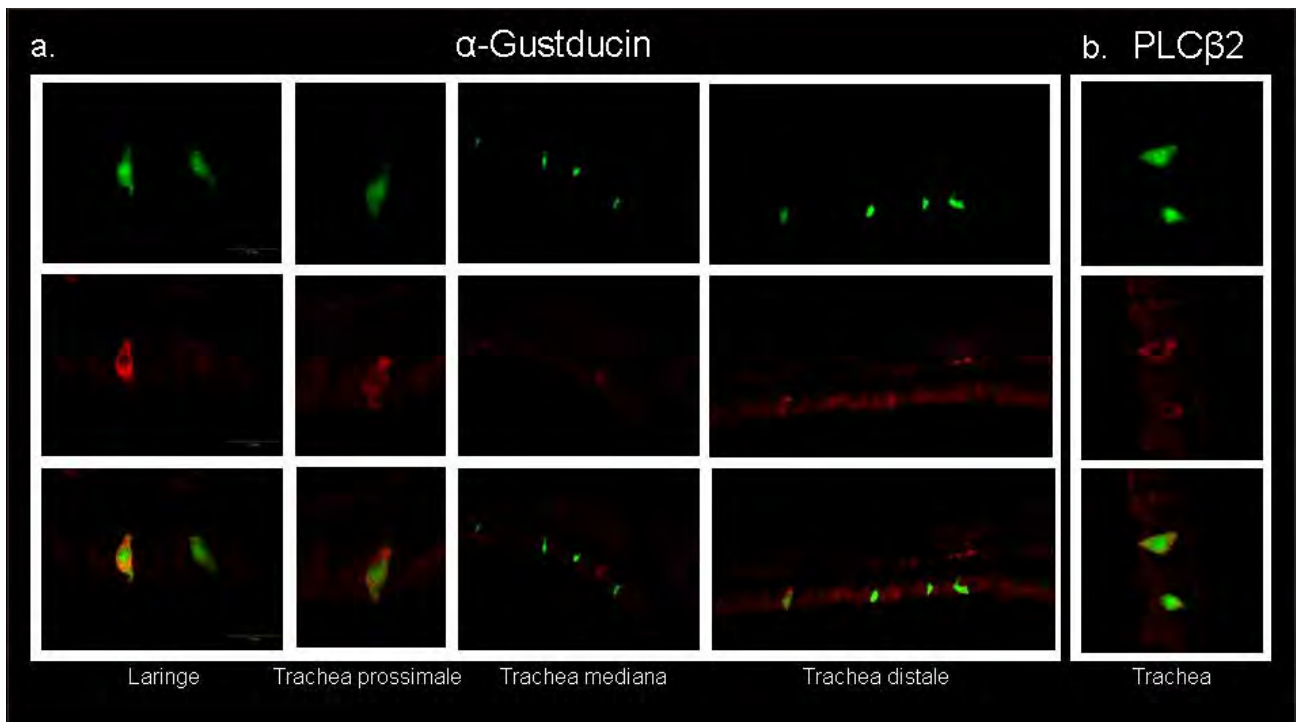


Fig.8. Immunofluorescente con anticorpi a. anti- α -gustducin (red) o b. anti-PLC β 2 (red) su tessuti di laringe e trachea di topo transgenico TrpM5-GFP (verde).

La figura 9a mostra, cosiccome succedeva nei topi TrpM5-GFP, sia SCCs IR all' α -gustducin che colocalizzano con SCCs che esprimono livelli molto bassi di T1R3-GFP, sia SCCs IR solo all' α -gustducin. La figura 9b mostra una distribuzione sia di SCCs IR al PLC β 2 che colocalizzano con SCCs che esprimono livelli molto bassi di T1R3-GFP, sia SCCs IR solo al PLC β 2.

Questi risultati dimostrano che cellule delle vie aeree esprimenti T1R3 o TrpM5 condividono elementi della cascata chemorecettoriale del gusto amaro, implicando un coinvolgimento più ampio di questi elementi in altri pathways di trasduzione del segnale non solo del gusto amaro.

Per quanto riguarda le possibili innervazioni presenti nei due tipi di topi transgenici, la figura 10 mostra come alcune fibre nervose IR al "protein gene product 9.5" (PGP 9.5) e al "calcitonin gene-related peptide" (CGRP) contattino direttamente calici gustativi di palato e lingua e SCCs delle vie aeree (trachea), che esprimono il TrpM5-GFP.

Le figure 11a e 11b mostrano come alcune fibre nervose IR al PGP 9.5 e al CGRP contattino direttamente calici gustativi di palato, lingua e rino-faringe che esprimono il T1R3-GFP, ma non tocchino mai le SCCs delle vie aeree esprimenti a bassissimi livelli il T1R3-GFP.

Questi risultati, confermano studi precedenti sulle innervazioni di calici gustativi (184) e cellule neuroendocrine della laringe (106, 186, 187) e delle vie aeree (185) e aprono la possibilità di esperimenti futuri di elettrofisiologia, che vogliano dimostrare a quali composti rispondano le innervazioni connesse alle vie aeree dalla laringe in giù (probabilmente composti percepiti come amari o acidi).

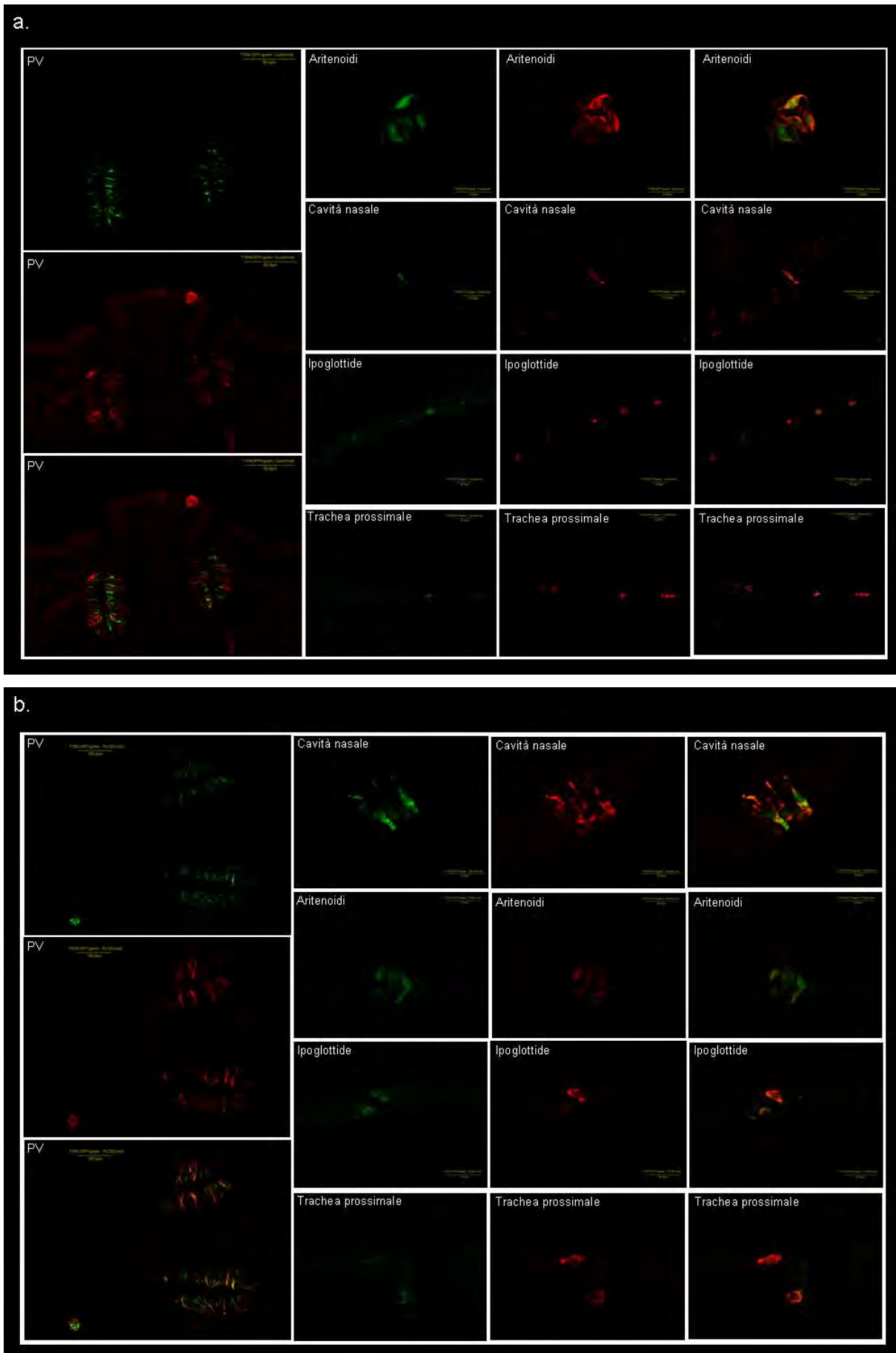


Fig.9. Immunofluorescente con anticorpi a. anti- α -gustducin (red) o b. anti-PLC β 2 (red) su tessuti di lingua (papilla circumvallata), aritenoidi, cavità nasale, ipoglottide e trachea di topo transgenico T1R3-GFP (verde).

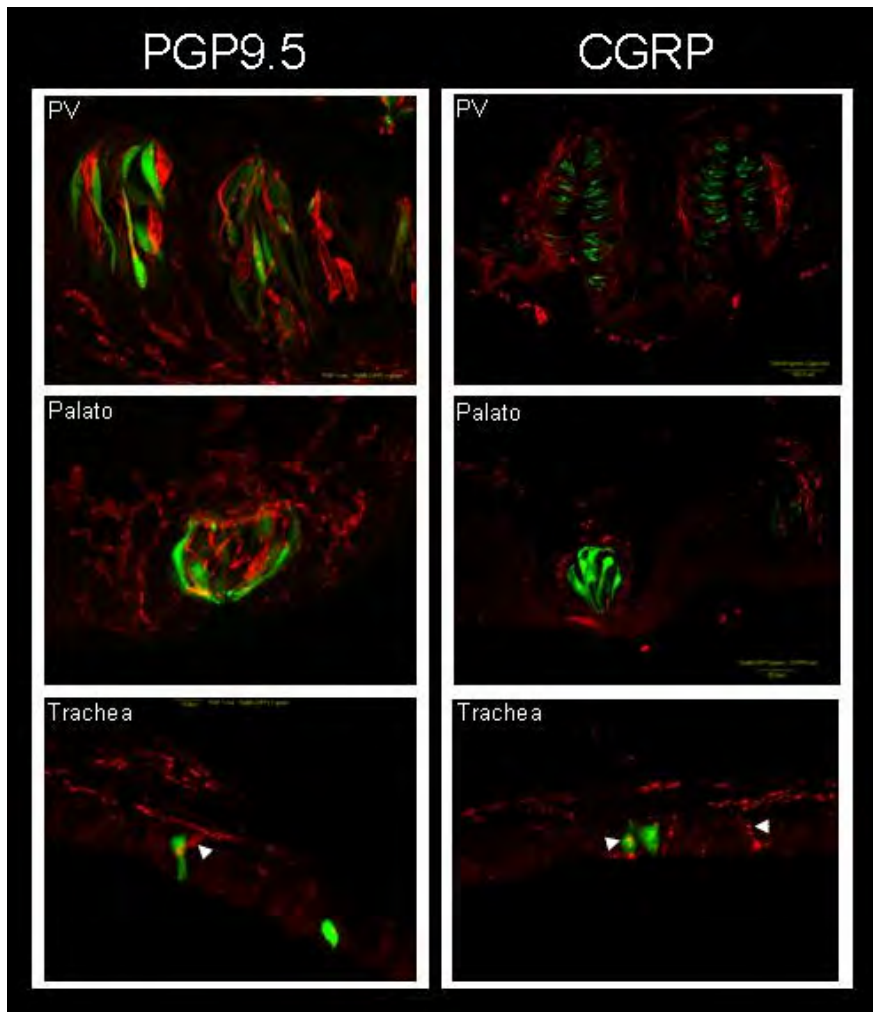


Fig.10. Immunofluorescente con anticorpi anti-PGP-9.5 (red) o anti-CGRP (red) su tessuti di palato, lingua (papilla circumvallata) e trachea di topo transgenico TrpM5-GFP (verde).

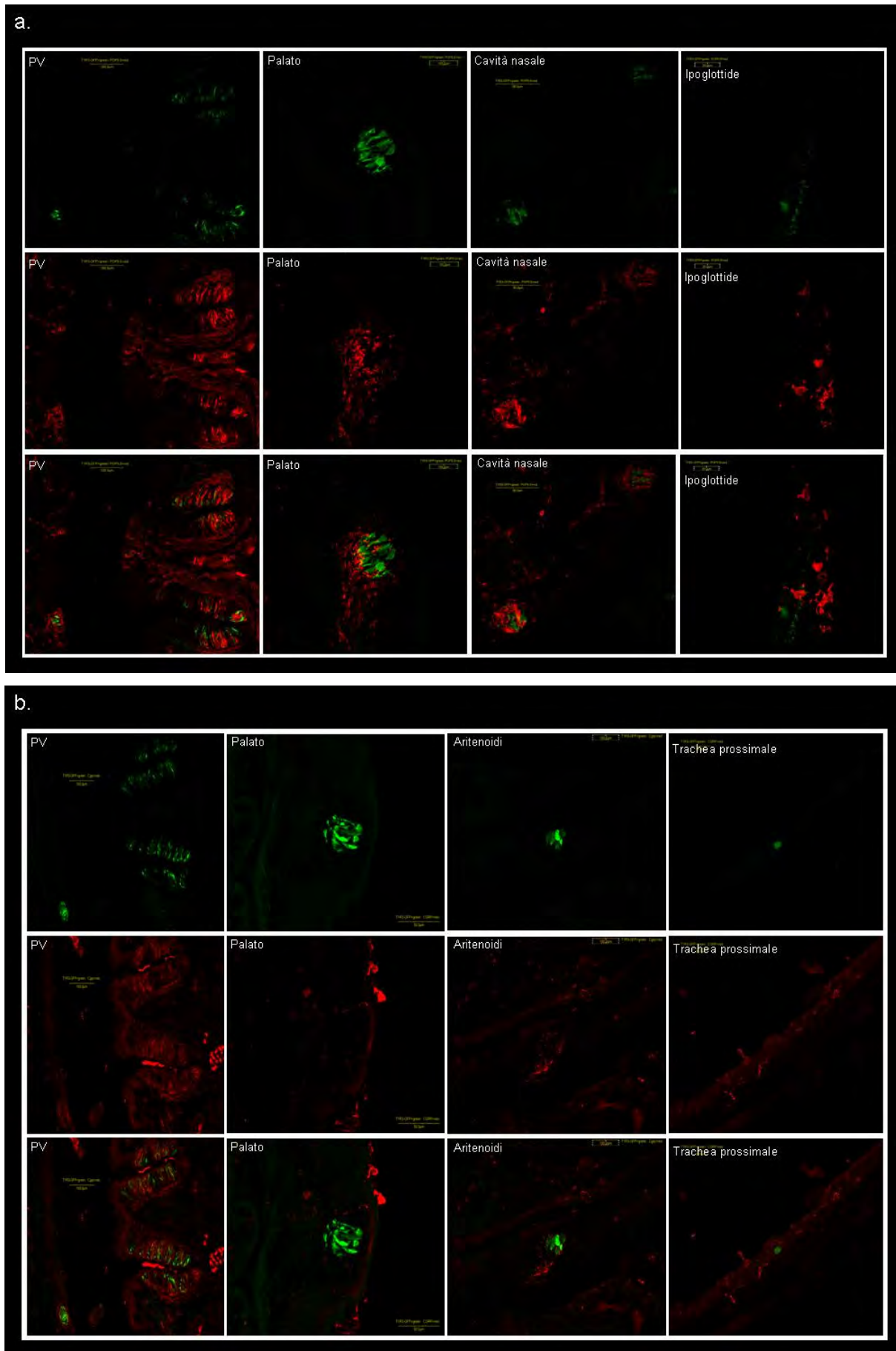


Fig.11. Immunofluorescente con anticorpi a. anti-PGP-9.5 (red) o b. anti-CGRP (red) su tessuti di lingua (papilla circumvallata), palato, ipoglottide, aritenoidi, cavità nasale e trachea prossimale di topo transgenico TIR3-GFP (verde).

Tutti insieme, questi risultati dimostrerebbero una probabile localizzazione nella cavità orale e nella regione della laringe dei recettori T1Rs del dolce e dell'umami, tipicamente coinvolti nella nutrizione dell'animale, mentre la distribuzione di TrpM5, α -gustducin e PLC β 2, insieme alle innervazioni IR a PGP 9.5 e CGRP, condurrebbero alla conclusione che altri recettori localizzati nella parte posteriore della lingua, nella laringe e nelle vie aeree siano coinvolti nel sensing chimico e nei chemoriflessi protettivi delle vie aeree, tramite la rilevazione della presenza di sostanze di fluido non fisiologico o di cibo nella laringe o nella trachea. Questi risultati, inoltre, sembrano concordare pienamente con gli studi di elettrofisiologia accennati precedentemente (188, 189).

Questi recettori sono probabilmente parte integrante del DCS. Se il sistema gustativo gioca un ruolo determinante nel campionamento del cibo, il DCS sembra piuttosto un sistema d'allarme. Gli apparati respiratorio e digestivo sono relativamente autonomi dal sistema nervoso centrale dovuto al sistema nervoso intrinseco che regola le strutture motorie e secretorie (190); gli esperimenti con anticorpi contro PGP-9.5 e CGRP, che reagiscono rispettivamente con le fibre nervose spesse, che conducono alle cellule neuroendocrine, e fibre nervose varicose sottili, dimostrano che le cellule gustative nei calici gustativi della laringe e le SCCs delle vie aeree sono altamente innervate. In questi tessuti, il DCS potrebbe dare informazioni circa il microambiente luminale. I riflessi locali potrebbero essere generati dall'interazione tra il DCS e gli elementi circostanti. La trasmissione di informazioni fra il DCS e il sistema nervoso centrale è possibile, ma appare limitata alle cellule chemosensoriali dei calici gustativi innervate da assoni afferenti. Per gli elementi non innervati sembra più probabile un'azione di tipo paracrina.

Il DCS sembra essere un target potenziale per nuovi medicinali, visto che le informazioni ottenute da questo sistema inducono riflessi secretori e protettivi delle vie aeree. Ne deriva che la modulazione dell'apparato respiratorio tramite sostanze che agiscano sulle SCCs, potrebbe essere importante nel trattamento di malattie molto gravi come la Fibrosi cistica e l'asma.

6.2.2. Espressione dei recettori T2Rs dell'amaro e dei recettori candidati PKD2L1 e PKD2L2 dell'acido nella cavità orale e nelle vie aeree di ratto.

Gli esperimenti sui recettori T1Rs del dolce e dell'umami e con i topi transgenici T1R3- e TrpM5-GFP hanno lasciato aperta la questione di quali recettori fossero accoppiati a TrpM5, α -gustducin e PLC β 2 nelle SCCs delle vie aeree. L'ipotesi che fossero recettori dell'amaro o dell'acido deve essere ancora testata. Per questo motivo ho effettuato degli esperimenti di RT-PCR per cercare di dimostrare se nelle vie aeree i trascritti genici dei recettori T2Rs o dei recettori PKD2L1/2 siano presenti o meno. Primers specifici per l' α -gustducin, i recettori Tas2R10, Tas2R105, Tas2R13, Tas2R134, Tas2R14, Tas2R41, Tas2R7, Tas2R108, Tas2R1, PKD2L1 e PKD2L2 di ratto sono stati

disegnati ed utilizzati in esperimenti di RT-PCR con cDNA ottenuti dalle papille circumvallata, foliata e fungiforme, da epitelio nasale, palato molle, laringe, trachea, bronchi, polmoni, cuore, milza, intestino e stomaco.

In figura 12, viene mostrato come tutti i recettori T2Rs dell'amaro studiati diano un prodotto specifico dalla lingua alla trachea e nell'epitelio nasale, come alcuni di loro siano presenti anche nei bronchi (Tas2R1, Tas2R41 e Tas2R7), ma siano completamente assenti nei polmoni e negli organi di controllo negativo (cuore e milza). L' α -gustducin è presente dalla lingua ai polmoni, non è presente negli organi di controllo negativo, ma è presente nell'intestino e nello stomaco, come riportato in bibliografia.

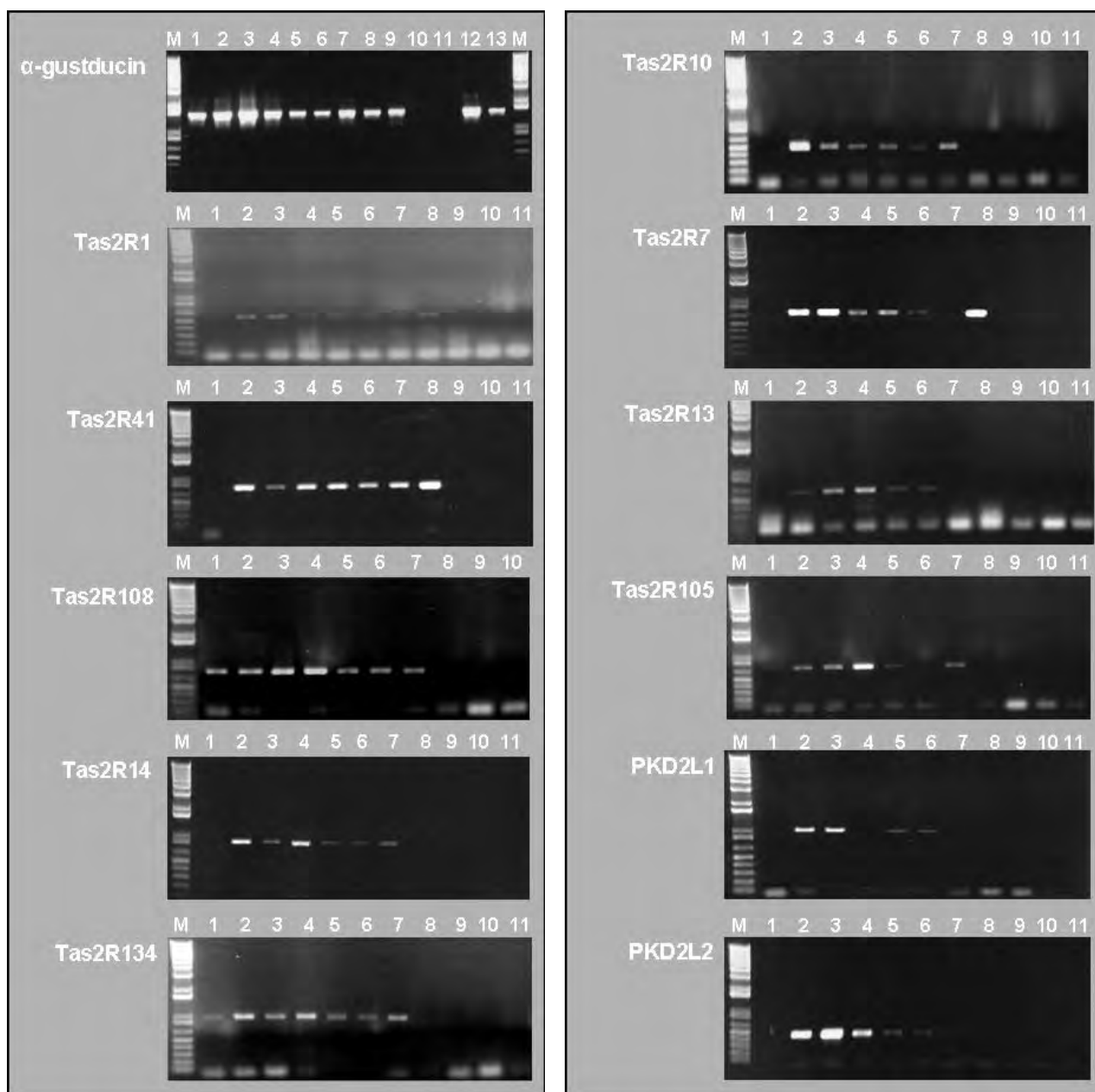


Fig.12. RT-PCR con primers specifici per l' α -gustducin (1443bp), il Tas2R1 (544bp), il Tas2R41 (bp), il Tas2R108 (bp), il Tas2R14 (bp), il Tas2R134 (bp), il Tas2R10 (bp), il Tas2R7 (bp), il Tas2R13 (bp), il Tas2R105 (bp), il PKD2L1 (bp) e il PKD2L2 (bp). M=1Kb plus DNA ladder della Promega; 1=papilla fungiforme; 2=papilla foliata; 3=papilla circumvallata; 4=epitelio nasale; 5=palato molle; 6=laringe; 7=trachea; 8=bronchi; 9=polmoni; 10=cuore; 11=milza; 12=intestino; 13=stomaco.

Inoltre, viene mostrato come i recettori PKD2L1 e PKD2L2 dell'acido diano un prodotto specifico nella papilla circumvallata, nella papilla foliata e nel palato (controlli positivi)(3, 60-62), e nella laringe (come estrapolazione dei dati ottenuti da studi di elettrofisiologia: 188, 189), e come il PKD2L2 sia presente anche nell'epitelio nasale e nella trachea (Fig. 12). Sorprendentemente, tutte le vie aeree risultano essere negative ai recettori PKD2L1 e PKD2L2, ad esclusione della trachea per il PKD2L2. Questi risultati dimostrano che solo i recettori dell'amaro si spingono fino alle vie aeree più profonde, mentre i recettori dell'acido, a differenza di quello che veniva da me ipotizzato precedentemente, non sembrano interessare se non la parte più prossimale alla laringe.

Gli esperimenti di RT-PCR non davano nessun prodotto se venivano amplificati con primers specifici per l' α -gustducin, i recettori Tas2R10, Tas2R105, Tas2R13, Tas2R134, Tas2R14, Tas2R41, Tas2R7, Tas2R108, Tas2R1, PKD2L1, il PKD2L2 e il GAPDH i cDNA di controllo nei quali era stato omissa l'enzima di trascrizione inversa (dati non mostrati). Inoltre, il prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione con primers specifici per il GAPDH su cDNA nei quali era stato aggiunto l'enzima di trascrizione inversa, era presente in tutti i cDNA dei tessuti considerati (dati non mostrati).

Tutti insieme, questi risultati dimostrerebbero una localizzazione nella cavità orale e nella laringe dei trascritti genici dei recettori T2Rs dell'amaro e dei recettori PKD2L1 e PKD2L2 candidati dell'acido, concordando pienamente con gli studi di elettrofisiologia (188, 189), mentre nelle vie aeree più profonde solo i trascritti genici dei recettori T2Rs dell'amaro sarebbero presenti, confermando il loro possibile coinvolgimento nel sensing chimico e nei chemoriflessi protettivi delle vie aeree. Inoltre, la presenza di un prodotto specifico nell'epitelio nasale dei recettori Tas2R1 e Tas2R108 di ratto (rT2R1 e rT2R16, rispettivamente), conferma i risultati ottenuti sempre nell'epitelio nasale con gli omologhi di topo mT2R19 e mT2R8 (105), assicurando così la validità degli altri dati ottenuti nelle vie aeree con gli stessi recettori.

Sarebbe molto interessante dimostrare che le SCCs della laringe e delle vie aeree oltre a TrpM5, α -gustducin e PLC β 2 coesprimano anche i recettori dell'amaro e dell'acido e che in questi tessuti non sia presente solo il trascritto di questi recettori, ma anche il prodotto della traduzione proteica. Purtroppo, i tentativi fatti fino ad oggi di produrre anticorpi specifici per i recettori dell'amaro sono stati vani a causa dell'alta omologia di sequenza di questi recettori. Finora, l'unica possibilità di vederne la localizzazione a livello cellulare, proverrebbe solo a livello di trascritto producendo sonde specifiche per i T2Rs per esperimenti di ibridizzazione insitu, mentre a livello di proteina tramite l'ingegnerizzazione di animali transgenici, che esprimano la proteina fluorescente GFP sotto il controllo del promotore specifico di uno dei recettori T2Rs o PKD2L1/2. Nel mio caso, sto portando avanti la produzione di sonde specifiche dei recettori dell'amaro e dell'acido per esperimenti di ibridizzazione in situ, che purtroppo non mi è stato ancora possibile effettuare in

quanto le sonde sono state ottenute solo pochi giorni prima della consegna della tesi di dottorato (work in progress...).

6.3. La LRRP Ba1-651 di ratto è una Δ -1-pirrolina-5-carbossilato-deidrogenasi del fegato di mammiferi, attivabile o inducibile dal cambiamento della concentrazione di molecole dolci a livello cellulare, che risulterebbe essere coinvolta nell'HPII, nella rigenerazione del fegato ed in altre patologie epatiche?

Il fegato è uno degli organi più complessi del corpo, contenente almeno 7 tipi cellulari differenti e che porta a termine più di 5000 funzioni (191), che includono la detossificazione del sangue e l'azione di riserva di zuccheri e grassi. In risposta a danni epatici (virali, chimici o chirurgici), il fegato inizia dei processi infiammatori, rigenerativi e riparatori con lo scopo di restituire funzionalità ai tessuti del fegato. La rigenerazione dopo epatectomia parziale, osservata fin dall'inizio del XIX° secolo, è una risposta orchestrata indotta da stimoli esterni specifici, che coinvolgono cambi sequenziali nell'espressione genica, nella produzione di fattori di crescita e nella struttura morfologica. Sono molte quindi le proteine coinvolte nella rigenerazione epatica e fra queste è stata riportata recentemente in ratto l'esistenza di una "liver regeneration related protein", indotta appunto durante epatectomia parziale, chiamata LRRP Ba1-651 (UniProt Accession Q7TP27; EMBL Accession AY325227) (178). Questa proteina è classificata come un membro della superfamiglia delle aldeidi deidrogenasi (ALDh) 4A1 o Δ -1-pirrolina-5-carbossilato-deidrogenasi (P5CDh), che è un enzima coinvolto nel catabolismo della prolina e la cui mutazione provoca la malattia metabolico congenita dell'iperprolinemia di tipo II (HPII). La LRRP Ba1-651 non contiene solamente la sequenza della P5CDh, ma contiene anche la sequenza di un membro della famiglia del recettore del fattore natriuretico atriale (ANF), e più precisamente tutto il dominio extracellulare del recettore del gusto dolce, il T1R2 (Fig. 13).

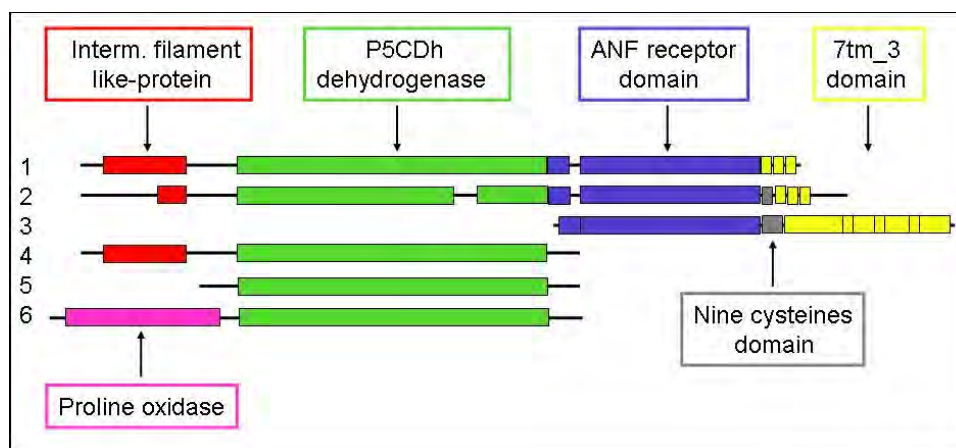


Fig.13. Rappresentazione schematica dei domini rappresentativi della deidrogenasi P5CDh di vertebrati ed invertebrati. 1=LRRP Ba1-651 di ratto; 2=P5CDh di scimpanzee; 3=recettore del dolce T1R2 di mammifero; 4=P5CDh di cane e di gallo; 5=P5CDh di lievito, orzo, Arabidopsis, drosophila, zebrafish, topo e orangotango; 6=Escherichia coli. Il dominio a nove cisteine serve per la dimerizzazione fra i recettori T1R2 e T1R3.

La figura 13 mostra, inoltre, il dominio P5CDh di vari vertebrati ed invertebrati e come si conservi nell'arco dell'evoluzione in questi organismi tanto differenti fra loro.

Nel trascrittoma del gene della LRRP Ba1-651 (costituito dall'unione della filament protein, della deidrogenasi e del dominio recettoriale del dolce) la P5CDh è a valle di una "intermediate filament-like protein" e a monte del recettore T1R2 e di altri due membri della famiglia T1Rs. Come si vede in figura 14, il gene della LRRP Ba1-651 di ratto presenta una stretta ortologia con lo stesso gene di tutti i mammiferi amniotici (uomo, gatto, topo, scimmia, cane, etc.).

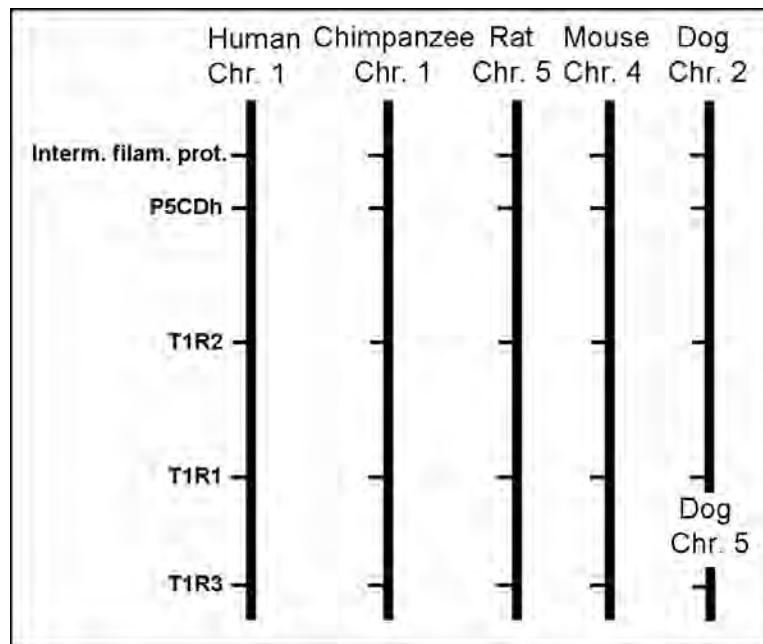


Fig.14. Localizzazione cromosomica dei geni di intermedie filament protein, P5CDh, T1R2, T1R1 e T1R3 di vari mammiferi amniotici. Come si può vedere, i diversi animali presentano una forte ortologia e conservazione dei geni sotto esame.

Il gene di ratto mappa nel cromosoma 5, l'ortologo di uomo e scimpanzee mappa nel cromosoma 1, quello di topo nel cromosoma 4 e quello di cane nel cromosoma 2 (anche se in quest'ultimo il T1R3 mappa nel cromosoma 5). E' stato, inoltre, fatto l'allineamento delle sequenze della LRRP Ba1-651 di ratto e scimpanzee e il T1R2 di vari mammiferi (Fig. 15). Si può notare un'omologia straordinaria, che rasenta quasi l'identità, fra la LRRP Ba1-651 di ratto e scimpanzee e i recettori T1R2 di uomo, ratto, topo, cane e bovino.

La mia ipotesi è quella che la LRRP Ba1-651 di ratto e scimpanzee sia un'enzima P5CDh con un dominio recettoriale del gusto dolce T1R2 (che chiameremo P5CDh-T1R2), che venga attivato dal cambiamento di concentrazione di una o più molecole dolci. Si ipotizza, infatti, che l'enzima P5CDh-T1R2 intervenga ad aiutare o a sostituire l'enzima P5CDh normalmente funzionante nel fegato, quando insorgono situazioni traumatiche, danni epatici o alimentazione troppo ricca in carboidrati/proteine. In tale situazione, il tasso di sostanze dolci nell'organo cambia, inducendo l'espressione dell'enzima P5CDh-T1R2.

T1R2_M_musculus	TYSAITDKLRDKRRFPAMLRTPSATHHIEAMVQLMVHFQWNWIVVLVSDDDYG-RENSH
T1R2_R_norvegicus	TYSAISDKLRDKRRHFPMLRTPSATHHIEAMVQLMVHFQWNWIVVLVSDDDYG-RENSH
T1R2_C_familiaris	TYSAISDDLRDKQHFPALLRTPAGADHQIEAMVQLLHFNNWIVVLVSDDDYG-RYNSQ
T1R2_B_taurus	SHVVSDSLKRKVKSLSRVLFANHGLYVDYQAPP SHGILQARVLEWVAFPSGDLDFPE
T1R2_H_sapiens	TYSATSDELDRDKVRFEPALLRTPSATDHHVEAMVQLMDFRWNWIVVLVSSDTYG-RDNGQ
LRRP_Bal-651_R_norv	TYSAISDKLRDKRRHFPMLRTPSATHHIEAMVQLMVHFQWNWIVVLVSDDDYG-RENSH
P5CDh_P_troglodytes	TYSAISDELDRDKVRFEPALLRTPSATDHHVEAMVQLMDFRWNWIVVLVSSDTYG-RDNGQ
T1R2_M_musculus	LLSQRLTNTGDICTAFQEVLPVPEENQAVRPEEQDLDNILDKLRRTSARVVVIFSPPELS
T1R2_R_norvegicus	LLSQRLTKTSDICTAFQEVLPPESSQVMRSEEQRLDNILDKLRRTSARVVVIFSPPELS
T1R2_C_familiaris	LLMDFLATGDICTAFQETLPEPFDQVVTWERQRLAIVGKIQOSSARVVVIFSPDLI
T1R2_B_taurus	IFGQRLAHGDICTAFQETLPEPQNQMTPEQDERLEAIVGKIQOSTARVVVIFSPPELA
T1R2_H_sapiens	LLGERVARRDICTAFQETLPEPQNQMTSEERQLVTIVDKLQOSTARVVVIFSPDLT
LRRP_Bal-651_R_norv	LLSQRLTKTSDICTAFQEVLPPESSQVMRSEEQRLDNILDKLRRTSARVVVIFSPPELS
P5CDh_P_troglodytes	LLGERLARRDICTAFQETLPEPQNQMTSEERQLVTIVDKLQOSTARVVVIFSPDLS
T1R2_M_musculus	LHNFFREVLRWNETGFEVWIASWSWAIDPVLHNLTELRLHTGTFLGVTIQRVSIPIGFSQFRV
T1R2_R_norvegicus	LYSEFFHEVLRWNETGFEVWIASWSWAIDPVLHNLTELRLHTGTFLGVTIQRVSIPIGFSQFRV
T1R2_C_familiaris	LHNFFREVLRWNETGAVWIASWSWAIDPVLHNLTELRLHTGTFLGVTIQRVSIPIGFSQFRV
T1R2_B_taurus	LHNFFREVLRWNETGAVWIASWSWAIDPVLHNLTELRLHTGTFLGVTIQRVSIPIGFSQFRV
T1R2_H_sapiens	LYHFFNEVLRWNETGAVWIASWSWAIDPVLHNLTELRLHTGTFLGVTIQRVSIPIGFSQFRV
LRRP_Bal-651_R_norv	LYSEFFHEVLRWNETGFEVWIASWSWAIDPVLHNLTELRLHTGTFLGVTIQRVSIPIGFSQFRV
P5CDh_P_troglodytes	LYDEFFNEVLRWNETGAVWIASWSWAIDPVLHNLTELRLHTGTFLGVTIQRVSIPIGFSQFRV
T1R2_M_musculus	RHDKPEYPMPEPNTSLRRTTCNQDCDACLNTTKSFNNILLSGERVVYSVYSAVYAVAHALH
T1R2_R_norvegicus	RHDKPGYPPVNTNLRTTCNQDCDACLNTTKSFNNILLSGERVVYSVYSAVYAVAHALH
T1R2_C_familiaris	RRTPVRLPEPNTSLEATCNQECDTCCODTTAFNSILMLSGERVVYNSVYSAVYAVAHALH
T1R2_B_taurus	RRSQVGRPALNRSS--ANCNQECDTCLNTTESFNSILMLSGERVVYSVYSAVYAVAHALH
T1R2_H_sapiens	WGPQAGPPPLSRTSQSYTCNQECDNCLNATLSFNITLRLSGERVVYSVYSAVYAVAHALH
LRRP_Bal-651_R_norv	RHDKPGYPPVNTNLRTTCNQDCDACLNTTKSFNNILLSGERVVYSVYSAVYAVAHALH
P5CDh_P_troglodytes	WGPQAGPPPLSRTSQSYTCNQECDNCLNATLSFNITLRLSGERVVYSVYSAVYAVAHALH
T1R2_M_musculus	RLLEHCNQVRCRQIVVYPWQLLEIWKVNFETLLGNRLFFDQGGDMPMLLDIIQWQWDLSON
T1R2_R_norvegicus	RLLEGCNRVRCRQIVVYPWQLLEIWKVNFETLLGNRLFFDQGGDMPMLLDIIQWQWDLSON
T1R2_C_familiaris	SLLGCTQA-CSKRVVYPWQLLEIWKVNFETLLGNVFFGQGGDVLMPMEVIQWQWDLSON
T1R2_B_taurus	SLLEGCNQSGCRDQVYPWQLLEIWKVNFETLLGHQIFPNEQGDLSINLEIIVQWQWDLSON
T1R2_H_sapiens	SLLEGCNKSTCRVYPWQLLEIWKVNFETLLGHQIFPDPQGDVALHLEIIVQWQWDLSON
LRRP_Bal-651_R_norv	RLLEGCNRVRCRQIVVYPWQLLEIWKVNFETLLGNRLFFDQGGDMPMLLDIIQWQWDLSON
P5CDh_P_troglodytes	SLLEGCNNTCTCRVYPWQLLEIWKVNFETLLGHQIFPDPQGDVALHLEIIVQWQWDLSON

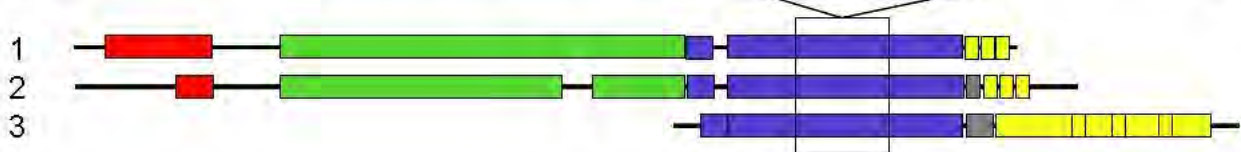


Fig.15. Allineamento delle sequenze proteiche della Ba1-651 di ratto e scimpanzee e il T1R2 di uomo, ratto, topo, cane e bovino. 1=LRRP Ba1-651 di ratto; 2=P5CDh di scimpanzee; 3=recettore del dolce T1R2 di mammifero. In bianco gli amminoacidi non omologi, in grigio quelli omologi e in nero quelli identici.

Un modello funzionale proponibile (Fig. 16), è quello che il sito catalitico attivo per il catabolismo della prolina dell'enzima P5CDh-T1R2, venga attivato da un cambio conformazionale della struttura proteica a seguito del legame di una molecola dolce nel dominio recettoriale dell'enzima P5CDh-T1R2, sequenza omologa alla regione extracellulare del T1R2, che è un recettore del gusto dolce.

L'attivazione dell'enzima P5CDh-T1R2, sembra giustificabile solo in caso di un'alta concentrazione di zuccheri liberi a livello cellulare e solo una bassa costante cinetica del sito di legame dello zucchero stesso permetterebbe, che in caso di alte concentrazioni di zuccheri, il dominio catalitico P5CDh venga reso accessibile al P5C (prodotto di catabolismo dell'enzima prolina ossidasi).

Approfondire la conoscenza di questo enzima potrebbe essere importante per capirne il significato biologico e per il suo possibile coinvolgimento nel trattamento dell'HPII e di patologie del fegato e nel trapianto di fegato stesso.

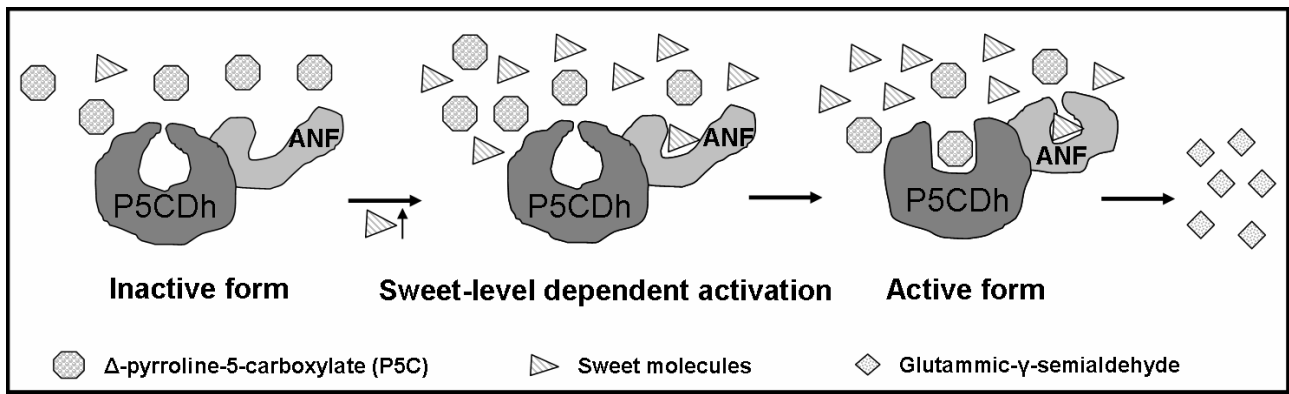


Fig.16. Modello per l'attivazione dell'enzima P5CDh-T1R2. A livelli normali di molecole dolci, l'enzima è inattivo a causa della bassa costante cinetica del sito di legame del dominio T1R2. Quando la concentrazione di molecole dolci aumenta nel fegato, l'enzima viene attivato, in quanto l'incremento di concentrazione si oppone alla costante cinetica molto bassa, aiutando nel legame della molecola dolce al sito recettoriale T1R2, inducendo un cambio conformazionale nella struttura del sito catalitico del dominio P5CDh che catabolizzerebbe così il P5C.

A questo fine, ho provato con degli esperimenti di RT-PCR a capire:

- se e in quali altri organi esiste questo enzima in condizioni che non danneggiano il fegato;
- se si presenti in tutti i casi di risposta a danni epatici o solo in alcuni casi.

Nel primo caso sono stati estratti gli RNA totali di vari organi di ratto normale (senza nessuna patologia evidente a carico del fegato), sono stati retro-trascritti e i cDNA ottenuti sono stati amplificati tramite PCR con primers specifici, disegnati uno forward ed uno reverse nella regione recettoriale del T1R2, uno forward ed uno reverse nel dominio P5CDh, ed uno forward nel dominio P5CDh ed uno reverse nel dominio T1R2, in modo da coprire con più combinazioni sia il P5CDh e il T1R2, sia l'enzima che li comprende entrambi, il P5CDh-T1R2. In figura 17, si può notare che solo l'enzima P5CDh è presente in tutti gli organi, incluso il fegato, mentre l'enzima P5CDh-T1R2 non è mai presente. I dati della PCR con primers uno nel dominio P5CDh ed uno nel dominio T1R2, non vengono mostrati per assenza di bande. Inoltre, come già visto, il T1R2 è presente nella papilla circumvallata, ma non nel fegato (Fig. 3.C).

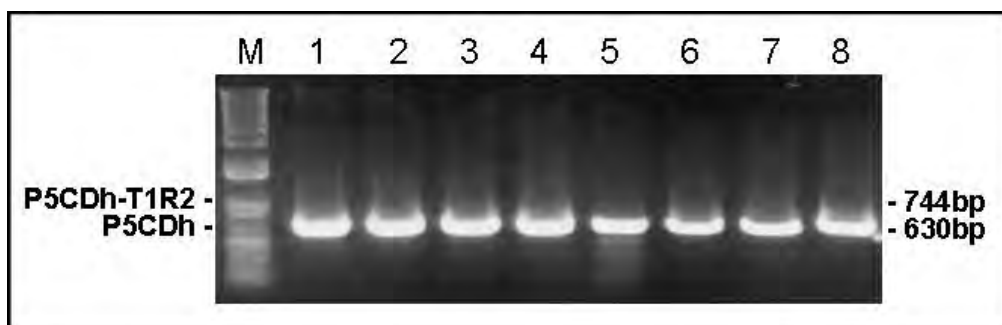


Fig.17. RT-PCR con primers disegnati nella sequenza del dominio P5CDh. I prodotti attesi per l'enzima costitutivo e il P5CDh-T1R2 sono di 630bp e 744bp, rispettivamente. La differenza è dovuta ad una sequenza di circa 110bp presente nell'enzima inducibile, ma non in quello costitutivo. I primers sono stati disegnati a monte e a valle di queste 110bp, in modo da poter amplificare allo stesso tempo il prodotto di PCR di entrambe i geni. M=1Kb DNA Plus ladder della Promega; 1=papilla circumvallata; 2=papilla foliata; 3=polmone; 4=fegato prelevato a tempo 0; 5=fegato prelevato dopo 72 ore; 6=rene; 7=milza; 8=cuore.

Nel secondo caso gli esperimenti sono stati fatti sia su ratto, che su uomo:

- sono state prelevate parti di fegato di ratto a tempo 0 e a 72 ore, dopo un'epatectomia parziale, che comporti la rimozione di 2/3 del fegato (193). Con gli stessi primers dell'esperimento precedente, sono state fatte una serie di PCR (Fig. 18), che dimostrano la presenza concomitante del P5CDh-T1R2 e del P5CDh nel fegato prelevato dopo 72 ore, rispetto alla presenza del solo enzima P5CDh nel fegato prelevato a tempo 0 e negli altri organi considerati.

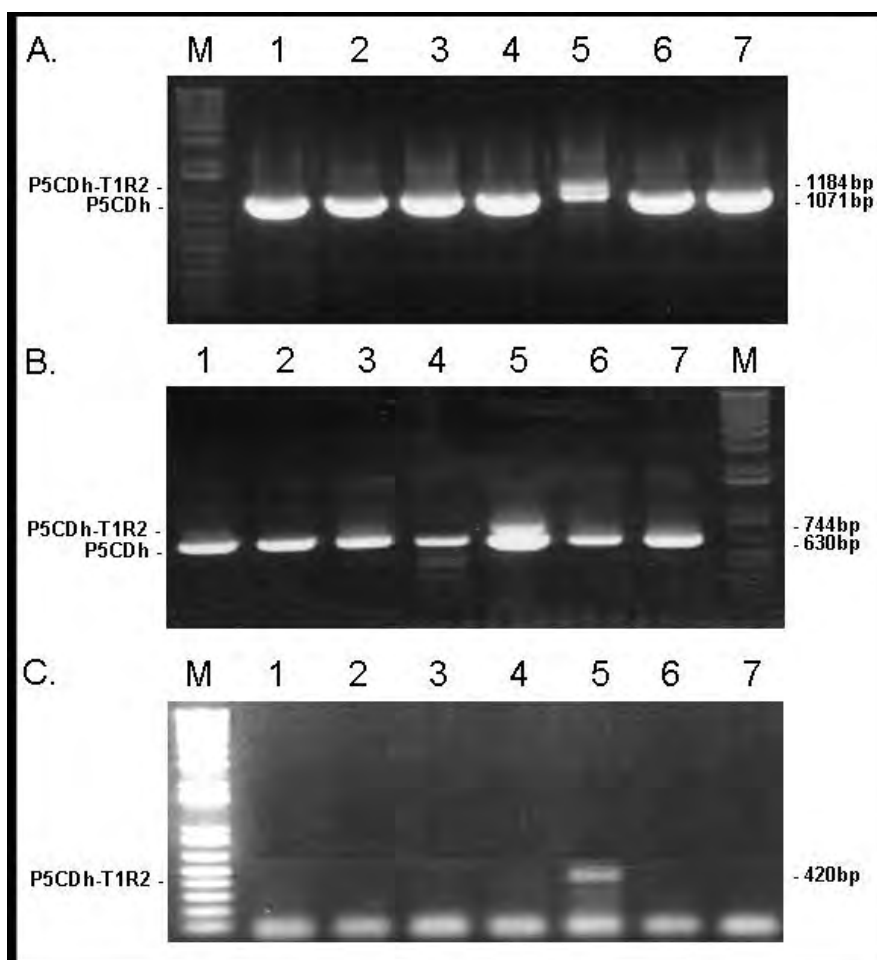


Fig.18. RT-PCR con primers disegnati nella sequenza del dominio P5CDh (A. e B.) e un primers disegnati uno nel dominio P5CDh e uno nel dominio recettoriale del T1R2 (C.). I prodotti attesi per l'enzima costitutivo e il P5CDh-T1R2 sono di 1184bp e 1071bp per la prima amplificazione (A.) e di 630bp e 744bp per la nested PCR fatta usando come template i prodotti di PCR della prima amplificazione (B.), rispettivamente. Il prodotto per l'enzima P5CDh-T1R2 è di 420bp dopo nested PCR di una prima amplificazione, della quale non viene mostrata la foto. M=1Kb DNA Plus ladder della Promega; 1=papilla circumvallata; 2=polmone; 3=rene; 4=fegato prelevato a tempo 0; 5=fegato prelevato dopo 72 ore; 6=milza; 7=cuore.

Inoltre, è stato dimostrato che i cDNA della papilla circumvallata e del fegato prelevato a 72 ore dall'epatectomia, davano entrambi una banda specifica, se si usavano due primers disegnati nel dominio recettoriale del T1R2 (Fig. 19); mentre, se venivano usati due primers disegnati uno nel dominio P5CDh e l'altro nel dominio recettoriale del T1R2 o uno nel

dominio recettoriale e l'altro nel dominio transmembrana del T1R2, si otteneva l'amplificazione solo nel fegato o nella papilla, rispettivamente.

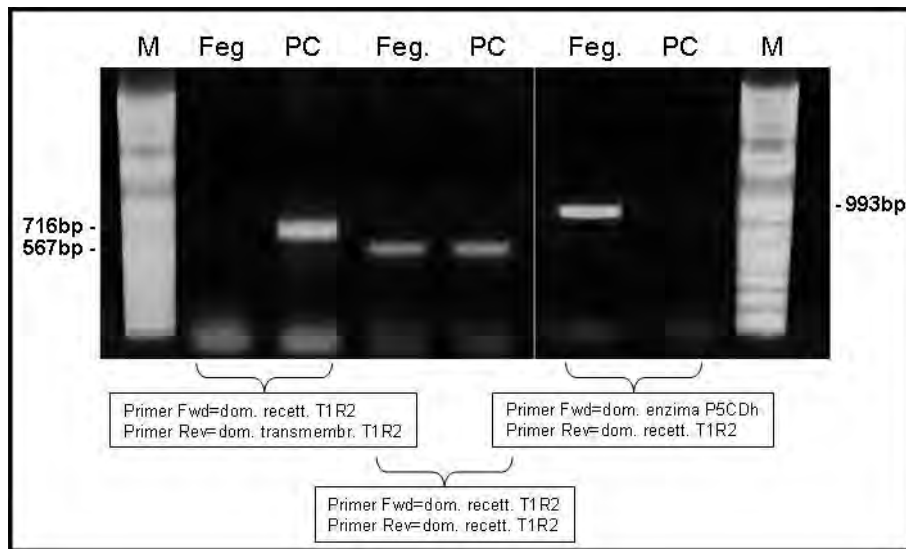


Fig.19. RT-PCR con dei primers disegnati uno nella sequenza del dominio recettoriale e l'altro nel dominio transmembrana del T1R2 (PCR 1), con dei primers disegnati tutti e due nel dominio recettoriale del T1R2 (PCR 2), e dei primers disegnati uno nel dominio P5CDh della LRRP Ba1-651 e l'altro nel dominio recettoriale del T1R2 (PCR 3). Il prodotto della PCR 1 è di 716bp, della PCR 2 è di 567bp e della PCR 3 è di 993bp. M=1Kb DNA Plus ladder della Promega; Feg.=fegato prelevato dopo 72 ore; PC =papilla circumvallata.

- Sono state prelevate parti di un fegato umano con metastasi avanzata causata da carcinoma del colon. È stato estratto l'RNA totale da fegato lontano dalla metastasi, vicino alla metastasi, dal tessuto che avvolge la metastasi e dalla metastasi stessa e ne sono stati prodotti i cDNA.

Inoltre, sono stati utilizzati i cDNA ottenuti dall'RNA totale di due linee cellulari di epatocarcinoma, di una linea cellulare di carcinoma del pancreas, di cellule embrionali di rene e di tessuto del miometrio uterino, che mi sono stati donati da Andrea Mafficini, che svolge il suo dottorato di ricerca nel laboratorio del Prof. Claudio Sorio, del Dip. di Patologia, Sez. di Patologia generale, Univ. di Verona. Sono stati usati primers specifici disegnati sulla sequenza umana omologa alla LRRP Ba1-651 di ratto, considerando il dominio della deidrogenasi, sia del gene costitutivo che del gene inducibile P5CDh-T1R2.

Come si può vedere dalla figura 20, viene amplificata solo la banda specifica dell'enzima P5CDh in tutti i cDNA considerati, ad esclusione di una delle due linee di epatocarcinoma, il cui cDNA non aveva amplificato nemmeno usando i primers per il gene di controllo GAPDH. Se ne deduce che nel caso della metastasi, non venga prodotto l'enzima inducibile P5CDh-T1R2 a supporto di quello costitutivo.

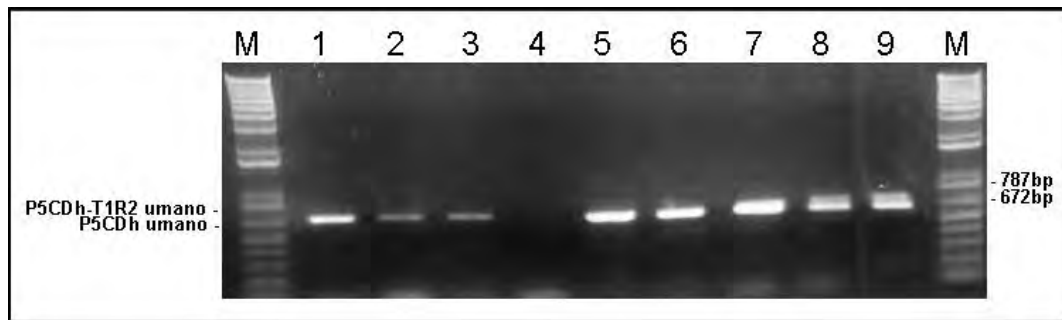


Fig.20. RT-PCR con primers disegnati nella sequenza del dominio P5CDh umano. I prodotti attesi per l'enzima costitutivo e il P5CDh-T1R2 umani sono di 672bp e 787bp, rispettivamente. La differenza è dovuta, come nel caso del ratto, ad una sequenza di circa 110bp presente nell'enzima inducibile, ma non in quello costitutivo. M=1Kb DNA Plus ladder della Promega; 1=miometrio uterino; 2=metastasi; 3=linea di epatocarcinoma n.1; 4=linea di epatocarcinoma n.2; 5=tessuto di fegato che avvolge la metastasi; 6=fegato a 1-2cm dalla metastasi; 7=fegato normale lontano dalla metastasi; 8=cellule embrionali di rene; 9=linea cellulare di carcinoma del pancreas.

Tutti questi esperimenti nel loro insieme dimostrano:

- che un'enzima P5CDh esista in tutti i tessuti di ratto e uomo considerati, concetto probabilmente estendibile a tutti i mammiferi amniotici vista l'ortologia esistente;
- che nel caso di metastasi, probabilmente, non venga mai prodotto l'enzima P5CDh-T1R2, in quanto la metastasi non comporta la liberazione di zuccheri in grado di indurre la produzione, ma sia solo presente l'enzima P5CDh;
- che nel caso di rigenerazione epatica a seguito di epatectomia parziale, i due enzimi coesistano e che il P5CDh-T1R2 compaia almeno dopo 72 ore dall'evento traumatico.

Ulteriori esperimenti sarebbero utili per dimostrare se solamente la rigenerazione epatica induca la produzione di questo enzima o se anche in risposta a patologie e danno al fegato di altro tipo se ne indurrebbe la comparsa.

6.4. Feromoni batterici per il Quorum Sensing (AHL - acyl homoserine lactones) provocano stati infiammatori e apoptosi dell'epitelio delle vie respiratorie di ratto

Gli acyl homoserine lactones (AHLs) sono molecole per il signaling intracellulare usate dai batteri gram negativi per la strategia del "quorum sensing", che controlla l'espressione genica e provoca un cambiamento del batterio dallo stato di saprofita a quello di patogeno quando il livello percepito dai batteri di molecole di AHL raggiunge appunto un certo "quorum".

Nell'esperimento che mi sono proposto di fare, sono stati somministrati *in vivo*, tramite un'iniezione direttamente in trachea, tre diversi AHLs con catena acilica rispettivamente di 4, 8 e 12 carboni, chiamati N-butyryl-HL (C4-HL), N-octanoyl-HL (C8-HL) e N-dodecanoyl-HL (C12-HL). In questo modo, ho studiato gli effetti precoci della somministrazione di AHLs nelle vie aeree di ratto per testare l'ipotesi che, oltre alla loro azione su batteri conspecifici, gli AHLs agiscano sulle cellule delle vie aeree modificandone i meccanismi secretori, importanti per la difesa della mucosa,

tramite un'azione infiammatoria diretta che possa scatenare morte cellulare per apoptosi, modificando i pathways di trasduzione dei segnali intracellulari.

Questi esperimenti fanno parte di un progetto più grande affrontato da quasi tutti i componenti del laboratorio di cui faccio parte e mentre darò un certo risalto ai risultati ottenuti con la metodologia dei microarrays da me utilizzata, verrà dato solo un accenno ai risultati che altre persone hanno fornito nel corso del tempo; tutto questo perché l'insieme degli esperimenti darà un quadro molto più completo della situazione che si viene a creare nelle vie aeree quando gli AHL vengono inniettati. Sono stati quindi fatti oltre ai microarrays anche esperimenti di istologia, di immunocitochimica, di "magnetical resonance imaging" (MRI) farmacologico e di microscopia ultrastrutturale.

Dopo aver inniettato le soluzioni di ogni AHL in esame e una soluzione di salina (0.8% NaCl), usata per dissolvere gli AHLs, sono stati svolti immediatamente gli esperimenti *in vivo* di MRI farmacologico per vedere la possibile secrezione dell'epitelio delle vie aeree.

Dopo aver sacrificato i tre ratti trattati e quello di controllo, sono state prelevate la laringe e la trachea per vedere con esperimenti di immunocitochimica, microarrays, istologia e microscopia ultrastrutturale, che effetti provocavano le molecole batteriche. In particolare per i microarrays, l'RNA veniva estratto dalle trachee trattate e di controllo e utilizzato per caratterizzare i pathways molecolari coinvolti dal trattamento stesso.

Le membrane da microarray erano costituite da sopt di sequenze oligonucleotidiche di geni che fanno parte di pathways di citochine e recettori infiammatori, di signaling dei recettori Toll-like, di trasduzione del segnale e di signaling NFkB di apoptosi.

Più precisamente sono stati utilizzati le seguenti membrane della SuperArray (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD, USA):

- Oligo GEMatrix Rat Inflammatory Cytokines & Receptors, numero di catalogo ORN-011 con 112 geni, 2 bianchi, 6 controlli negativi, 8 controlli positivi;
- Oligo GEMatrix Rat Toll-like Receptor Signaling Pathway, numero di catalogo ORN-018 con 112 geni, 2 bianchi, 4 controlli negativi, 8 controlli positivi;
- Oligo GEMatrix Rat Signal Transduction PathwayFinder, numero di catalogo ORN-014.2 con 128 geni, 2 bianchi, 4 controlli negativi, 8 controlli positivi;
- Oligo GEMatrix Rat NFkB Signaling Pathway, numero di catalogo ORN-025 con 128 geni, 2 bianchi, 4 controlli negativi, 8 controlli positivi.

In figura 21 sono evidenti una serie di geni up-regolati e down-regolati indotti dal trattamento con C4-HL (Fig. 21.a.), C8-HL (Fig. 21.b.) e C12-HL (Fig. 21.c.) rispetto al controllo.

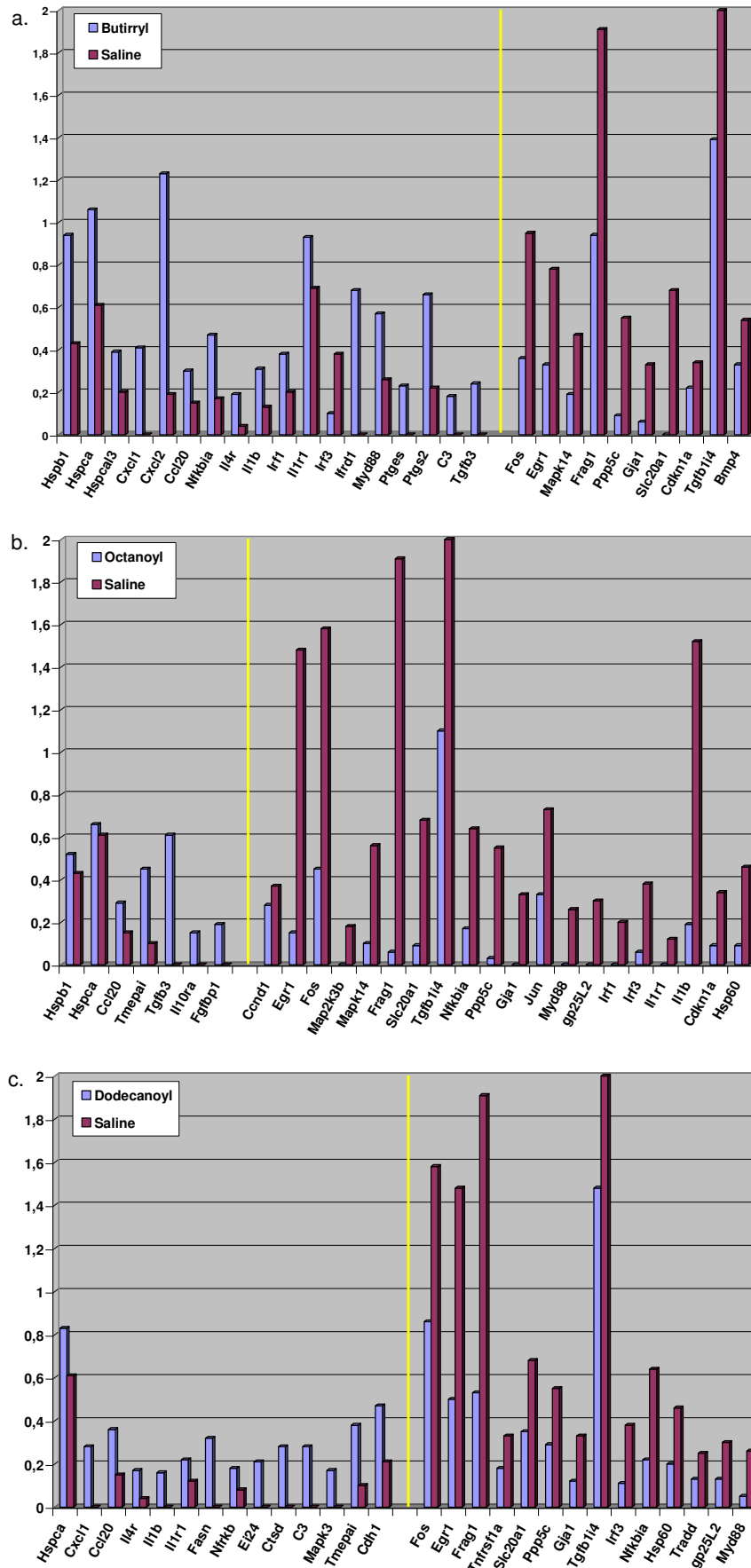


Fig.21. Rappresentazioni schematiche degli esperimenti di microarray: geni up-regolati (a sinistra della linea gialla) e down-regolati (a destra della linea gialla) a seguito del trattamento con C4-HL (a), C8-HL (b.) e C12-HL (c.) normalizzando i livelli di espressione ai tessuti trattati con soluzione salina.

Per quanto riguarda le trachee trattate con:

- il C4-HL (Fig. 21.a) → i geni up-regolati erano: Hspb1, Hspca, Hspcal3, Cxcl1, Cxcl2, Ccl20, Nfkbia, Il4r, Il1b, Irf1, Il1r1, Irf1, Ifrd1, Myd88, Ptges, Ptgs2, Jun, Tmpai, C3, Tgfb3; mentre quelli down-regolati erano: Fos, Egr1, Mapk14, Frag1, Ppp5c, Gja1, Slc20a1, Cdkn1a, Tgfb1i4, Bmp4.
- il C8-HL (Fig 21.b) → i geni up-regolati erano: Ccl20, Tmpai, Tgfb3, Il10ra, Fgfbp1; mentre quelli down-regolati erano: Ccnd1, Egr1, Fos, Map2k3b, Mapk14, Frag1, Slc20a1, Tgfb1i4, Nfkbia, Ppp5c, Gja1, Jun, Myd88, gp2512, Irf1, Irf3, Il1r1, Il1b, Cdkn1a, Hsp60.
- il C12-HL (Fig 21.c) → i geni up-regolati erano: Hspca, Cxcl1, Ccl20, Il4r, Il1b, Irf1, Fasn, Nfrkb, Ei24, Ctsd, C3, Mapk3, Tmpai, Cdh1; mentre quelli down-regolati erano: Fos, Egr1, Frag1, Tnfrsf1a, Slc20a1, Ppp5c, Gja1, Tgfb1i4, Irf3, Nfkbia, Hsp60, Tradd, gp25L2, Myd88.

I risultati ottenuti con i microarrays mostrano che le tre classi di AHLs interessano patterns differenti, ma hanno in comune la diminuzione di espressione dei geni precoci Fos ed Egr1.

Anche i risultati evidenziati dagli altri metodi sono consistenti e dimostrano che gli AHLs sono attivi nelle vie aeree. L'azione operata dagli AHLs sulle cellule epiteliali è rilevabile a pochi minuti dalla somministrazione e sembra essere correlata alla lunghezza della loro catena acilica:

1. Il più idrofilico di tutti, il C4-HL, ha un'azione visibilmente tossica sulle cellule epiteliali delle vie aeree sia a livello istologico che ultrastrutturale (spazi extracellulari dilatati, perdita di ciglia, riduzione del materiale secretorio e presenza di elementi pre-necrotici nell'epitelio). A livello molecolare la mucosa trattata con il C4-HL mostra un pattern che potrebbe essere correlato alla presenza delle lesioni riscontrata a livello istologico e ultrastrutturale. Ad esempio, viene osservata un'up-regolazione dei geni di proteine "heat shock", chemochine e interleuchine e una down-regolazione dei geni precoci Fos ed Egr1, in accordo con il blocco di alcuni meccanismi secretori osservato nell'immunocitochimica - in quanto le cellule epiteliali non sono più immunoreattive al CC10 (considerato un marcatore delle cellule secernenti), ma continuano ad esserlo al CFTR (connesso alla fibrosi cistica) e al CC26 (Fig. 22.1.), a dimostrazione che le lesioni non sono l'effetto di una distruzione generalizzata dell'epitelio - e del blocco del fenomeno di clearance mucociliare visibile con l'MRI farmacologico.

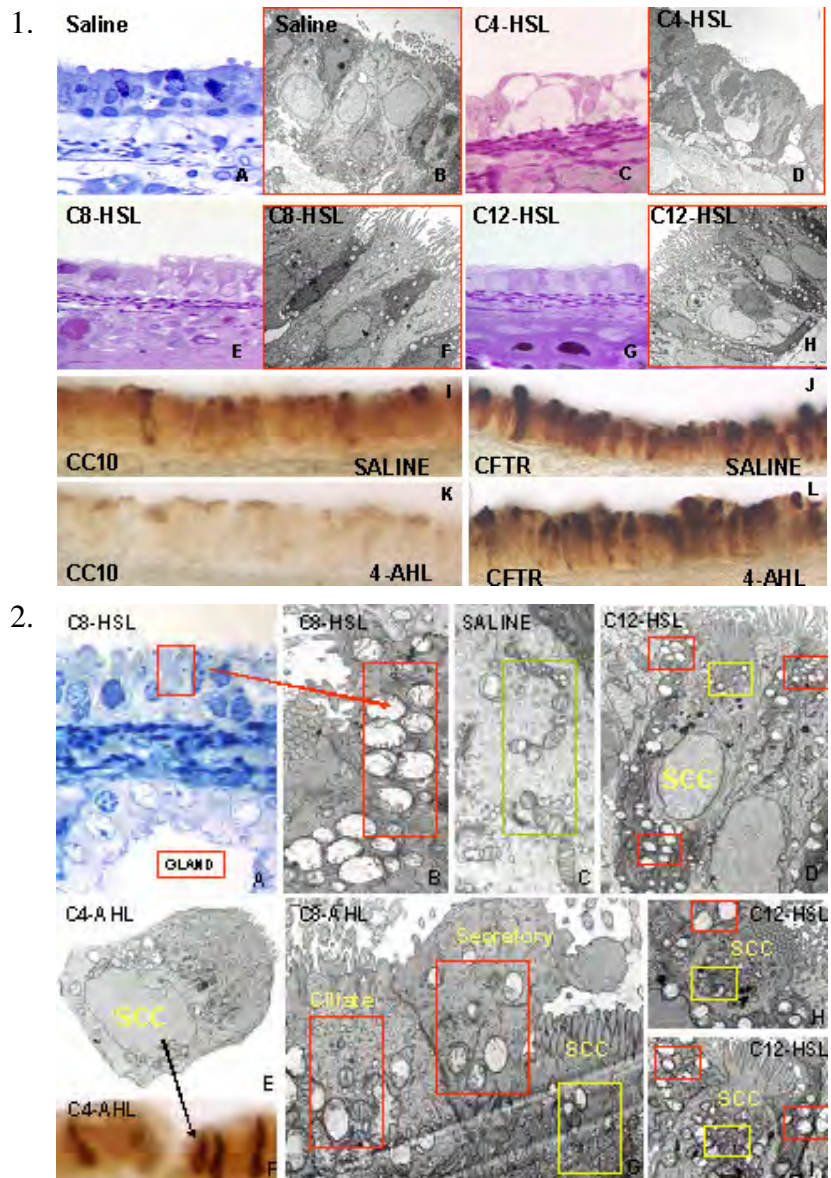


Fig.22. (1.) La mucosa della trachea trattata con salina risulta normale sia al microscopio a luce (A) che a quello elettronico (B). Una lesione molto evidente è presente nel tessuto trattato con C4-HL (C,D), una lesione lieve è presente nel tessuto trattato con C8-HL (E, F) e il tessuto trattato con C12-HL appare normale all'istologia (G), ma mostra una lieve alterazione al microscopio elettronico (H). Le immagini di immunocitochimica della mucosa della trachea trattata con salina (I,J) o C4-HL (K,L), mostrano una perdita di immunoreattività al CC10 nel tessuto trattato con C4-HL rispetto a quello di controllo con salina, mentre non cambia l'immunoreattività al CFTR. (2.) Caratterizzazione delle lesioni indotte dal trattamento con gli AHLs. Sezioni semifine incluse in resina (A) mostrano un citoplasma vescicolare dopo trattamento con il C8-HL. Al microscopio elettronico, l'apparenza vescicolare era dovuta a dei mitocondri rigonfiati (B), molto diversi dai mitocondri normali visibili dopo trattamento con salina (C). Le figure D-I mostrano che la lesione colpisce di norma le cellule ciliate e secretorie, ma non o solo molto lievemente le SCCs. Racchiusi in un riquadro rosso vengono illustrati i mitocondri rigonfi (A,C,G-I), in un riquadro verde i mitocondri normali in tessuti trattati con salina (C) ed in un riquadro giallo i mitocondri normali di SCCs (D, G-I). La figura F mostra la presenza di SCCs normalmente immunoreattive all' α -gustducin in tessuti trattati con il C4-HL.

2. Dopo trattamento con il C8-HL, all'istologia si notavano lesioni più lievi del caso precedente, aspetto confermato dai microarrays che non mostrano l'up-regolazione dei geni di proteine "heat shock", chemochine e interleuchine. Anche in questo caso, si ha la perdita di immunoreattività al CC10. Comunque, si notano delle lesioni a livello mitocondriale dopo

esame ultrastrutturale e un danneggiamento funzionale è visibile con l’MRI farmacologico. Sembra, comunque, che l’azione del C8-HL sia piuttosto simile a quella col C4-HL.

3. Dopo trattamento col più idrofobico, il C12-HL, all’istologia non si notano lesioni. In parallelo, l’up-regolazione dei geni di proteine “heat shock”, chemochine e interleuchine era molto lieve e limitata a singoli geni. Comunque, una risposta delle cellule epiteliali era visibile per le alterazioni mitocondriali e l’attivazione di alcuni pathways di signaling intracellulare coinvolti in particolare nel metabolismo dei lipidi, come il gene Fasn. Inoltre, il progressivo aumento della secrezione, osservato nell’MRI farmacologico, sembra essere l’aspetto peculiare della risposta precoce al trattamento con il C12-HL.

In ogni caso le tre classi di AHLs testati, hanno in comune da un punto di vista molecolare la down-regolazione di geni di risposta precoce Fos ed Egr1, attivati in risposta a eventi di stress.

Inoltre, a livello ultrastrutturale, l’azione dei tre AHLs sembra essere a carico dei mitocondri, in quanto a seguito del trattamento i mitocondri si dilatano sia nelle cellule ciliate che in quelle secernenti, mentre le SCCs appaiono più preservate (Fig. 22.2.). Entrambe questi aspetti potrebbero essere rilevanti, considerando che l’attivazione dei geni precoci è un passaggio importante della risposta cellulare allo stress e che l’integrità dei mitocondri è necessaria al mantenimento di un supporto energetico adeguato per le reazioni difensive (secrezione esocrina o movimenti ciliari).

All’esame in vivo tramite MRI farmacologico, dopo trattamento con il C4- e il C8-HL la secrezione non aumenta e il clearance mucociliare appare bloccato, invece il trattamento con il C12-HL provoca un aumento progressivo della secrezione tracheale, ma il clearance mucociliare viene mantenuto (Fig. 23).

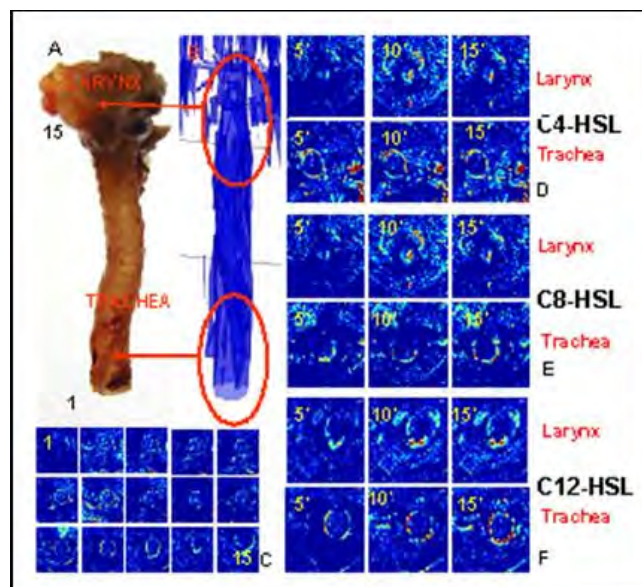


Fig.23. Laringe e trachea dopo la rimozione (A) e in una ricostruzione 3D (B). All’esame in vivo tramite MRI farmacologico, questi organi erano virtualmente sezionati in 15 piani trasversali (C) dal basso (trachea) verso l’alto (laringe): le sezioni erano numerate dall’1 al 15. Le figure D-F mostrano le sezioni rappresentative della laringe (sezione 14) e della trachea (sezione 12) in animali trattati con i tre AHL. E’ evidente l’aumento di secrezione causato dal trattamento con il C12-HL (in rosso), sia nella laringe che nella trachea.

In conclusione, gli AHLs inducono una risposta mucosale precoce correlata alla lunghezza della loro catena acilica e l'obiettivo della loro azione sembrano essere i mitocondri delle cellule ciliate e secernenti, anche se alcune cellule (come le SCCs) sembrano resistere alle lesioni da loro indotte. Tutti questi risultati dimostrano che l'azione degli AHLs non è limitata solo all'attivazione della patogenesi di batteri cospecifici, ma che loro modificano i meccanismi di difesa innata delle vie aeree. Nella risposta delle vie aeree agli AHLs, il dato più interessante sembra essere l'alta resistenza delle SCCs, che non mostrano l'alterazione mitocondriale osservabile negli elementi ciliati o secernenti, e potrebbero svolgere la loro azione come sentinelle attive contro agenti irritanti (prodotti anche dai batteri) (192).

Quindi le SCCs potrebbero avere un ruolo nelle infezioni batteriche, visto che l'analisi ultrastrutturale dimostra che vengono attivate dagli AHLs, e considerando la capacità chemosensoriale delle SCCs delle vie aeree (105, 180), sembra probabile che il loro ruolo rientri nel meccanismo innato di difese che operano in presenza di "infochemicals" batterici.

7. Pubblicazioni scientifiche

7.1. Chemosensory System

- **Tizzano M**, Merigo F and Sbarbati A. “Evidence of solitary chemosensory cells in a large mammal: the diffuse chemosensory system in *Bos taurus* airways”. *J. Anat.*; 209(3): 333-337 (2006).
- Sbarbati A, Merigo F, Benati D, Bernardi P, **Tizzano M**, Fabene PF, Crescimanno C, Osculati F. “Axon-like processes in type III cells of taste organs”. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*; 288A(3): 276-279 (2006).
- Flavia Merigo, Donatella Benati, **Marco Tizzano**, Francesco Osculati, Andrea Sbarbati. “ α -Gustducin immunoreactivity in the airways”. *Cell Tissue Res*; 319: 211–219 (2005).
- Andrea Sbarbati, Flavia Merigo, Donatella Benati, **Marco Tizzano**, Paolo Bernardi and Francesco Osculati. “Laryngeal Chemosensory Clusters”. *Chem. Senses*; 29: 683–692 (2004).
- Andrea Sbarbati, Flavia Merigo, Donatella Benati, **Marco Tizzano**, Paolo Bernardi, Caterina Crescimanno, and Francesco Osculati. “Identification and Characterization of a Specific Sensory Epithelium in the Rat Larynx”. *The Journal of Comparative Neurology*; 475: 188-201 (2004).

7.2. Publicazioni correlate all’HPII, Liver regeneration e AHL di batteri gram negativi

- **Marco Tizzano** & Andrea Sbarbati. “Is rat LRRP Ba1-651 a Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase activated by changes in the concentration of sweet molecules?”. *Medical Hypotheses*; 68(4): 864-867 (2007).
- **Marco Tizzano** & Andrea Sbarbati. “Hormone fatty acid modifications: Gram negative bacteria and vertebrates demonstrate common structure and function (AHL vs Ghrelin)”. *Medical Hypotheses*; 67(3): 513-516 (2006).

7.3. Altre pubblicazioni

- Claudio Varotto, Paolo Pesaresi, Peter Jahns, Angela Lebnick, **Marco Tizzano**, Fabio Schiavon, Francesco Salamini, and Dario Leister. “Single and Double Knockouts of the Genes for Photosystem I Subunits G, K, and H of Arabidopsis. Effects on Photosystem I Composition, Photosynthetic Electron Flow, and State Transitions”. *Plant Physiology*; 129: 616–624 (2002).

8. Bibliografia

1. Gulbransen B.D. and Finger T.E. Solitary chemoreceptor cell proliferation in adult nasal epithelium. *Journal of Neurocytology*; 34: 117–122 (2005).
2. Schiffman SS. Taste and smell losses in normal aging and disease. *J. Am. Med. Assoc.*; 278: 1357-1362 (1997).
3. Chandrashekar, J. et al. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*; 444: 288-294 (2006).
4. Hoon, M.A. et al. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96, 541–551 (1999).
5. Bachmanov, A.A. et al. Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus. *Chem. Senses*; 26: 925–933 (2001).
6. Nelson, G. et al. Mammalian sweet taste receptors. *Cell*; 106: 381–390 (2001).
7. Nelson, G. et al. An amino-acid taste receptor. *Nature*; 416: 199–202 (2002).
8. Li, X. et al. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 99: 4692–4696 (2002).
9. Kitagawa, M. et al. Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 283: 236–242 (2001).
10. Max, M. et al. *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nature Genet.*; 28: 58–63 (2001).
11. Montmayeur, J.P. et al. A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nature Neurosci.*; 4: 492–498 (2001).
12. Sainz, E. et al. Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *J. Neurochem.*; 77: 896–903 (2001).
13. Zhao, G.Q. et al. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*; 115: 255–266 (2003).
14. Pin, J.P. & Acher, F. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*; 1: 297–317 (2002).
15. Kunishima, N. et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*; 407: 971–977 (2000).
16. Fuller, J.L. Single-locus control of saccharin preference in mice. *J. Hered.*; 65: 33–36 (1974).
17. Lush, I.E. The genetics of tasting in mice. VI. Saccharin, acesulfame, dulcin and sucrose. *Genet. Res.*; 53: 95–99 (1989).

18. Li, X. et al. High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (Sac) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (Gpr70) to mouse distal Chromosome 4. *Mamm. Genome*; 12: 13–16 (2001).
19. Ravi, K. Sweet proteins: Potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutrition Journal*; 4:5-10 (2005).
20. Danilova, V. et al. Gustatory responses of the hamster *Mesocricetus auratus* to various compounds considered sweet by humans. *J. Neurophysiol.*; 80: 2102–2112 (1998).
21. Xu, H. et al. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 101: 14258–14263 (2004).
22. Jiang, P. et al. Molecular mechanisms of sweet receptor function. *Chem. Senses*; 30 (Suppl.1): i17–i18 (2005).
23. Jiang, P. et al. The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *J. Biol. Chem.*; 279: 45068–45075 (2004).
24. Damak, S. et al. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science*; 301: 850–853 (2003).
25. Li, X. et al. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLoS Genet.*; 1: 27–35 (2005).
26. Iwasaki, K. et al. Gustatory effectiveness of amino acids in mice: behavioral and neurophysiological studies. *Physiol. Behav.*; 34: 531–542 (1985).
27. Iwasaki, K. & Sato, M.A. Taste preferences for amino acids in the house musk shrew, *Suncus murinus*. *Physiol. Behav.*; 28: 829–833 (1982).
28. Pritchard, T.C. & Scott, T.R. Amino acids as taste stimuli. I. Neural and behavioural attributes. *Brain Res.*; 253: 81–92 (1982).
29. Ikeda, K. New seasonings. *Chem. Senses*; 27: 847–849 (2002).
30. Yamaguchi, S. The synergistic taste effect of monosodium glutamate and disodium 5'-inosinate. *J. Food Sci.*; 32: 473–478 (1967).
31. Chaudhari, N. et al. A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat. Neurosci.*; 3: 113–119 (2000).
32. He, W. et al. Umami taste responses are mediated by alpha-transducin and alpha-gustducin. *J. Neurosci.*; 24: 7674–7680 (2004).
33. Ruiz, C.J. et al. Behavioral evidence for a role of alpha-gustducin in glutamate taste. *Chem. Senses*; 28: 573–579 (2003).
34. Yang, H. et al. An optimized method for in situ hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. *J. Histochem. Cytochem.*; 47: 431–446 (1999).
35. Adler, E. et al. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*; 100: 693–702 (2000).

36. Matsunami, H. et al. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*; 404: 601–604 (2000).
37. Lush, I.E. & Holland, G. The genetics of tasting in mice. V. Glycine and cycloheximide. *Genet. Res.*; 52: 207–212 (1988).
38. Reed, D.R. et al. Localization of a gene for bitter-taste perception to human chromosome 5p15. *Am. J. Hum. Genet.*; 64: 1478–1480 (1999).
39. Chandrashekar, J. et al. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*; 100: 703–711 (2000).
40. Bufe, B. et al. The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to β -glucopyranosides. *Nature Genet.*; 32: 397–401 (2002).
41. Pronin, A.N. et al. Identification of ligands for two human bitter T2R receptors. *Chem. Senses*; 29: 583–593 (2004).
42. Kuhn, C. et al. Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J. Neurosci.*; 24: 10260–10265 (2004).
43. Behrens, M. et al. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 319: 479–485 (2004).
44. Wooding, S. et al. Independent evolution of bitter-taste sensitivity in humans and chimpanzees. *Nature*; 440: 930–934 (2006).
45. Kim, U.K. et al. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*; 299: 1221–1225 (2003).
46. Mueller, K.L. et al. The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature*; 434: 225–229 (2005).
47. Shi, P. & Zhang, J. Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Mol. Biol. Evol.*; 23: 292–300 (2006).
48. Go, Y. et al. Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics*; 170: 313–326 (2005).
49. Zhang, Y. et al. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*; 112: 293–301 (2003).
50. Spector, A.C. & Kopka, S.L. Rats fail to discriminate quinine from denatonium: implications for the neural coding of bitter-tasting compounds. *J. Neurosci.*; 22: 1937–1941 (2002).
51. Heck, G.L. et al. Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science*; 223: 403–405 (1984).
52. Avenet, P. & Lindemann, B. Amiloride-blockable sodium currents in isolated taste receptor cells. *J. Membr. Biol.*; 105: 245–255 (1988).

53. Stevens, D.R. et al. Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature*; 413: 631–635 (2001).
54. Ugawa, S. et al. Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature*; 395: 555–556 (1998).
55. Lin, W. et al. Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels. *J. Neurophysiol.*; 92: 2909–2919 (2004).
56. Richter, T.A. et al. Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds. *J. Neurophysiol.*; 92: 1928–1936 (2004).
57. Waldmann, R. et al. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*; 386: 173–177 (1997).
58. Lyall, V. et al. Basolateral Na⁺–H⁺ exchanger-1 in rat taste receptor cells is involved in neural adaptation to acidic stimuli. *J. Physiol. (Lond.)*; 556: 159–173 (2004).
59. Cummings, T.A. & Kinnamon, S.C. Apical K⁺ channels in *Necturus* taste cells. Modulation by intracellular factors and taste stimuli. *J. Gen. Physiol.*; 99: 591–613 (1992).
60. Huang, A.L. et al. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*; 442: 934–938 (2006).
61. Lopezjimenez, N. D. et al. Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd113 and Pkd211, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *J. Neurochem.*; 98: 68–77 (2006).
62. Ishimaru, Y. et al. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 103: 12569–12574 (2006).
63. Lahiri, S. & Forster, R. E. CO₂/H⁺ sensing: peripheral and central chemoreception. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*; 35: 1413–1435 (2003).
64. Vigh, B. et al. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol. Histopathol.*; 19: 607–628 (2004).
65. Chaudhari, N. & Roper, S.D. Molecular and physiological evidence for glutamate (umami) taste transduction via a G protein-coupled receptor. *Ann. NY Acad. Sci.*; 855: 398–406 (1998).
66. Kinnamon, S.C. A plethora of taste receptors. *Neuron*; 25: 507–510 (2000).
67. Smith, D.V. & Margolskee, R.F. Making sense of taste. *Sci. Am.*; 284: 32–39 (2001).
68. Brunet, L.J. et al. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron*; 17: 681–693 (1996).
69. Damak, S. et al. *Trpm5* null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem. Senses*; 31: 253–264 (2006).

70. McLaughlin, S.K. et al. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*; 357: 563–569 (1992).
71. Kusakabe, Y. et al. Comprehensive study on G protein α -subunits in taste bud cells, with special reference to the occurrence of G α i2 as a major G α species. *Chem. Senses*; 25: 525–531 (2000).
72. Huang, L. et al. G γ 13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nature Neurosci.*; 2: 1055–1062 (1999).
73. Rossler, P. et al. Identification of a phospholipase C β subtype in rat taste cells. *Eur. J. Cell Biol.*; 77: 253–261 (1998).
74. Perez, C.A. et al. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nature Neurosci.*; 5: 1169–1176 (2002).
75. Wong, G.T. et al. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*; 381: 796–800 (1996).
76. Ruiz, C.J. et al. Behavioral evidence for a role of α -gustducin in glutamate taste. *Chem. Senses*; 28: 573–579 (2003).
77. Dotson, C.D. et al. PLC β 2-independent behavioral avoidance of prototypical bitter-tasting ligands. *Chem. Senses* ; 30: 593–600 (2005).
78. Varkevisser, B. & Kinnamon, S.C. Sweet taste transduction in hamster: role of protein kinases. *J. Neurophysiol.*; 83: 2526–2532 (2000).
79. Rosenzweig, S. et al. Possible novel mechanism for bitter taste mediated through cGMP. *J. Neurophysiol.*; 81: 1661–1665 (1999).
80. Bernhardt, S.J. et al. Changes in IP3 and cytosolic Ca $^{2+}$ in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *J. Physiol. (Lond.)*; 490: 325–336 (1996).
81. Striem, B.J. et al. Sweet tastants stimulate adenylate cyclase coupled to GTP-binding protein in rat tongue membranes. *Biochem. J.*; 260: 121–126 (1989).
82. Gilbertson, T.A. & Boughter, J.D. Taste transduction: appetizing times in gustation. *Neuroreport*; 14: 905–911 (2003).
83. Avenet, P. et al. Transduction in taste receptor cells requires cAMP-dependent protein kinase. *Nature*; 331: 351–354 (1988).
84. Talavera, K. et al. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature*; 438: 1022–1025 (2005).
85. Caicedo, A. et al. Individual mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. *J. Physiol. (Lond.)*; 544: 501–509 (2002).

86. Gilbertson, T.A. et al. Distribution of gustatory sensitivities in rat taste cells: whole-cell responses to apical chemical stimulation. *J. Neurosci.*; 21: 4931–4941 (2001).
87. Sato, T. & Beidler, L.M. Broad tuning of rat taste cells for four basic taste stimuli. *Chem. Senses*; 22: 287–293 (1997).
88. Richter, T.A. et al. Sour taste stimuli evoke Ca²⁺ and pH responses in mouse taste cells. *J. Physiol. (Lond.)*; 547: 475–483 (2003).
89. Redfern, C.H. et al. Conditional expression and signaling of a specifically designed Gicoupled receptor in transgenic mice. *Nature Biotechnol.*; 17: 165–169 (1999).
90. Finger, T.E. et al. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*; 310: 1495–1499 (2005).
91. Sugita, M. & Shiba, Y. Genetic tracing shows segregation of taste neuronal circuitries for bitter and sweet. *Science*; 309: 781–785 (2005).
92. Zou, Z. et al. Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature*; 414: 173–179 (2001).
93. Kuze, B. et al. Segment-specific branching patterns of single vestibulospinal tract axons arising from the lateral vestibular nucleus in the cat: A PHA-L tracing study. *J. Comp. Neurol.*; 414: 80–96 (1999).
94. Rolls, E.T. *The Brain and Emotion* (Oxford Univ. Press, USA, 2000).
95. Katz, D.B. et al. Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *J. Neurosci.*; 21: 4478–4489 (2001).
96. Di Lorenzo, P.M. The neural code for taste in the brain stem: response profiles. *Physiol. Behav.*; 69: 87–96 (2000).
97. Spector, A.C. & Travers, S.P. The representation of taste quality in the mammalian nervous system. *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.*; 4: 143–191 (2005).
98. Zhang, J. et al. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*; 3: 906–918 (2002).
99. Choi, G.B. et al. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*; 46: 647–660 (2005).
100. Miesenbock, G. & Kevrekidis, I.G. Optical imaging and control of genetically designated neurons in functioning circuits. *Annu. Rev. Neurosci.*; 28: 533–563 (2005).
101. Gosgnach, S. et al. V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature*; 440: 215–219 (2006).
102. Gogos, J.A. et al. Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map. *Cell*; 103: 609–620 (2000).

103. Brecht, M. et al. Novel approaches to monitor and manipulate single neurons in vivo. *J. Neurosci.*; 24: 9223–9227 (2004).
104. Witt, M. et al. Morphology of the peripheral taste system. In: Doty, R.L. (Ed.), *Handbook of Olfaction and Gustation*. Marcel Dekker, New York; pp. 651–677 (2003).
105. Finger, T.E. et al. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 100: 8981–8986 (2003).
106. Sbarbati, A., Merigo, F., Benati, D., **Tizzano, M.**, et al. Identification and characterization of a specific sensory epithelium in the rat larynx. *J. Comp. Neurol.*; 475: 188–201 (2004).
107. Sbarbati, A., Merigo, F., Benati, D., **Tizzano, M.**, et al. Laryngeal chemosensory clusters. *Chem. Senses*; 29: 683–692 (2004).
108. Rossler, P. et al. Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells. *Eur. J. Cell. Biol.*; 77: 253–261 (1998).
109. Clapp, T.R. et al. Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neurosci.*; 2: 6 (2001).
110. Perez, C.A. et al. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat. Neurosci.*; 5: 1169–1176 (2002).
111. Margolskee, R.F., 2002. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J. Biol. Chem.*; 277: 1–4.
112. Perez, C.A. et al. Making sense with TRP channels: store-operated calcium entry and the ion channel Trpm5 in taste receptor cells. *Cell Calcium*; 33: 541–549 (2003).
113. Dyer, J. et al. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem. Soc. Trans.*; 33: 302–305 (2005).
114. Bezençon, C. et al. Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem Senses.*; 32(1): 41-9 (2007).
115. Takami, S. et al. Human taste cells express the G protein α -gustducin and neuron-specific enolase. *Mol. Brain Res.*; 22: 193–203 (1994).
116. **Tizzano, M.** et al. Evidence of solitary chemosensory cells in a large mammal: the diffuse chemosensory system in *Bos taurus* airways. *J Anat.*; 209(3): 333-337 (2006).
117. Boughter, J.D. et al. Differential expression of α -gustducin in taste bud populations of the rat and hamster. *J. Neurosci.*; 17: 2852–2858 (1997).
118. Höfer, D. et al. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of α -gustducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; 93 : 6631–6634 (1996).
119. Wu, S.V. et al. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 99: 2392–2397 (2002).

120. Wu, S.V. et al. Genomic organization, expression, and function of bitter taste receptors (T2R) in mouse and rat. *Physiol Genomics*; 22(2): 139-149 (2005).
121. Jarvi, O.H. & Keyrilainen, O. On the cellular structures of the epithelial invasions in the glandular stomach of mice caused by intramural application of 20-methylcholanthrene. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A*; 111: 72 (1955).
122. Sato, A. et al. Tuft cells in the main excretory duct of the rat submandibular gland. *Eur. J. Morphol.*; 38: 227–231 (2000).
123. Nabeyama, A. & Leblond, C.P. “Caveolated cells” characterized by deep surface invaginations and abundant filaments in mouse gastrointestinal epithelia. *Am. J. Anat.*; 140: 147–165 (1974).
124. Hammond, J.B. & LaDeur, L. Fibrillovesicular cells in the fundic glands of the canine stomach: evidence for a new cell type. *Anat. Rec.*; 161: 393–411 (1968).
125. Wattel, W. et al. Ultrastructural and carbohydrate histochemical studies on the differentiation and renewal of mucous cells in the rat gastric fundus. *Cell Tissue Res.*; 176: 445–462 (1977).
126. Wattel, W. et al. Renewal of mouse gastric mucous cells following fast neutron irradiation. An ultrastructural and carbohydrate histochemical study. *Cell Tissue Res.*; 183: 303–318 (1977).
127. Wattel, W. & Geuze, J.J. The cells of the rat gastric groove and cardia. An ultrastructural and carbohydrate histochemical study, with special reference to the fibrillovesicular cells. *Cell Tissue Res.*; 186: 375–391 (1978).
128. Silva, D.G. The fine structure of multivesicular cells with large microvilli in the epithelium of the mouse colon. *J. Ultrastruct. Res.*; 16: 693–705 (1966).
129. Johnson, F.R. & Young, B.A. Undifferentiated cells in gastric mucosa. *J. Anat.*; 102: 541–551 (1968).
130. Ferguson, D.J. Structure of antral gastric mucosa. *Surgery*; 65: 280–291 (1969).
131. Riches, D.J. Ultrastructural observations on the common bile duct epithelium of the rat. *J. Anat.*; 111: 157–170 (1972).
132. Höfer, D. & Drenckhahn, D. Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells. *Histochem. Cell Biol.*; 105: 405–412 (1996).
133. Höfer, D. & Drenckhahn, D. Identification of the taste cell G-protein, alpha-gustducin, in brush cells of the rat pancreatic duct system. *Histochem. Cell Biol.*; 110: 303–309 (1998).
134. Höfer, D. et al. From cytoskeleton to polarity and chemoreception in the gut epithelium. *Ann. NY Acad. Sci.*; 859: 75–84 (1998).

135. Höfer, D. et al. Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *J. Neurocytol.*; 29: 147–156 (2000).
136. Sbarbati, A. et al. Solitary chemosensory cells in the developing chemoreceptorial epithelium of the vallate papilla. *J. Neurocytol.*; 27: 631–635 (1998).
137. Kotrschal, K. Solitary chemosensory cells-taste, common chemical sense or what? *Rev. Fish. Biol. Fish.*; 1: 3–22 (1991).
138. Kotrschal, K. Solitary chemosensory cells: why do primary aquatic vertebrates need another taste system? *Trends Ecol. Evol.*; 11: 110–113 (1996).
139. Whitear, M. Solitary chemoreceptor cells. In: Hara, T.J. (Ed.), *Chemoreception in Fishes*. Chapman & Hall, New York; pp. 103–125 (1992).
140. Kotrschal, K. et al. Spinal and facial innervation of the skin in the gadid fish *Ciliata mustela* (Teleostei). *J. Comp. Neurol.*; 331: 407–417 (1993).
141. Whitear, M. & Kotrschal, K. The chemosensory anterior dorsal fin in rocklings (*Gaidropsarus* and *Ciliata*, Teleostei, Gadidae): activity, fine structure and innervation. *J. Zool.*; 216: 339–366 (1988).
142. Kotrschal, K. & Whitear, M. Chemosensory anterior dorsal fin in rocklings (*Gaidropsarus* and *Ciliata*, Teleostei, Gadidae): somatotopic representation of the ramus recurrens facialis as revealed by transganglionic transport of HRP. *J. Comp. Neurol.*; 268: 109–120 (1988).
143. Peters, R.C. et al. Solitary chemoreceptor cells of *Ciliata mustela* (Gadidae, Teleostei) are tuned to mucoid stimuli. *Chem. Senses*; 16: 31–42 (1991).
144. Silver, W.L. & Finger, T.E. Electrophysiological examination of a nonolfactory, non-gustatory chemosense in the sea robin, *Prionotus carolinus*. *J. Comp. Physiol.*; A154: 167–174 (1984).
145. Nagai, T. et al. Desert toads discriminate salt taste with chemosensory function of the ventral skin. *J. Comp. Neurol.*; 408: 125–136 (1999).
146. Koyama, H. et al. The spinal nerves innervate putative chemosensory cells in the ventral skin of desert toads, *Bufo alvarius*. *Cell Tissue Res.*; 304: 185–192 (2001).
147. Sbarbati, A. et al. Characterisation of different microenvironments at the surface of the frog's taste organ. *Am. J. Anat.*; 188: 199–211 (1990).
148. Osculati, F. & Sbarbati, A. The frog taste disc: a prototype of the vertebrate gustatory organ. *Prog. Neurobiol.*; 46: 351–399 (1995).
149. Whitear, M. Cell specialization and sensory function in fish epidermis. *J. Zool.*; 163: 237–264 (1971).
150. Whitear, M. & Moate, R.M. Chemosensory cells in the oral epithelium of *Raja clavata* (chondrichthyes). *J. Zool.*; 232: 295–312 (1994).

151. Hansen, A. et al. Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Dyn.*; 223: 483–496 (2002).
152. Finger, T.E. Evolution of taste and solitary chemoreceptor cell systems. *Brain Behav. Evol.*; 50: 234–243 (1997).
153. Sbarbati, A. et al. Alpha-gustducin-immunoreactive solitary chemosensory cells in the developing chemoreceptorial epithelium of the rat vallate papilla. *Chem. Senses*; 24: 469–472 (1999).
154. El-Sharaby, A. et al. Development and maturation of taste buds of the palatal epithelium of the rat: histological and immunohistochemical study. *Anat. Rec.*; 263: 260–268 (2001).
155. El-Sharaby, A. et al. Differentiation of the lingual and palatal gustatory epithelium of the rat as revealed by immunohistochemistry of alpha-gustducin. *Arch. Histol. Cytol.*; 64: 401–409 (2001).
156. Hall, W.G. & Bryan, T.E. The ontogeny of feeding in rats. IV. Taste development as measured by intake and behavioral responses to oral infusions of sucrose and quinine. *J. Comp. Physiol. Psychol.*; 95: 240–251 (1981).
157. Bigiani, A. et al. Postnatal development of membrane excitability in taste cells of the mouse vallate papilla. *J. Neurosci.*; 22: 493–504 (2002).
158. Sbarbati, A. et al. Postnatal development of the intrinsic nervous system in the circumvallate papilla–von Ebner gland complex. *Histochem. J.*; 32: 483–488 (2000).
159. Sbarbati, A. et al. Ganglion cells and topographically related nerves in the vallate papilla–von Ebner gland complex. *J. Histochem. Cytochem.*; 50: 709–718 (2002).
160. Zancanaro, C. et al. Alpha-gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse. *Eur. J. Neurosci.*; 11: 4473–4475 (1999).
161. Merigo, F., Benati, D., **Tizzano, M.** et al. Alpha-Gustducin immunoreactivity in the airway. *Cell Tissue Res.*; 319: 211–219 (2005).
162. Merigo, F. et al. Secretory cells of the airway express molecules of the chemoreceptive cascade. *Cell Tissue Res.*; 327(2): 231–47 (2007).
163. Kotrschal, K. et al. Ontogeny of the solitary chemosensory cells in the zebrafish, *Danio rerio*. *Chem. Senses*; 22: 111–118 (1997).
164. Mombaerts, P. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*; 286: 707–711 (1999).
165. Derby, C.D. & Steullet, P. Why do animals have so many receptors? The role of multiple chemosensors in animal perception. *Biol. Bull.*; 200: 211–215 (2001).
166. Nishio, T. et al. Age-related expression of alpha-gustducin in the rat larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*; 115(5): 387–393. (2006).

167. Nishijima, K. & Atoji, Y. Taste buds and nerve fibers in the rat larynx: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Arch. Histol. Cytol.*; 67: 195–209 (2004).
168. Schemann, M. & Neunlist, M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.*; 16 (Suppl. 1): 55–59 (2004).
169. Kolter, R. Surfacing views of biofilm biology. *Trends Microbiol.*; 13: 1–2 (2005).
170. Bear C.E. et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*; 68: 809–818 (1992).
171. Cheng S.H. et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*; 63: 827–834 (1980).
172. Engelhardt J.F. et al. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet*; 2: 240–248 (1992).
173. Engelhardt J.F. et al. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest*; 93: 737–749 (1994).
174. Vasiliou V. & Pappa A. Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology*; 61(3): 192-198 (2000).
175. Hu CA. et al. Cloning, characterization, and expression of cDNAs encoding human delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *J Biol Chem.*; 271(16): 9795-9800 (1996).
176. Geraghty MT. et al. Mutations in the Delta1-pyrroline 5-carboxylate dehydrogenase gene cause type II hyperprolinemia. *Hum Mol Genet.*; 7(9): 1411-1415 (1998).
177. Onenli-Mungan N. et al. Type II hyperprolinemia: a case report. *Turk J Pediatr.*; 46(2): 167-169 (2004).
178. **Tizzano, M.** & Sbarbati, A. Is rat LRRP Ba1-651 a Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase activated by changes in the concentration of sweet molecules? *Med Hypotheses.*; 68(4): 864-867 (2007).
179. Sbarbati, A. & Osculati, F. Solitary chemosensory cells in mammals? *Cells Tissues Organs.*; 175(1): 51-55 (2003).
180. Sbarbati, A. & Osculati, F. The taste cell-related diffuse chemosensory system. *Prog Neurobiol.*; 75(4): 295-307 (2005).
181. Ming, D. Characterization and solubilization of bitter-responsive receptors that couple to gustducin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(15): 8933-8938 (1998).
182. Scala, G. et al. Morphostructural characteristics of the vallate papillae in *Bos taurus*. *Ital J Anat Embryol.*; 100 Suppl 1: 359-365 (1995).
183. Tabata, S. et al. Bovine Circumvallate Taste Buds: Taste Cell Structure and Immunoreactivity to α -Gustducin. *The Anatomical Record Part A*; 271A: 217-224 (2003).

184. Kazutoshi, N. & Yasuro, A. Taste buds and nerve fibers in the rat larynx: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Arch. Histol. Cytol.*; 67(3): 195–209 (2004).
185. McDowell E.M. et al. Ontogeny of endocrine cells in the respiratory system of Syrian golden hamsters. I. Larynx and trachea. *Cell Tissue Res*; 275: 143–156 (1994).
186. Yu, YC. et al. Neuroendocrine cells in the cat laryngeal epithelium. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*; 253: 287–293 (1996).
187. Yamamoto, Y. et al. Laryngeal endocrine cells: topographic distribution and adaptation to chronic hypercapnic hypoxia. *Histochem Cell Biol*; 114: 277–282 (2000).
188. Dickman, J.D. & Smith, D.V. Response properties of fibers in the hamster superior laryngeal nerve. *Brain Res.*; 450(1-2): 25-38 (1988).
189. Smith, D.V. & Hanamori, T. Organization of gustatory sensitivities in hamster superior laryngeal nerve fibers. *J Neurophysiol.*; 65(5): 1098-1114 (1991).
190. Schemann, M. & Neunlist, M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.*; 16(1): 55–59 (2004).
191. Ciecierski, R. et al. Liver regeneration. *Pol Merkuriusz Lek.*; 18(106): 473-477 (2005).
192. Finger, T.E. et al. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*; 310: 1495-1499 (2005).
193. Xu, C.S. et al. Expressed genes in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *World J. Gastroenterol.*; 11(19): 2932-2940 (2005).

9. Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Andrea Sbarbati e il Prof. Francesco Osculati per la grande possibilità offertami di svolgere il mio dottorato di ricerca presso la Sez. di Anatomia ed Istologia Umana dell'Università degli Studi di Verona.

Ringrazio il Prof. Thomas E. Finger per i suoi preziosi insegnamenti, la sua amicizia e la sua disponibilità in tutte le occasioni.

Ringrazio in particolare tutta la mia famiglia: mia moglie Nidia, mio padre Antonio, mia madre Gabriella, le mie cognate Mayra e Naida e non ultimi i miei due tesori Matteo e Claudio.