

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA**

DIPARTIMENTO DI  
Scienze Neurologiche, Neuropsicologiche Morfologiche e Motorie

DOTTORATO DI RICERCA IN

**Imaging multimodale in biomedicina**

CICLO XXIII (2008-2010)

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

**Tecniche di biologia molecolare nello studio dei sistemi  
chemosensoriali**

S.S.D. BIO/11

Coordinatore e tutor: Prof. Sbarbati Andrea

Dottorando: Dott. Cristofolletti Mirko



A Tiziana,  
con cui ho condiviso quotidianamente le soddisfazioni e le  
difficoltà di questi tre anni di studio



# **TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE NELLO STUDIO DEI SISTEMI CHEMOSENSORIALI**

## **RIASSUNTO**

La caratterizzazione ultrastrutturale a partire dagli anni sessanta e in seguito recentemente quella immunoistologica ha permesso di identificare cellule specializzate che possiedono diverse analogie morfologiche e molecolari con le cellule gustative ma non sono organizzate in calici gustativi. Queste cellule chemosensoriali solitarie (CCS) sono molto diffuse oltre che nella cavità orale anche nelle vie aeree e nell'apparato digerente.

L'identificazione di queste cellule singole o disposte in cluster ha portato a concettualizzare l'esistenza di un sistema chemosensoriale diffuso (DCS) di cui le cellule gustative organizzate nei taste buds nella cavità orale sono solo la parte più evidente.

Le funzioni del DCS sembrano coinvolgere la secrezione, la risposta immunitaria innata, l'assorbimento ma altri ruoli sono in parte ancora speculativi, e inoltre non tutti i tipi di cellule sono stati caratterizzati, lasciando aperte molte questioni che questo studio ha in parte analizzato utilizzando tecniche di biologia molecolare.

In particolare sono state indagate tramite RT-PCR e western blot le differenti capacità chemorecettoriali degli organi di origine endodermica ricercando l'espressione genica dei recettori implicati nella percezione del gusto. Inoltre sono state coadiuvate ricerche finalizzate a meglio caratterizzare le cellule recettoriali all'interno dei taste buds, che risultano possedere un ventaglio di pathway molecolari molto ampio, comprendente elementi tipici delle vie aeree e dell'apparato gastrointestinale. È stato analizzato se l'espressione degli stessi geni sia modificabile a livello intestinale da diversi tipi di diete.

I dati raccolti indicano una differente localizzazione dei recettori del dolce e dell'amaro lungo le vie aeree che hanno un ruolo di modulazione del movimento ciliare e della secrezione. Mentre la presenza dei recettori del dolce non va in maggior profondità della trachea, alcuni recettori dell'amaro risultano espressi anche nei polmoni. Invece lungo l'apparato gastrointestinale i recettori dell'amaro sembrano essere espressi in maniera selettiva e differenziata. L'intestino risulta inoltre sensibile a diete prolungate sovra esprimendo o sotto regolando l'espressione di proteine coinvolte nell'assorbimento e nella secrezione. In particolare è stato approfondito il sensing intestinale verso gli acidi grassi mediante quantificazione tramite PCR real time. I risultati indicano che diete iperlipidiche croniche abbattano sia l'espressione di CD36, una proteina con alta affinità per gli acidi grassi presente nella membrana apicale degli enterociti, sia l'espressione dei meccanismi di segnalazione di "saziatura" indotta dai grassi. Si tratta di un segnale, che diversamente da altri ormoni intestinali ha la capacità di prolungare la latenza tra i pasti, viene generato principalmente dalla produzione dell'ormone lipidico oleoil-etanolamide (OEA). Questo ulteriore studio oltre a evidenziare un nuovo aspetto negativo delle diete iperlipidiche, trova l'esistenza di una correlazione tra i diversi geni indagati che suggerisce che CD36 funga come sensore intestinale degli acidi grassi e abbia ruoli regolatori sui meccanismi di produzione di OEA.

# MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES IN CHEMOSENSORY SYSTEMS STUDY

## ABSTRACT

Since 1960s, the ultrastructural and more recently the immunohistological characterization have identified specialized cells with several morphological and molecular similarities with the taste cells, without being organized into taste buds. These solitary chemosensory cells (CCS) are widespread not only in the oral cavity but even in the respiratory and gastrointestinal tract.

The identification of these cell, that can be individually arranged or clustered, has led to conceptualize the existence of a diffuse chemosensory system (DCS) where the taste receptor cells organized within taste buds in the oral cavity are only the most obvious.

The functions appear to involve the secretion and absorption of the DCS, and the innate immune response, but other roles are still partly speculative as not all cell types have been characterized, leaving opened many questions that this study has partly analyzed using molecular biology techniques.

In particular, the different chemoreceptorial capacities of endodermal origin organs were assessed by RT-PCR and western blot examining the gene expression of those receptors that are involved in taste perception. We also performed experiments to better characterize the receptor cells within taste buds, showing that they have a very wide range of molecular pathways including typical features of the respiratory and gastrointestinal tract. It was analyzed whether the expression of these genes is modified by different types of diets at intestinal level.

The data indicate a different localization of the bitter and sweet receptors along the respiratory pathway that have a role in the modulation of ciliary movement and secretion. Whereas the sweet receptors cannot be found deeper than trachea, some of the bitter receptors are also expressed in the lungs. On the other hand, along the gastrointestinal tract the bitter receptors appear to be expressed in a selective and differentiated manner. The intestine is also sensitive to prolonged diets, overexpressing or downregulating the expression of proteins involved in absorption and secretion. In particular, we studied the intestinal fatty acid sensing by real time PCR utilize. The results indicate that chronic high-fat diets cut down both the expression of CD36, a protein with high affinity for fatty acids present in the apical membrane of enterocytes, and the expression of the signaling mechanisms of satiation induced by fat. This signal, which unlike other intestinal hormones has the ability to prolong the latency between meals, is generated mainly by the production of the lipid hormone oleoylethanolamide (OEA). This study further highlights a new additional disadvantage of high-fat diets and the existence of a correlation between different genes, suggesting that CD36 act as a fatty acids sensor and have regulator roles upon the intestinal mechanisms of OEA production.

## **1. INTRODUZIONE**

|                 |  |           |
|-----------------|--|-----------|
| <b>1.1.</b>     | <b>Scoperta delle “brush cells”</b>                                  | <b>1</b>  |
| <b>1.2.</b>     | <b>Introduzione dei primi marcatori molecolari</b>                   | <b>3</b>  |
| <b>1.3.</b>     | <b>I recettori del gusto</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1.3.1.</b>   | <b>La cascata di traduzione del segnale</b>                          | <b>5</b>  |
| <b>1.3.2.</b>   | <b>I recettori del dolce</b>   | <b>6</b>  |
| <b>1.3.3.</b>   | <b>I recettori dell’umami</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.3.4.</b>   | <b>I recettori dell’amaro</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.3.5.</b>   | <b>I recettori dell’aspro</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1.3.6.</b>   | <b>Il recettore del salato</b>                                       | <b>10</b> |
| <b>1.3.7.</b>   | <b>I recettori degli acidi grassi</b>                                | <b>10</b> |
| <b>1.4.</b>     | <b>Concetto di sistema chemosensoriale diffuso</b>                   | <b>13</b> |
| <b>1.5.</b>     | <b>Organizzazione strutturale dei sistemi chemosensoriali</b>        | <b>13</b> |
| <b>1.5.1.</b>   | <b>Calici gustativi con cellule specializzate</b>                    | <b>13</b> |
| <b>1.5.2.</b>   | <b>La trasmissione del segnale nei calici gustativi</b>              | <b>16</b> |
| <b>1.5.3.</b>   | <b>I cluster chemosensoriali</b>                                     | <b>17</b> |
| <b>1.5.4.</b>   | <b>Le cellule chemosensoriali solitarie</b>                          | <b>18</b> |
| <b>1.6.</b>     | <b>Il DCS nelle vie aeree</b>  | <b>19</b> |
| <b>1.6.1.</b>   | <b>Distribuzione delle SCCs</b>                                      | <b>19</b> |
| <b>1.6.2.</b>   | <b>Analisi chimica dell’aria inalata</b>                             | <b>19</b> |
| <b>1.6.2.1.</b> | <b>La superficie fluida delle vie aeree</b>                          | <b>19</b> |
| <b>1.6.2.2.</b> | <b>La rilevazione di xenobiotici</b>                                 | <b>20</b> |
| <b>1.6.2.3.</b> | <b>La rilevazione di irritanti</b>                                   | <b>21</b> |
| <b>1.6.3.</b>   | <b>Analisi chimica dell’aria espirata</b>                            | <b>21</b> |
| <b>1.6.4.</b>   | <b>Controllo microbico</b>   | <b>21</b> |
| <b>1.6.5.</b>   | <b>Monitoraggio dei fluidi provenienti dai polmoni</b>               | <b>22</b> |
| <b>1.6.6.</b>   | <b>Monitoraggio materiale proveniente dalla faringe</b>              | <b>22</b> |
| <b>1.6.7.</b>   | <b>Possibile modulazione del sistema immunitario</b>                 | <b>22</b> |
| <b>1.6.8.</b>   | <b>Possibile modulazione della secrezione esocrina</b>               | <b>23</b> |
| <b>1.6.9.</b>   | <b>Altre funzioni ipotizzabili</b>                                   | <b>24</b> |
| <b>1.7.</b>     | <b>Il DCS nell’apparato digerente</b>                                | <b>25</b> |
| <b>1.7.1.</b>   | <b>Elementi tipici delle TCRs sono presenti nelle SCCs</b>           | <b>25</b> |
| <b>1.7.2.</b>   | <b>Presenza di proteine legate al gusto in altri tipi di cellule</b> | <b>26</b> |
| <b>1.7.3.</b>   | <b>Il ruolo del DCS nell’apparato digerente</b>                      | <b>26</b> |

|   |    |
|---|----|
| 1.7.3.1. Secrezione salivare  | 27 |
| 1.7.3.2. Secrezione enterica e biliare  | 27 |
| 1.7.3.3. Controllo della flora batterica  | 27 |
| 1.7.3.4. Secrezione endocrina   | 28 |
| 1.7.3.5. Sensing del glucosio e modulazione dell'assorbimento                     | 28 |
| 1.7.3.6. Modulazione della secrezione di GLP-1                                    | 29 |
| 2. SCOPO DELLA TESI   | 30 |
| 3. MATERIALI E METODI   | 31 |
| 3.1. RT-PCR   | 31 |
| 3.1.1. Estrazione e purificazione RNA totale da tessuto                           | 31 |
| 3.1.2. Produzione del cDNA  | 32 |
| 3.1.3. Reazione di PCR  | 34 |
| 3.1.4. Visualizzazione degli ampliconi tramite separazione elettroforetica su gel | 35 |
| 3.2. Produzione di sonde di RNA per la ibridazione <i>in situ</i>                 | 36 |
| 3.2.1. Inserzione dell'amplicone nel vettore di inserzione                        | 36 |
| 3.2.2. Trasformazione delle cellule competenti e clonaggio                        | 37 |
| 3.2.3. Analisi dei trasformanti   | 38 |
| 3.2.4. Preparare la maxyprep  | 39 |
| 3.2.5. Purificazione dei prodotti di PCR e clonaggio diretto                      | 39 |
| 3.2.6. Lisi delle cellule e recupero dei plasmidi                                 | 40 |
| 3.2.7. Purificazione del DNA plasmidico de gel di agarosio                        | 41 |
| 3.2.8. Excisione dell'inserto   | 41 |
| 3.2.9. Sequenziamento dei prodotti di PCR e dei plasmidi                          | 42 |
| 3.2.10. Sequenziamento dei prodotti di PCR e dei plasmidi                         | 42 |
| 3.3. Ibridazione <i>in situ</i>   | 43 |
| 3.4. Preparazione sezioni istologiche   | 44 |
| 3.5. Ibridazione della sonda  | 44 |
| 3.6. Lista primer   | 46 |
| 3.7. PCR Real Time  | 47 |
| 3.8. Immunoblotting   | 48 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE  | 49 |
| 4.1 Il DCS nella cavità orale   | 49 |
| 4.1.1. Localizzazione del CFTR e di CCSP nella papilla                            | 50 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>circumvallata di ratto</b>   |           |
| <b>4.1.2 Localizzazione di CCSP nelle ghiandole salivari</b>  | <b>51</b> |
| <b>4.1.3. Espressione di amilasi nei taste receptors<br/>della papilla circumvallata</b>                                      | <b>52</b> |
| <b>4.1.4. Espressione di trasportatori dello zucchero nei TCRs</b>  | <b>55</b> |
| <b>4.1.5. Caratterizzazione di cellule SCCs mediante sonde di RNA</b>   | <b>56</b> |
| <b>4.1.1.1. Produzione della sonda e ibridazione</b>  | <b>56</b> |
| <b>4.1.1.2. Risultati di ibridazione di sonde per i Tas2Rs</b>  | <b>57</b> |
| <b>4.1.1.3. Sonda per il recettore candidato dell'acido PKD2L1</b>  | <b>58</b> |
| <b>4.2. Il DCS nelle vie aeree</b>  | <b>61</b> |
| <b>4.2.1 Espressione di CFTR e CC26 nella cavità nasale durante lo<br/>sviluppo</b>   | <b>61</b> |
| <b>4.2.2 Espressione dei recettori gustativi dell'amaro e del dolce nelle<br/>vie aeree</b>                                   | <b>63</b> |
| <b>4.3. Il DCS nell'apparato digerente</b>  | <b>67</b> |
| <b>4.3.3. Espressione dei recettori dell'amaro nell'apparato digerente</b>  | <b>67</b> |
| <b>4.3.4. Regolazione dei sistemi di assorbimento duodenale in funzione<br/>della dieta</b>                                   | <b>75</b> |
| <b>4.3.5. Influenza delle diete lipidiche sul sensing intestinale degli acidi<br/>grassi e sul controllo della saziazione</b> | <b>79</b> |

## **BIBLIOGRAFIA**

### **Abbreviazioni**

-Tecniche di biologia molecolare nello studio dei sistemi chemosensoriali -

## 1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni le scoperte dei meccanismi di trasduzione del segnale gustativo hanno permesso di ottenere nuovi marcatori molecolari utilizzabili nell'esplorazione delle cellule gustative nella cavità orofaringea. Questi hanno reso possibile individuare cellule solitarie esprimenti i pathways di segnalazione e i recettori molecolari tipici delle cellule gustative anche nell'apparato digerente e nelle vie respiratorie. La localizzazione di questi tipi di cellule al di fuori delle strutture gustative estende le conoscenze sulla capacità chemosensoriali degli organi di origine endodermica. Queste erano già da tempo ipotizzate in base alla scoperta delle "brush cells", un tipo di cellule identificate sulla base della sola morfologia, che suggeriva fortemente un loro ruolo nella chemorecezione. Inoltre la presenza dispersa ma regolare di questi elementi nelle vie aeree e nell'apparato digerente prova l'esistenza di sistemi diffusi dedicati alla chemosensazione le cui funzioni sono in parte ancora solo ipotizzate.

### 1.1. Scoperta delle "brush cells"

Negli anni cinquanta l'introduzione della microscopia elettronica nello studio della morfologia cellulare aveva permesso di differenziare dal punto di vista ultrastrutturale diversi tipi di cellule. Le "cellule a spazzola" (brush cells), sono delle cellule non endocrine, situate in maniera isolata nei tessuti epiteliali che sono state contraddistinte in base alla presenza di una spazzola apicale di microvilli rigidi (Figura 1.1). A causa della variabilità della struttura e della diversa dislocazione sono state ritenute per lungo tempo appartenenti a differenti famiglie di cellule. Descritte dapprima nella trachea di ratto e di diverse altre specie (Rhodin e Dalham, 1956; Rhodin, 1959), in seguito sono state individuate anche nei polmoni (Meyrick & Reid, 1968), nell'apparato digerente (Luciano et al. 1968 a, b) e in particolare nella cistifellea (Luciano e Reale, 1969). A seconda della loro collocazione sono state denominate con differenti nomi: "tuft cells" (nei dotti salivari), "fibrilovesicular cells", "multivesicular cells" e "caveolated cells"(nell'apparato digerente).

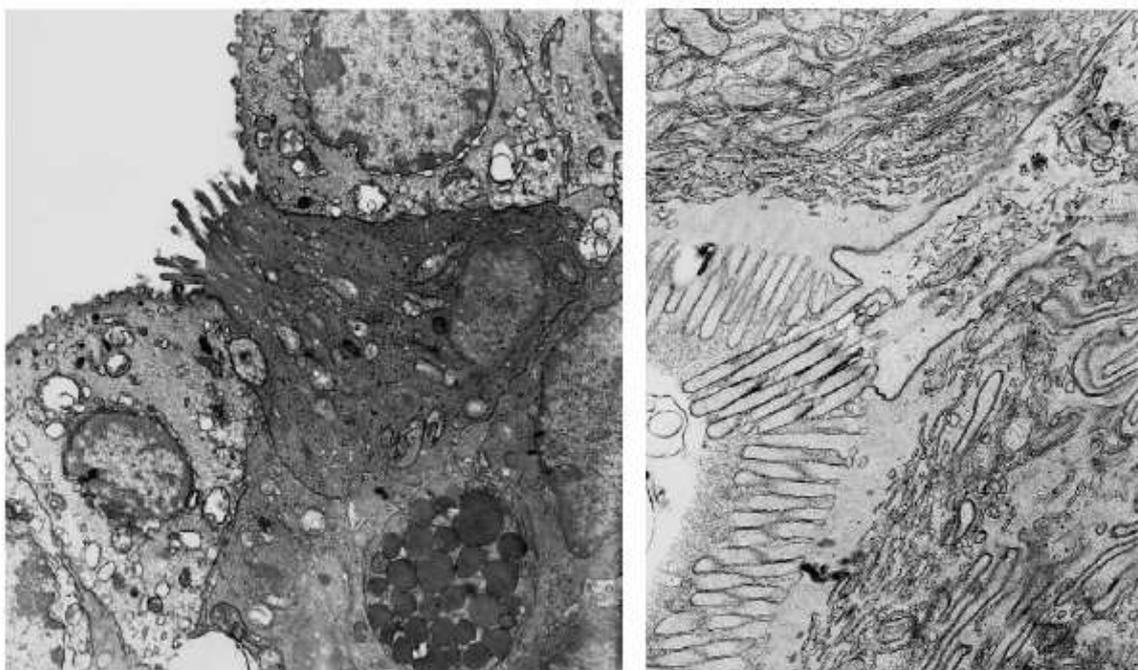
La loro classificazione in base alla sola morfologia ultrastrutturale non è stata sufficiente né a classificarle appropriatamente, né a stabilirne un ruolo preciso, sebbene fosse stato supposto che fossero coinvolte nella chemorecezione e quando situate nell'apparato digerente anche nell'assorbimento. In seguito con l'utilizzo dell'immunocitochimica ultrastrutturale e la scoperta di marcatori della composizione proteica della struttura microvillare quali la villina e la fimbrina (Höfer e Drenckhahn, 1992), la citocheratina 18 (Kasper et al., 1994), o enzimi come la ossido nitrico sintasi (Kugler et al., 1994) è stato possibile contraddistinguere con certezza dalle epiteliali

circostanti. La loro collocazione è stata così estesa anche all'epitelio non sensoriale del vomero nasale (Hofer et al., 2000), ai dotti salivari (Sato e Miyoshi, 1996), alla linea che separa il "forestomach" dallo stomaco ghiandolare (Luciano e Reale, 1992), all'epitelio associato ai follicoli linfoidi nella mucosa gastrica (Wada et al., 2000), al coledoco (Luciano et al., 1981) e al pancreas (Kugler et al., 1994). Inoltre è stato possibile evidenziare alcune peculiarità strutturali come per esempio il glicocalice delle brush cells intestinali che possiede una composizione proteica specializzata che differisce significativamente da quello degli enterociti (Gebhard e Gebert, 1999).

Dato che risultavano immuno-reattive agli stessi anticorpi, è stato proposto che fosse opportuno considerarle appartenenti a un'unica famiglia cellulare (Luciano e Reale, 1997).

Negli stessi anni veniva riportata la presenza di cellule chemosensoriali solitarie (solitary chemosensory cells - SCCs) nell'epitelio dell'orofaringe, nelle branchie e nella pelle dei vertebrati (Kotrschal, 1991, 1996; Whitear, 1992). Questi lavori oltre a trovare delle similarità fra le SCCs e le brush cells hanno introdotto l'idea dell'esistenza di un sistema chemosensoriale diffuso nei vertebrati acquatici che in seguito verrà estesa a tutti i vertebrati.

In seguito la conoscenza della biologia cellulare delle brush cells è aumentata ed è stato scoperto che possiedono alcuni elementi in comune con le cellule gustative, confermando l'ipotesi di un loro ruolo chemosensoriale.



**Figura 1.1 Brush cell nella laringe di ratto e nel duodeno umano**

(Figura tratta da "A new fate for old cells brush cells and related element", Sbarbati e Osculati, 2005)

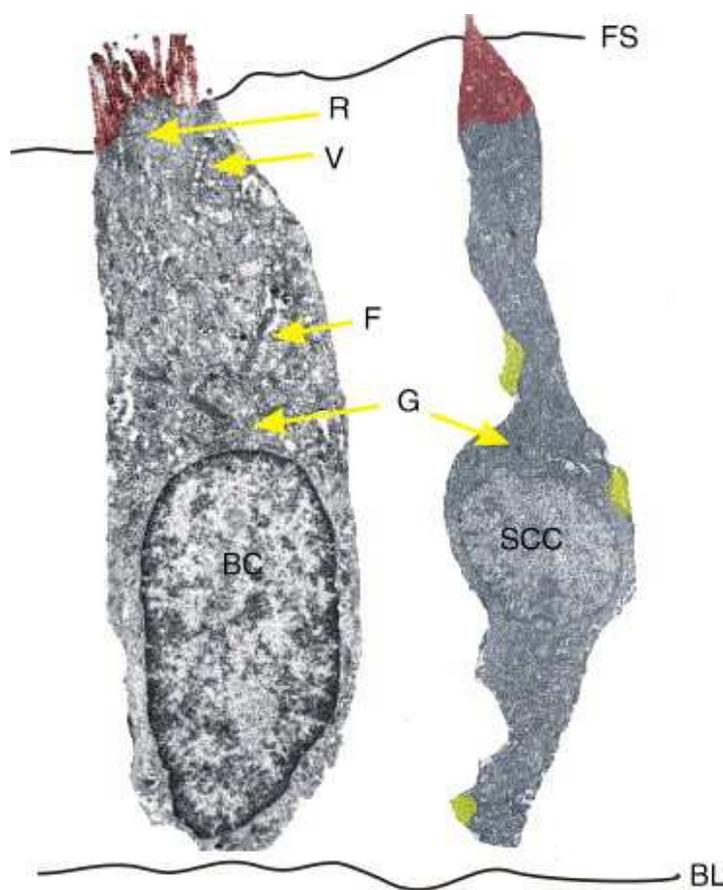
## 1.2. Introduzione dei primi marcatori molecolari

La classificazione delle brush cells in un'unica famiglia basandosi unicamente sulla morfologia della struttura microvillare e alla presenza di marcatori caratterizzanti la struttura morfologica è un criterio pronò ad errori. Questo perchè si porrebbe l'attenzione su una specializzazione della membrana apicale, che può essere presente in cellule di tipo differente, tralasciando le possibili peculiarità dei pathways molecolari presenti. Usando invece un approccio che caratterizzi il citotipo anche dal punto di vista molecolare oltre che da quello strutturale, si ottiene un'identificazione più fine evidenziando similarità altrimenti non visibili fra i diversi tipi di cellule, e al contempo i dati morfologici possono venire associati a una specifica funzione. La comprensione dei meccanismi biologici che permettono la percezione del gusto all'interno delle cellule gustative, ha permesso di trovare elementi coinvolti nella chemocezione anche nelle brush cells confermando il presupposto ruolo recettoriale. Inoltre la coesistenza di questi nuovi marcatori con la ricchezza di vescicole citoplasmatiche presente in alcune brush cells ha fatto supporre che in queste cellule possano avvenire riflessi secretori in risposta a modificazioni del microambiente, captate mediante le capacità chemosensoriali (Sbarbati e Osculati, 2005).

Per la caratterizzazione delle brush cells, delle cellule SCCs in genere e delle stesse cellule gustative presenti nelle papille, ha svolto un ruolo cardine l'utilizzo come marcatore della gustducina, una proteina che ha un ruolo chiave nella cascata di eventi che trasducono il segnale di amaro e di dolce e umami. Si tratta di una proteina composta da tre subunità associata a recettori di membrana e appartenente alla famiglia delle guanine-binding protein (G-protein). Il suo ruolo di G-protein associata al gusto è stato mostrato per la prima volta in ratto (McLaughlin et al., 1992) e in seguito confermato in uomo (Takami et al., 1994). La subunità alfa risulta specificatamente espressa nelle cellule gustative della papilla circumvallata, foliata e fungiforme (Boughter et al., 1997).

In seguito questo marcatore delle cellule gustative è stato trovato in cellule al di fuori della cavità orale. Dapprima sono state trovate cellule contenenti alfa-gustducina, identificate come brush cells, nello stomaco e nell'intestino (Hofer et al. 1996), poi nel dotto pancreatico (Hofer e Drenckhahn, 1998). Gli stessi autori hanno verificato che la proteina che dà immunoreattività nelle brush cells migra assieme all'alfa-gustducina presente nelle papille gustative, accertando la presenza della G-protein specifica per la traduzione del segnale del gusto e suggerendo che sia alla base della chemorecezione anche al di fuori della cavità orale. In seguito all'individuazione nella cascata di trasduzione del segnale gustativo di altri elementi, e all'identificazione dei recettori del gusto sono stati trovati nuovi marcatori che hanno permesso di contraddistinguere di fuori della cavità orale cellule con capacità chemosensoriali non contraddistinte come brush cells (vedi figura 1.2). Questi

ritrovamenti hanno permesso soprattutto di estendere il concetto di SCCs anche ai mammiferi (Sbarbati et al., 1998, 1999) e di introdurre una nuova e più ampia visione dell'organizzazione della struttura "sensing" gustativo che nei mammiferi era classicamente limitata alle papille gustative e che verrà riportata estesamente in seguito. Inoltre questi nuovi dati hanno spinto recentemente a ricollocare le brush cells come appartenenti alla famiglia delle SCCs in quanto la spazzola apicale non è un tratto costante (Sbarbati e Osculati, 2005). Conseguentemente la spazzola apicale di microvilli sarebbe una differenziazione presente in una sottofamiglia di SCCs localizzata in microambienti specifici.



**Figura 1.2. Immagine schematica di una brush cell e di una SCC.** Il giallo marca gli assoni, il rosso le aree apicali con un'alta espressione di gustucina. R, radici dei microvilli; V, vescicole; F, filamenti; G, complesso del Golgi.

(Figura tratta da "A new fate for old cells brush cells and related element", Sbarbati e Osculati 2005)

### 1.3. I recettori del gusto

Nel 2000 è stata identificata una classe di recettori gustativi associati a G-protein (G-protein coupled receptors - GPCRs), anche essi come la gustducina non espressi ristrettamente nella cavità orale (Adler et al., 2000, Hoon et al., 1999, Matsunami et al., 2000). Risultava perciò evidente che le molecole agoniste per i GPCRs possono venire riconosciute dai medesimi recettori anche in altri tessuti endoteliali, in particolare le sostanze che inducono nella cavità orale sensazioni di dolce, umami (il gusto degli L-aminoacidi e dei ribonucleotidi) e l'amaro. I GPCRs hanno inoltre parte del meccanismo di downstream del segnale in comune, aumentando il numero di marcatori disponibili per contraddistinguere le cellule chemosensoriali. Gli altri due gusti percepiti dal sistema gustativo, ossia il salato e l'acido sono invece determinati da canali di membrana e da meccanismi non ancora ben identificati e hanno un meccanismo di traduzione de segnale totalmente differente. In aggiunta a questi 5 gusti base esistono altre percezioni gustative quali il 'grasso', il 'metallico', il gusto delle malto-destrine, dell'anidride carbonica, ect.

#### 1.3.1. La cascata di traduzione del segnale

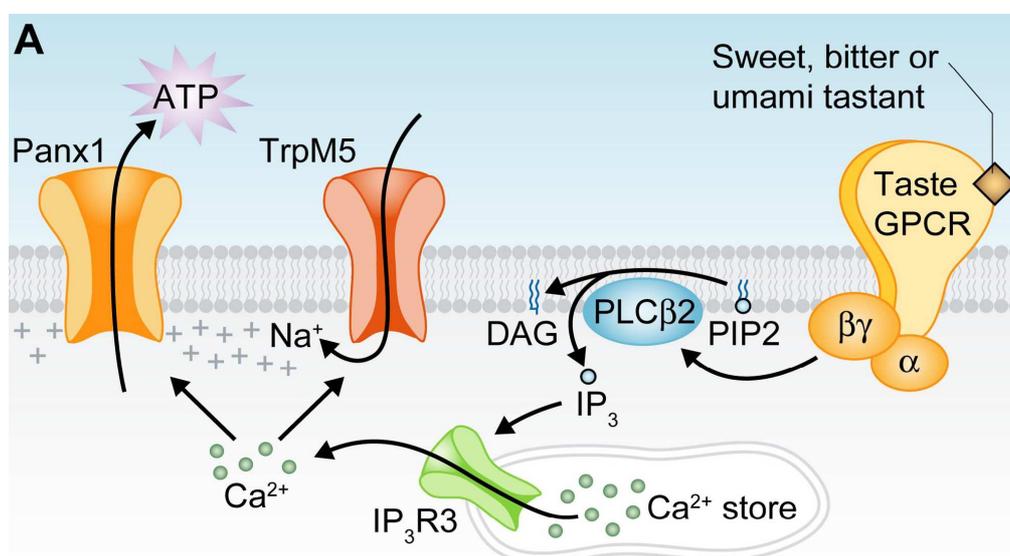
Quando un recettore appartenente alla famiglia delle GPCRs viene attivato, la trasduzione del segnale inizia dapprima con l'attivazione della G-protein eterotrimerica ad esso associata.

I recettori dell'amaro (TAS2Rs o T2Rs) sono coespressi e attivano selettivamente la subunità  $G\alpha$  della gustducina o la strettamente correlata  $\alpha$ -transducin (Ruiz-Avila et al., 1995), mentre i recettori del dolce situati nella parte posteriore della lingua possono accoppiati alla subunità  $G\alpha_{14}$  (Tizzano et al., 2008). Comunque il principale pathway di traduzione del segnale sembra mediato tramite le subunità  $G\beta\gamma$  della gustducina, comprese  $G\gamma_{13}$  e  $G\beta_1$  o  $G\beta_3$  (Huang et al., 1999) che attivano la fosfolipasi C  $\beta_2$  (PLC  $\beta_2$ ). L'inattivazione genica della PLC $\beta_2$  induce un calo drastico ma non totale della sensitività del gusto (Zhang et al., 2003; Dotson et al., 2005).

La PLC  $\beta_2$  attivata che a sua volta idrolizza il fosfatidilinositolo-4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) producendo i due messaggeri intracellulari diacilglicerolo (DAG) e inositolo-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Gli IP<sub>3</sub> sintetizzati attivano l'apertura dei canali ionici IP<sub>3</sub>R3 situati sul reticolo endoplasmatico provocando un rilascio nel citosol delle cellule recettoriali di ioni calcio (Simon et al., 2006; Roper, 2007). L'elevata concentrazione di Ca<sup>2+</sup> raggiunta agisce su due diversi target presenti nelle cellule chemosensoriali: il canale cationico non selettivo TRPM5 (Pérez et al., 2002) e un emicanale di "gap junction" formato da pannexina (Panx) (Huang et al., 2007; Dando e Roper, 2009). Quando nella cellula viene raggiunto un livello soglia di Ca<sup>2+</sup> si aprono i canali TRPM5 (Transient Receptor

Potential Channel M5), dei recettore-canali che determinano variazioni transitorie di potenziale che causano la depolarizzazione delle cellule recettore (Liu e Liman, 2003).

L'attivazione dei recettori da parte delle molecole "dotate di gusto" provoca così nella cellula un voltaggio e un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico che rendono possibile la secrezione di ATP negli spazi extracellulari attraverso i pori degli emicanali Panx (Huang e Roper, 2010) andando a stimolare le fibre afferenti del nervo gustativo (vedere figura 1.3 e in seguito figura 1.9) (Huang et al., 2007; Romanov et al., 2007; Huang e Roper, 2010). Al momento gli ATP sono gli unici neurotrasmettitori secreti dalle cellule chemosensoriali. Allo stesso tempo stimolano le cellule presinaptiche adiacenti (cellule di tipo I) a secernere le amine serotonina (5-HT) e norepinefrina (NE) (Dvoryanchikov et al., 2007; Huang et al., 2008). Inoltre l'ATP secreto funge come trasmettitore autocrino andando a stimolare le stesse cellule recettoriali (Huang et al., 2009).



**Figura 1.3. Meccanismo di traduzione del segnale gustativo di dolce, umami e amaro.** (Figura tratta da "The cell biology of taste", N Caudhari e S. Roper, 2010)

### 1.3.2. I recettori del dolce

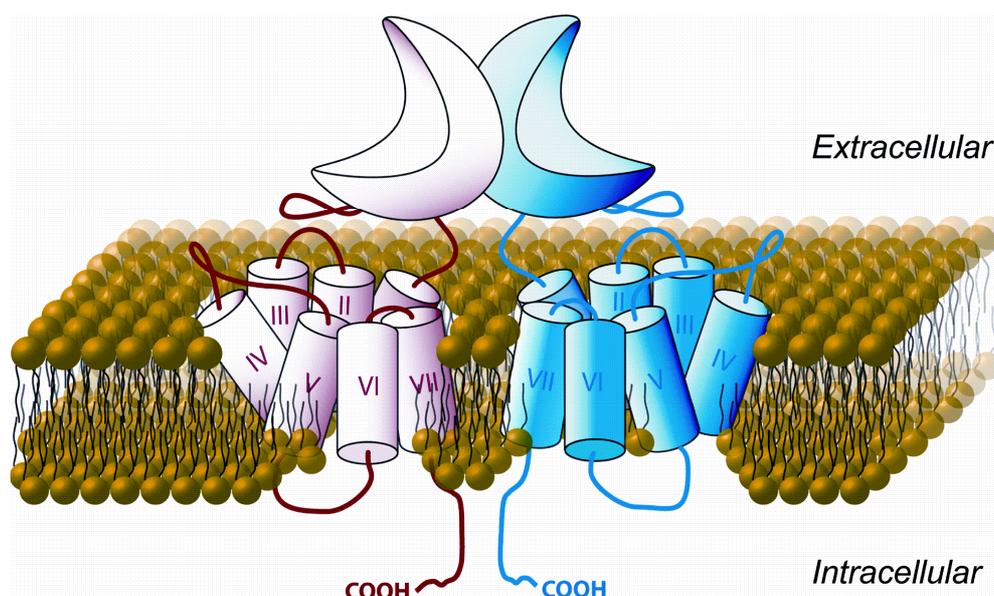
Esistono 2 famiglie di recettori GPCRs: la famiglia dei TAS1R (taste receptor, type 1), chiamata anche T1R, composta da tre geni e la famiglia multigenica dei TAS2R (taste receptor, type 2), denominata anche T2R. Entrambe le famiglie possiedono come tutti i recettori GPCRs 7 domini  $\alpha$ -elica transmembrana, un dominio intracellulare C-terminale ma solo la TAS1Rs posseggono un largo dominio extracellulare N-terminale (figura 1.4).

Il terzo lungo loop citoplasmatico (che intercorre fra la quinta e la sesta  $\alpha$ -elica) dei recettori corrisponde alla regione della molecola che si accoppia alla proteina G.

Nei mammiferi il recettore dedicato al dolce è formato da un eterodimero formato dalla subunità specifica TAS1R2 e dal TAS1R3 (Max et al., 2001; Montmayeur et al., 2001; Nelson et al., 2001; Max et al., 2001; Montmayeur et al., 2001, Nelson et al., 2001; Kitagawa et al., 2001; Sainz et al., 2001; Bachmanov et al., 2001) che invece partecipa anche alla rilevazione del gusto umami, mediante la formazione di un diverso eterodimero con la subunità TAS1R1. Infatti il blocco della subunità TAS1R3 mediante l'agonista lactisole inibisce la percezione di entrambe queste due sensazioni gustative (Jiang et al., 2004; Winnig et al., 2005; Xu et al., 2004).

Studi di co-espressione eterologa di TAS1R2 e TAS1R3 in linee cellulari hanno permesso di capire che il loro eterodimero riconosce numerose e svariate sostanze. Infatti permette di riconoscere il gusto dolce non solo di monosaccaridi e disaccaridi, ma anche quello di dolcificanti artificiali, di D-aminoacidi, della glicina, di proteine dolci e di metabolici di piante come lo stevioside ( Nelson et al., 2001; Ide et al., 2009; Jiang et al., 2004; Li et al., 2002; Nakajima et al., 2008; Nelson et al., 2002; Winnig et al., 2005; Winnig et al., 2007). Comunque il range di sostanze rilevate varia a seconda delle specie. Un estremo è il caso del gatto, specie in cui a causa di una modificazione a pseudogene della subunità TAS1R2, la capacità di percepire il dolce è stata perduta (Li et al., 2005). Nei roditori potrebbe essere presente un'ancora non identificato recettore per i polisaccaridi (Zukerman et al., 2009), poiché essi sono attratti dall'amido anche quando privati dell'amilasi linguale e quindi della capacità di scomporlo in zuccheri semplici.

Inoltre è stato proposto la possibile formazione di un omodimero di TAS1R3 che potrebbe agire come recettore a bassa affinità per monosaccaridi e disaccaridi (Zhao et al., 2003).



**Figura 1.4. Eterodimero recettore del dolce formato dai GPCRs TAS1R2 (viola) e TAS1R3 (blu).** (Figura tratta dalla review “The Receptor Basis of Sweet Taste in Mammals”, S. Vignes, C.D. Dotson e S.D. Munger , 2008)

### **1.3.3. I recettori dell'umami**

Il recettore dell'umami è formato dall'eterodimero composto da TAS1R1 e TAS1R3 (Li et al., 2002; Nelson et al., 2002). Diversamente dal recettore del dolce, precedentemente sono stati proposti recettori gustativi dell'umami aggiuntivi. Si tratta di forme troncate dei recettori metabotropici del glutammato mGluR1 e mGluR4 individuate nei tessuti gustativi dei roditori (Chaudhari et al., 2000; Toyono et al., 2003).

In ogni modo l'eterodimero formato dai T1Rs svolge un ruolo predominante nella percezione dell'umami. Inoltre è stato evidenziato che l'attivazione dell'eterodimero da parte del L-glutammato è potenziata dalla presenza di 5'-ribonucleotidi (Nelson et al., 2002). Come per i recettori del dolce, anche per l'umami il range delle molecole rilevate cambia a seconda della specie. Mentre nell'uomo viene percepito solo l' L-glutammato, nei roditori la percezione è estesa a diversi L-aminoacidi (Zhao et al., 2003).

### **1.3.4. I recettori dell'amaro**

I recettori dell'amaro sono una famiglia multi-genica di GPCRs denominata TAS2R (taste receptor, type 2), o anche T2Rs (figura 1.5)(Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000; Matsunami et al., 2000; Mueller et al., 2005).

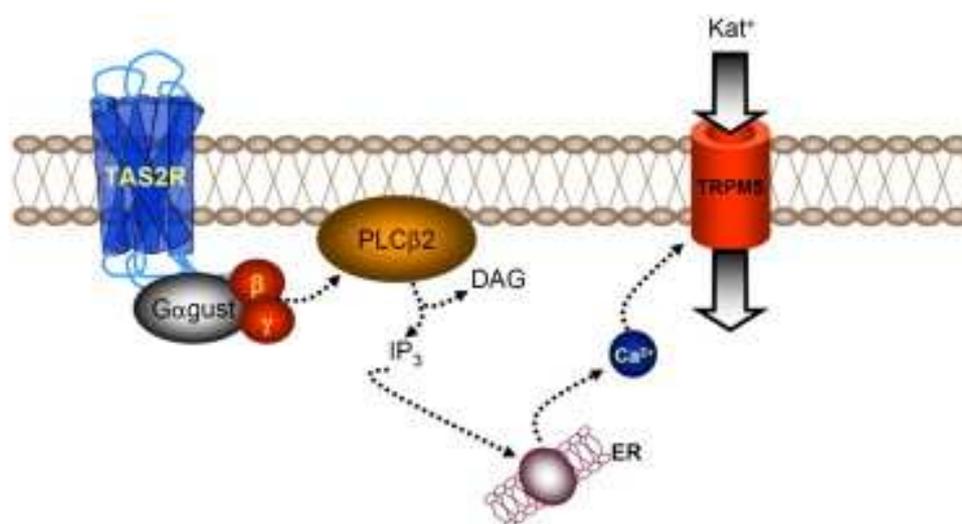
Tutte le specie di vertebrati possiedono da alcune a numerose varianti di recettori. È stato stimato da studi di sequenziamento genico che nel ratto e nell'uomo ci sono circa 30 diversi geni di recettori per l'amaro e qualche pseudo gene, e che possiedono una identità aminoacidica variabile dal 21 al 90% (Bufe et al., 2002). Una nomenclatura completa e aggiornata dei TAS2Rs umani e murini è riportata da una recente review (M. Behrens e W. Meyerhof, 2011).

I TAS2Rs hanno l'importante ruolo di evitare l'assunzione di tutte le sostanze pericolose che generalmente sono amare. Data l'ampia diversità chimica dei composti rilevati è chiaro che questi recettori riconoscano una grande varietà di gruppi chimici differenti. Non è ancora compreso come così pochi recettori siano sufficienti per monitorare la presenza dei tanti composti amari presenti in natura. Da studi di "deorfanziazione" del ligando appare comunque chiaro come lo stesso composto possa essere riconosciuto da diversi recettori e che alcuni recettori possano riconoscere un ampio range di molecole mentre altri sono hanno un target più selettivo (Meyerhof et al., 2010). Inoltre risulta enormemente differente anche il grado di sensibilità alle rilevazioni, con valori di EC50 indotti da quantità di composto che vanno da livelli nanomolari (Kuhn et al., 2004) a livelli millimolari (Bufe et al., 2002).

Attualmente per l'80% (20 su 25) (Meyerhof et al., 2010) dei TAS2R umani sono stati identificati dei ligandi, mentre in toto sono stati deorfanzizzati solo il 6% (2 su 33) dei recettori (Chandrashekar et al., 2000), uno singolo in ratto (di circa 36 Tas2rs) (Bufe et al., 2002).

Comunque oltre questa importante funzione collegata all'alimentazione ve ne sono altre, poiché i TAS2Rs sono presenti anche al di fuori della cavità orale, dove assumono ruoli ovviamente non gustativi.

Nel tratto digerente la presenza dei recettori della famiglia dei TAS2R, assieme a quella adibita al "sensing" del dolce e dell'umami è correlata all'analisi del contenuto del lume intestinale, mentre la loro presenza nelle vie aeree implica diverse questioni sulla loro funzione.



**Figura 5. Recettore dell'amaro e trasduzione del segnale.**

( Figura tratta dalla review "Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors", M. Behrens e W. Meyerhof, 2011)

### 1.3.5. I recettori dell'aspro

Il recettore di membrana o il canale ionico che traduce lo stimolo acido dando una sensazione di asprezza rimane ad oggi ancora non identificato sebbene siano stati proposti diversi recettori e meccanismi. Tra i recettori da segnalare i canali permeabili ai nucleotidi ciclici (HCN, cyclicnucleotide-gated) attivabili per iperpolarizzazione (Stevens et al., 2001), i canali ionici acido-sensibili (ASICs) (Ugawa et al., 1998), i canali del potassio (K2P)(Lin et al., 2004; Richter et al., 2004) e i canali del calcio permeabili all'H<sup>+</sup> (Waldmann et al., 1997), mentre fra i meccanismi ci sono il coinvolgimento degli scambiatori Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Lyall et al., 2004) e l'inattivazione acida dei

canali del  $K^+$  (Cummings e Kinnamon, 1992). Ultimamente ha acquisito maggior credito come recettore del gusto acido l'eterodimero formato dai canali ionici non selettivi per cationi PKD2L1 (Polycystic kidney disease 2-like 1 protein) e PKD1L3 (Polycystic kidney disease 1-like 3 protein, chiamati così perché la mutazione causa la malattia policistica renale) che all'interno dei taste buds risultano espressi selettivamente dalle cellule di tipo III, (Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006; LopezJimenez et al., 2006), che sono cellule presinaptiche. Inoltre questi canali sono molto sensibili al pH extracellulare, che è conosciuto come il principale stimolo del gusto acido (Lyall et al., 2001; Huang et al., 2008b). Solo molto recentemente hanno perso di rilevanza come recettori poiché è stato mostrato che in topo la delezione genica della subunità PKD1L3 formante l'eterodimero non impedisce la percezione del gusto acido (Nelson et al., 2010). Tuttavia non perdono di importanza nella marcatura delle cellule adibite al sensing dell'acido e rimangono i marcatori più promettenti. Infatti un recente lavoro riporta che la corrente fornita da uno stimolo acido apicale (ioni  $H^+$ ) delle sole cellule esprimenti PKDL1 la depolarizzazione e causa un incremento temporaneo della concentrazione citosolica di ioni  $Ca^{2+}$ , che nelle cellule presinaptiche induce il rilascio del trasmettitore (Chang et al., 2010). Per cui attualmente il maggiore candidato come recettore del gusto acido è un non ancora identificato canale protonico (S. Frings 2010).

### **1.3.6. Il recettore del salato**

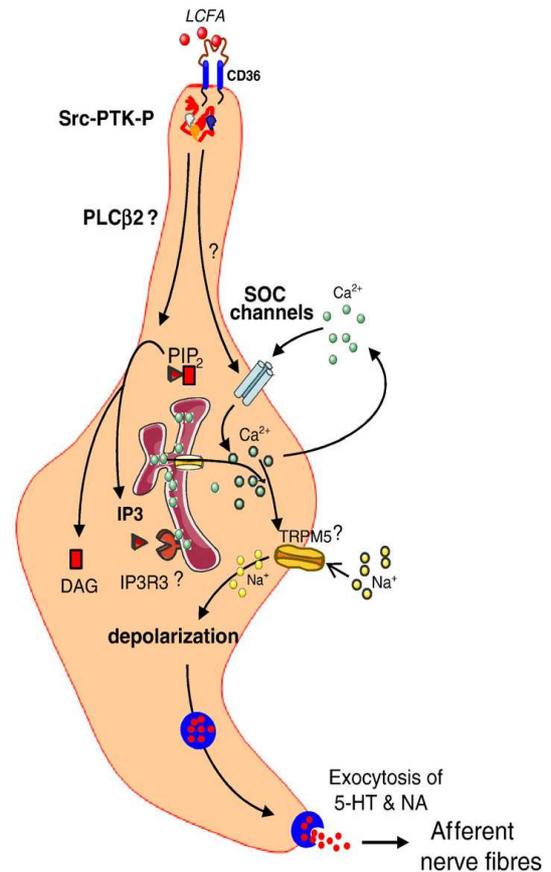
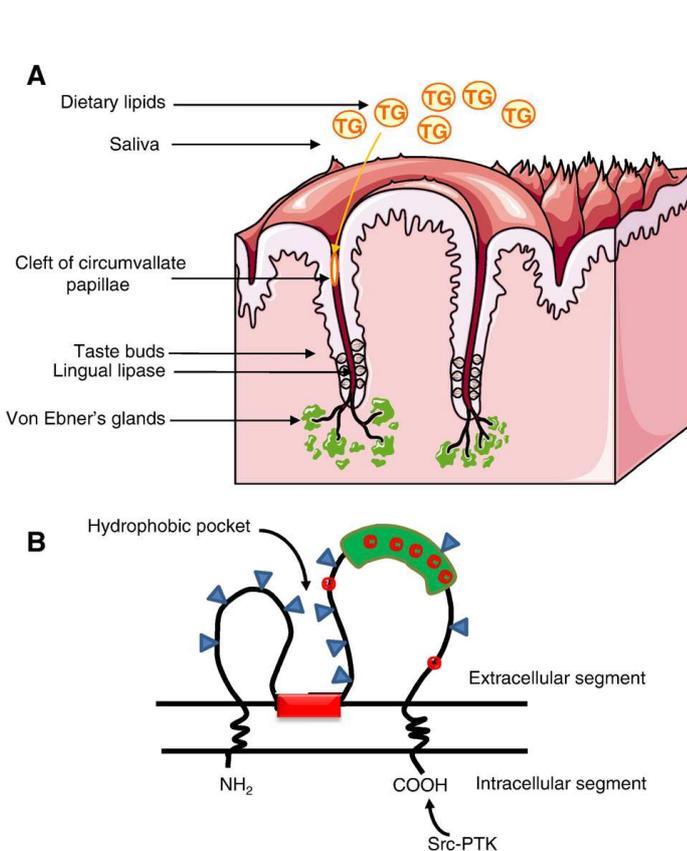
Come responsabile del gusto salato erano stati proposti diversi canali ionici e solo recentemente uno di questi, il canale sodio epiteliale (ENaC) è stato verificato (Chandrashekar et al., 2010). Questo canale è coinvolto in diverse reazioni di trasporto del sodio attraverso l'epitelio (Kellenberger e Schild, 2002) e inoltre studi di patch-clamp suggeriscono che le cellule che percepiscono il  $Na^+$  siano cellule di tipo I (Vandenbeuch et al., 2008). Quindi un suo impiego come marcatore di cellule con funzioni chemosensoriali sembra essere poco promettente.

### **1.3.7. I recettori degli acidi grassi**

Sebbene i lipidi introdotti attraverso la dieta siano principalmente costituiti da trigliceridi, la loro percezione gustativa è basata sulla presenza di acidi grassi liberi. Per questo motivo la lipasi linguale, che è responsabile del rilascio degli acidi grassi liberi dai trigliceridi gioca un ruolo molto importante nella percezione orale del grasso.

Infatti la sua inibizione farmacologica diminuisce fortemente la preferenza verso i lipidi; inoltre è interessante notare che la lipasi linguale nei roditori è rilasciata dalle ghiandole di von Ebner direttamente nei solchi delle papille foliate e vallate (Kawai and Fushiki 2003), permettendo una

forte idrolisi dei trigliceridi con rilascio di acidi grassi liberi in prossimità dei taste buds facilitando la rivelazione da parte delle “taste receptor cells”(vedere figura 1. 6A).



**Figura 1.6. Localizzazione delle ghiandole di von Ebner (A) e struttura della proteina**

**CD36(B).** (Δ siti di glicosilazione, ○ residui di cisteina, ■ regione ricca in prolina)

(Figure tratte dalla review “Oro-sensory perception of dietary lipids: New insights into the fat taste transduction.”, N.A. Khan e P. Besnard, 2009)

**Figura 1.7. Meccanismo di azione degli**

**(5-HT, serotonina; NA, noradrenalina)**

Comunque il gusto del grasso sembra essere una unione fra una sensazione tattile e una percezione gustativa.

Per diversi anni il riconoscimento dei grassi della dieta è stato considerato primariamente in funzione della loro consistenza, e perciò uno stimolo di natura tattile.

La percezione gustativa dei lipidi deve per forza richiedere la presenza negli TCRs di recettori con alta affinità per gli LCFA (long free fatty acids).Recentemente sono stati identificati tre plausibili candidati a questa funzione: il delayed-rectifying potassium (DRK) canale Kv1.5, il recettore accoppiato a proteina G GPR120, e la glicoproteina CD36 (per una review si veda Khan e Besnard, 2009).

Alle attuali conoscenze sembra avere un ruolo preponderante la glicoproteina CD36, una proteina di membrana con funzioni di recettore che lega saturi e insaturi LCFA con una range di affinità

nanomolare (Baillie et al., 1996). Questo grazie a una struttura a forcina con un largo dominio extracellulare e una tasca idrofobica situata fra le due code citoplasmatiche (vedere figura 1.6B)( Rać et al., 2007). La coda C-terminale può interagire con la proteina tiroxina chinasi Src (PTK) (Huang et al., 1991) formando un complesso funzionale che permette di trasferire il segnale dentro il TRC. Il rilascio di neurotrasmettitori avviene sempre in seguito all'innalzamento del calcio cellulare ma utilizzando pathway differenti da quelli usati dai GPCR (vedere figura 1.7).

Sebbene sia una molecola con funzioni di "scavenger receptor", controllo dell'omeostasi, percezione dei lipidi (per una recente review si veda Martin et al., 2011) e sia espressa in svariati tipi di cellule (per esempio macrofagi, piastrine, enterociti, epatociti, adipociti, ect.) nella cavità orale appare espressa ristrettamente all'epitelio gustativo della lingua (Fukuwatari et al., 1997 ; Laugerette et al., 2005), particolarmente nella papilla vallata, mentre in quella fungiforme è poco espresso (Laugerette et al., 2005). Inoltre la sua delezione genica abolisce sia la preferenza per il grasso (Laugerette et al., 2005 ; Sclafani et al., 2007a) che la digestione cefalica indotta dalla somministrazione nella cavità orale di LCFA (Laugerette et al., 2005).

#### **1.4. Concetto di sistema chemosensoriale diffuso**

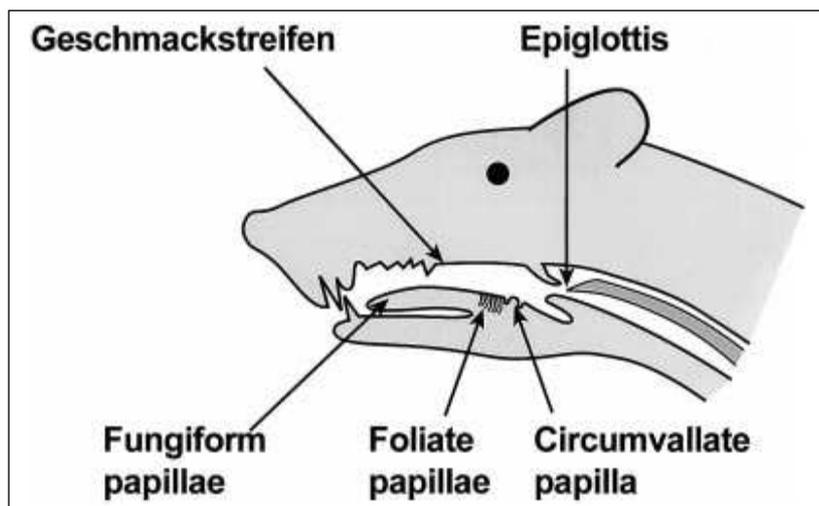
La disponibilità di marcatori molecolari dei pathway di trasduzione del segnale del gusto e dei recettori ha permesso di identificare la presenza di cellule non aggregate in calici ma con analogie con le TRCs, denominate cellule chemosensoriali solitarie (solitary chemosensory cells – SCCs) (Sbarbati and Osculati, 2003), o cellule chemosensoriali solitarie (Finger et al., 2003). La loro estesa distribuzione va dalle cavità orofaringea alle vie aeree e alle vie digestive e ha suggerito l'esistenza di un sistema chemosensoriale diffuso (diffuse chemosensory system - DCS) (Sbarbati and Osculati, 2005). Come descritto precedentemente di questo complesso fanno parte anche le “brush cells”, note da lungo tempo, che sono da considerarsi una sottofamiglia delle SCCs. Recenti studi hanno dimostrato che le SCCs sono distribuite nelle vie aeree strategiche del corpo suggerendo che le loro capacità di chemoccezione siano coinvolte in importanti processi fisiologici sia nell'apparato respiratorio (Gulbransen et al., 2008) e apparato digerente (Rozengurt, 2006; Salmon et al., 2007; Mace et al., 2007). Questa capacità di monitoraggio del contenuto luminale non è collegata solo alla trasmissione al sistema nervoso centrale, ma anche a un controllo locale dei processi di assorbimento e secrezione. Inoltre è stato proposto avere un ruolo nel controllo delle popolazioni batteriche (Sbarbati and Osculati, 2006) e nella rilevazione degli irritanti DCS (Finger et al., 2003). Appare chiaro che a causa della sua ampia varietà di funzione il DCS potrebbe essere coinvolto in un ampio spettro di disagi sia respiratori che digestivi, come pure in malattie sistemiche come l'obesità e il diabete (Kellett et al., 2008).

#### **1.5. Organizzazione strutturale dei sistemi chemosensoriali**

Dato che lo studio e la caratterizzazione tuttora in corso delle SCCs si basa sulla loro similarità con le TRCs riportiamo in seguito le attuali conoscenze sulla loro distribuzione nella cavità orale, nelle vie aeree, nell'apparato digerente, dedicando per una maggior comprensione una parentesi sull'organizzazione dei TRCs nei calici gustativi. Inoltre per estensione del concetto di DCS i calici gustativi si potrebbero considerare la sommità visibile di un iceberg costituito in maggior parte da cellule chemosensoriali singole o organizzate sotto forma di clusters (Sbarbati et al., 2010).

##### **1.5.1. Calici gustativi con cellule specializzate**

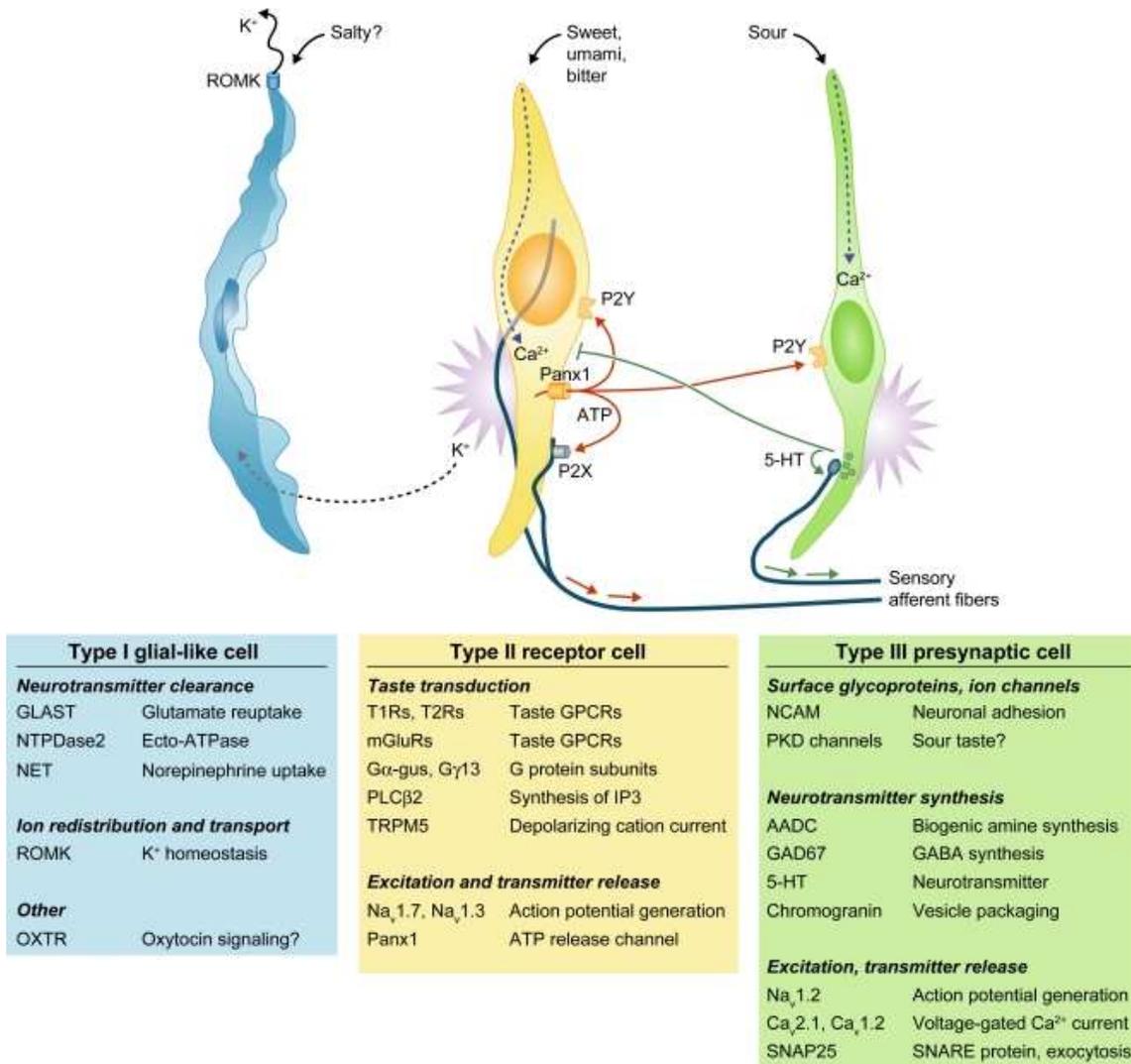
La sensazione del gusto avviene nella cavità orale per mezzo di cellule specializzate esprimenti recettori gustativi, le “taste receptor cells” (TRCs) organizzate in calici gustativi o gemme gustative (“taste buds”) situati principalmente nelle papille gustative (vedere figura 1.8).



**Figura 1.8. Distribuzione dei taste buds nella cavità orale di ratto.**

(figura tratta da "A novel family of mammalian taste receptors", Adler et al., 2000).

Esistono quattro tipi di papille, tutte situate sulla lingua, di cui tre presentano i taste buds, mentre il quarto tipo, le papille filiformi non possiedono recettori gustativi poiché non hanno una funzione gustativa ma meccanica di tipo abrasivo. Nella parte anteriore della lingua e innervate dal nervo facciale vi sono le papille fungiformi, invece sono innervate dal nervo glossofaringeo, le papille foliate situate ai lati verso il fondo e la papilla vallata o circumvallata (nel ratto e nel topo è una sola, mentre nell'uomo variano da 10 a 14) che è circondata da un solco in cui sono organizzati i calici gustativi e i cui affluiscono i dotti della sottostante ghiandola sierosa di Von Ebner. Oltre che nelle papille i taste buds sono dislocati su palato molle (Stone et al. 2007), guance, faringe, esofago superiore e laringe (Travers e Nicklas, 1990). I calici gustativi vengono costantemente rimpiazzati approssimativamente ogni 10-12 giorni. Fra i vertebrati forma e dimensioni dei calici gustativi sono molto simili, con misure che variano dai 20 ai 40  $\mu\text{m}$  di diametro e circa 40-60  $\mu\text{m}$  di lunghezza. Ogni calice gustativo includendo i precursori delle cellule recettoriali e le cellule di supporto è formato da circa 50-100 cellule (Lindemann et al., 2001), ed è innervato da numerose fibre che trasportano il segnale di attivazione dalla periferia al sistema nervoso centrale. Le cellule presenti nei taste buds sono state suddivise in quattro categorie in base alla morfologia: cellule basali e cellule di Tipo I, II e III (vedere figura 1.9). Le cellule basali sono credute essere cellule staminali o comunque cellule indifferenziate precorritrici degli altri elementi cellulari, mentre le cellule di Tipo I sono caratterizzate dalla presenza di grandi granuli apicali e sono ampiamente



**Figura 1.9. Le tre maggiori classi di taste receptor cells.**

(Figura tratta da "The cell biology of taste", N Caudhari e S. Roper, 2010)

considerate come elementi di supporto e di secrezione (Kataoka et al., 2008; Yoshida et al., 2009) e potrebbero essere anche coinvolte nella percezione del gusto salato (Vandenbeuch et al., 2008).

Le cellule di Tipo II sono quelle che posseggono i recettori GPCRs e risultano immunoreattive alla gustducina, hanno forma fusiforme e poiché non posseggono granuli o sinapsi appaiono chiare al microscopio (Chandrashekar et al., 2000; Chaudhari et al., 2000; Nelson et al. 2001; Nelson et al. 2002).

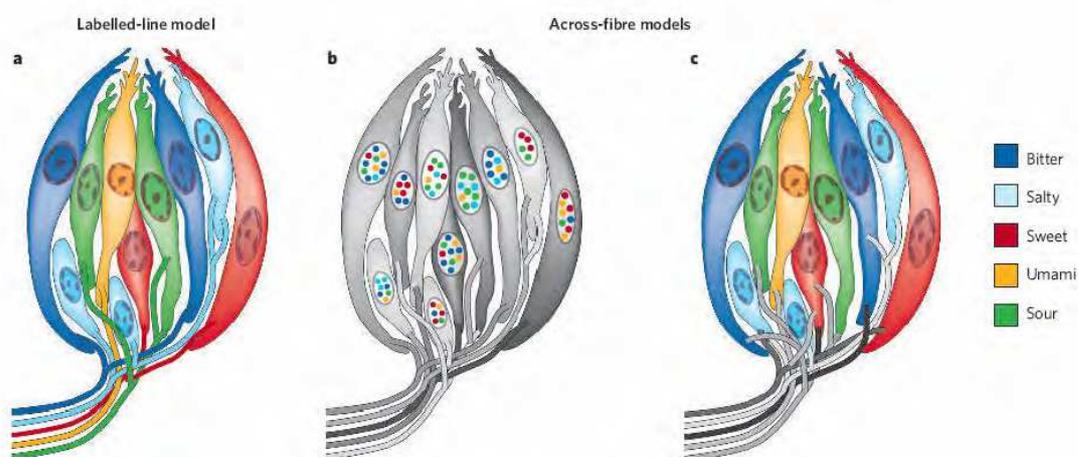
Le cellule di tipo III presentano processi apicali e basali che creano sinapsi con gli assoni e inoltre sembrano percepire il gusto acido (Chang et al., 2010; S. Frings 2010).

### 1.5.2. La trasmissione del segnale nei calici gustativi

Durante la percezione di molecole dotate di gusto l'informazione viene trasmessa dai taste buds al cervello tramite l'attivazione delle cellule presinaptiche, ma non è chiaro in che modo venga specificata la qualità dello stimolo gustativo. Sono stati proposti due modelli contrastanti. Da un lato è proposto che lo stimolo di una certa qualità venga trasmesso tramite fibre nervose dedicate ("labelled lines") ai diversi singoli gusti. In

Questo modello ogni TRCs dovrebbe essere dedicato a un singolo recettore (figura 1.10A).

Dall'altro lato è proposto un sistema dove TRCs individuali siano sintonizzabili su



**Figura 1.10. Modelli proposti nella trasmissione dell'informazione dello stimolo gustativo dalle taste receptor cells dei taste buds al cervello attraverso i nervi afferenti.** (Figura tratta da "The receptors and cells for mammalian taste", Chandrashekar et al., 2006)

modalità gustative multiple incrociate, per cui ogni fibra potrebbe trasmettere l'informazione per diverse qualità di gusto (figura 1.10B). Oppure che le TRCs percepiscano singole modalità gustative, ma le stesse fibre afferenti trasportano informazioni gustative multimodali (figura 1.10C). La questione della codificazione del segnale gustativo ha indirizzato la ricerca ad indagini di modificazione genetica e studi elettrofisiologici e comportamentali.

Attraverso studi di elettrofisiologia il recording delle singole fibre afferenti o delle cellule dei gangli ha indicato che mentre alcuni neuroni rispondono in maniera molto marcata a determinate qualità di gusto e debolmente a stimoli di altri gusti, in contrasto altri neuroni afferenti sono eccitati da stimoli gustativi multipli (Hellekant et al., 1997; Frank et al., 2008; Breza et al., 2010). Un tipo di risposta che presenta sia i tratti di un sistema dove TRCs sono rigidamente regolati (labelled-line model) che quello di cellule presinaptiche ad ampia regolazione (across-fibre model).

Il pattern di attività dei neuroni afferenti riflette l'eterogeneità della risposta cellulare dei taste buds (Gilbertson et al., 2001; Caicedo et al., 2002; Tomchik et al., 2007; Yoshida et al., 2009a; Breza et al., 2010) e suggerisce che l'attività neuronale codificante il gusto non segue la semplice logica di nervi afferenti dedicati. A favore del modello "labelled line" erano stati riportati i risultati della sostituzione dei recettori per l'amaro o per dolce con un recettore oppioide modificato (Zhao et al., 2003; Mueller et al., 2005). Nei topi modificati con il recettore di origine esterna nelle TRCs esprimenti i recettori del dolce i ligandi sintetici, che normalmente non darebbero alcuna percezione gustativa, vengono riconosciuti inducendo una forte preferenza per le soluzioni che li contengono, poiché veniva percepita come dolce. Contrariamente nel caso che il recettore oppioide fosse stato espresso nelle cellule esprimenti i recettori dell'amaro, il ligando veniva riconosciuto come fortemente repulsivo. Queste evidenze confermano la presenza dell'esistenza di TRCs dedicate alla trasmissione di specifiche qualità gustative, mentre l'esistenza di fibre afferenti dedicate rimane controversa. Le cellule gustative di Tipo II qualunque sia la loro specializzazione verso un gusto rispondono sempre secernendo ATP verso le fibre afferenti. Tuttavia mancano sinapsi distinte che colleghino le cellule recettoriali alle fibre sensoriali afferenti di modo da trasmettere un a singola qualità gustativa. Sebbene alcune di queste sembrano formare complessi intimamente collegati poiché trasmettano un solo segnale gustativo, altre fibre nervose trasmettono invece una molteplici qualità di gusto. Attualmente la questione di come esattamente l'informazione raccolta da distinte TRCs nei taste buds sia codificata per la percezione di distinte qualità gustative rimane materia di dibattito.

### **1.5.3. I cluster chemosensoriali**

In aggiunta ai taste buds le TRCs sono organizzate anche in organizzazioni cellulari più piccole, chiamate cluster chemosensoriali (CCs), strutture di piccole dimensioni, formate solo da 2 o 3 cellule chemorecettoriali. Sono state dapprima individuate nella laringe (Sbarbati et al., 2004b), dove nella parte più rostrale sono presenti anche alcuni taste buds (Nishijima e Atoji, 2004). Si tratta di una zona molto strategica, in cui i taste buds sono adattati a monitorare la presenza di materiali dissimili da soluzioni fisiologiche e hanno lo scopo di iniziare un riflesso protettivo delle vie aeree durante la deglutizione (Sbarbati et al., 2004a). L'immunoreattività verso  $\alpha$ -gustducin o PLC $\beta$ 2 ha identificato un citotipo simile alle cellule dei taste buds. Sono però più corte di quelle linguali, con processi basali poco sviluppati e il processo apicale più corto e fine. 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 con cellule ancillari,

facendo assomigliare queste strutture più ad un'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 (Sbarbati et al., 2004a). Inoltre ricordano molto i taste buds immaturi situati sulla lingua dopo la rigenerazione post nefrotomia (Kusakabe et al., 2002) o durante lo sviluppo. Infatti nella papilla vallata di ratto sono presenti SCCs durante la prima settimana di vita postatale, e nei giorni seguenti si sviluppano piccoli taste buds (Sbarbati et al., 1998, 1999) simultaneamente al rapido sviluppo di neuroni intrinseci e nervi (Sbarbati et al., 2000, 2002). Sia le SCCs che le cellule chemosensoriali dei clusters nella laringe sono localizzate in aree molto ricche di assoni intra-epiteliali, dato che supporta il loro ruolo di sentinella.

La presenza di altri cluster è stata riportata in topo nello stomaco lungo la linea di delimitazione (detta "limiting ridge" ) tra il *fundus* e il *corpus* (Hass et al., 2007). Infatti lì si trovano particolarmente densamente impacchettate cellule esprimenti  $\alpha$ -gustducin, PLC $\beta$ 2 e TRPM5. Nella medesima locazione erano state precedentemente identificate delle brush cells (Luciano e Reale, 1992). In stretta associazione con questi clusters sono state individuate una popolazione di cellule enteroendocrine contenente l'ormone che regola la sazietà grelina, e un'altra popolazione comprendente le cellule enterocromaffini secernenti serotonina. La disposizione delle CCs positive alla gustducina suggerirebbe una relazione con gli altri due tipi di cellule enteroendocrine con implicazioni non solo sui processi digestivi ma anche sul controllo della sazietà.

#### **1.5.4. Le cellule chemosensoriali solitarie**

Le SCCs sono la parte più consistente e nascosta del DCS. La scoperta della loro esistenza e della loro dislocazione in punti strategici di alcuni organi è rilevante. La loro presenza nell'apparato digerente rafforza ed estende l'idea di una sua autonomia dal sistema nervoso centrale (Gershon, 1999). Le funzioni del DCS sono in gran parte ancora sconosciute, anche se i legami con le cellule immunitarie e il sistema nervoso periferico suggeriscono un suo ruolo nella neurobiologia dell'immunità innata (Sbarbati et al., 2005). I tratti che accomunano tutti gli elementi del DCS sono i componenti della cascata di "signaling" della chemorecezione. Ora è evidente che rivestono altri ruoli oltre al controllo del cibo. Di seguito vengono riportate le attuali conoscenze sulla dislocazione e sulle funzioni dimostrate presunte nella cavità orale, nelle vie aeree e nell'apparato intestinale.

## **1.6. Il DCS nelle vie aeree**

### **1.6.1. Distribuzione delle SCCs**

Nelle vie aeree gli SCCs sono presenti in maniera abbondante ed estesa. Utilizzando l'immunoreattività verso la gustducina sono stati evidenziati nella cavità nasale (Zancanaro et al., 1999; Finger et al., 2003) e soprattutto nella laringe, dove sono molto numerosi formano uno specifico epitelio (Sbarbati et al., 2004a; Sbarbati et al., 2004b), e anche più distalmente SCCs nella trachea (vedere figura 1.11) (Merigo et al., 2005; Tizzano et al., 2006). Recentemente l'utilizzo di un altro marcatore collegato alla chemorecezione, il canale per "transient receptor potential melastatin 5" (TRPM5), ha permesso di caratterizzare nell'epitelio olfattivo un tipo di cellule non neuronali che differisce dalle cellule chemosensoriali solitarie e dai neuroni sensoriali olfattivi esprimenti TRPM5 (Lin et al., 2008b), ed è possibile che si tratti di una ulteriormente parte specializzata del DCS (Sbarbati et al., 2010).

Attualmente sono carenti studi riguardanti i polmoni, ma è nota da tempo la presenza delle brush cells, che sono da considerarsi una sottofamiglia delle SCCs, e che sono chiamate anche pneumoniti di tipo III (Sbarbati and Osculati, 2005b). Come precedentemente riportato la presenza di taste buds e cluster chemosensoriali è limitata alla porzione prossimale della laringe (Sbarbati et al., 2004b).

Nelle vie aeree il DCS coesiste con un altro sistema diffuso composto dalle "pulmonary neuroendocrine cells" (PNEC), specializzate cellule epiteliali situate nell'epitelio respiratorio nasale, nella mucosa laringeale e dalla trachea ai polmoni, che sono localizzate come cellule solitarie o sotto forma di clusters chiamati "neuroepithelial bodies" (NEB), e sono dedicate al monitoraggio della concentrazione di ossigeno (Adriaensen et al., 2006). Lo studio delle reciproche relazioni è interessante poiché le funzioni dei due sistemi potrebbero parzialmente integrarsi. Nei rettili è stata già dimostrata la coesistenza di due sistemi differenti sistemi chemosensoriali nella cavità nasale, il sistema olfattivo e le SCCs (Hansen, 2007).

### **1.6.2. Analisi chimica dell'aria inalata**

#### **1.6.2.1. La superficie fluida delle vie aeree**

Tra le possibili funzioni dei chemorecettori nelle vie aeree la più ovvia è l'analisi dell'aria inalata, che può contenere i più svariati composti. A causa della loro grande varietà chimica il monitoraggio è complesso ed avviene in più passaggi. Inizialmente avviene la valutazione da parte dell'epitelio olfattivo, per cui i composti presenti generano sensazioni chiamate odori. Le sensazioni trasmesse dalle terminazioni nervose libere del nervo vago o trigemino sono generalmente descritte come

irritazione o paura. La sensazione di irritazione è mediata anche da SCCs esprimenti gustducina nella cavità nasale (Finger et al., 2003), che svolgono un ruolo di sentinelle verso sostanze pericolose. La scoperta delle SCCs in posizione più distale nelle vie aeree suggerisce che l'analisi della composizione dell'aria avvenga anche più a valle. Nella trachea è stato evidenziato un alto numero di cellule chemorecettoriali (Merigo et al., 2005).

I composti esogeni sono dissolti sulla superficie fluida delle vie aeree (AFS) e sono trasportati dall'apparato mucociliare verso la zona prossimale. Durante il loro trasporto le sostanze entrano in contatto con le terminazioni apicali di cellule chemosensoriali che esprimono recettori GPCRs, come per esempio quelli dell'amaro (Shah et al., 2009). Le vie aeree necessitano di un sistema di controllo ulteriore all'epitelio respiratorio perché le particelle di piccole dimensioni non vengono trattenute dalla cavità nasale e possono facilmente raggiungere gli alveoli polmonari. Qui vengono disciolte nell'AFS che è ricco in "binding protein", e possono venire monitorate anche in fase post inalatoria. Comunque è possibile che gli SCCs interagiscano in maniera cross-modale con l'olfatto, poiché è stato riportato che SCCs esprimenti TRPM5 sono state mostrate essere responsive verso composti chimici amari e odorosi e sono state trovate dislocate in stretta vicinanza alle fibre del nervo trigemino (Lin et al., 2008a).

#### **1.6.2.2. La rilevazione di xenobiotici**

Il velo di muco che ricopre il tratto respiratorio è originato da cellule secretorie disperse fra le cellule della mucosa, o da ghiandole sotto la mucosa, e protegge la mucosa dalla disidratazione (Rubin, 2002) ed è divisibile in due superfici di diversa viscosità. La parte esterna è un gel viscoso e elastico (muco contenente glicoproteine) addossato alla parte solubile, formata da siero (Foster, 2002). Perciò il muco, propulso dalle cellule ciliate, fluisce al di sopra del siero e contiene cellule sfaldate e i composti xenobiotici (cioè di origine esterna) con cui è giunto in contatto. Stimoli sensoriali aumentano la secrezione di muco e causano bronco costrizione (colpo di tosse) (Foster, 2002). Poiché fra i composti xenobiotici ve ne sono diversi di tossici, la possibilità di monitorarli rappresenta un vantaggio evolutivo per i mammiferi (Bonnefoi et al., 1991). Sia il sistema olfattivo principale che accessorio segnala la loro presenza grazie neuroni connessi tramite sinapsi ai bulbi olfattivi, e quindi induce risposte comportamentali. Il DCS è più probabilmente coinvolto in risposte di tipo locale come la secrezione esocrina ed endocrina, della vasomotilità, della broncomotilità e del controllo mucociliare.

#### **1.6.2.3. La rilevazione di irritanti**

La capacità di rilevare irritanti è una caratteristica comune a tutte le superfici mucosa ed in genere

avviene tramite terminazioni nervose libere localizzate nel tessuto connettivo. In alcuni casi, come riportato nella laringe (Sbarbati et al., 2004a) queste terminazioni nervose possono entrare nella superficie epiteliale e avere contatti con cellule specializzate. Il ruolo degli SCCs nella rilevazione degli irritanti è stato studiato nella cavità nasale rilevando la presenza degli elementi classici della traduzione del gusto (gustducina, PLC $\beta$ 2, TRM5 e recettori dell'amaro) (Finger et al., 2003), dati che hanno suggerito che gli SSCs fossero cellule recettoriali che mediano la risposta del nervo trigemino ai ligandi del recettore dell'amaro. Più recentemente è stato confermato che gli SCCs rispondono con l'incremento del calcio intracellulare (cioè la via classica della trasduzione del segnale di gusto amaro) in risposta ad alcune sostanze amare o ad alcuni stimolanti del nervo trigemino (Gulbransen et al. 2008a). Questo ritrovamento limita la capacità di rilevazione delle SCCs situate nella cavità nasale ad un range limitato di composti tossici.

### **1.6.3. Analisi chimica dell'aria espirata**

L'aria esalata contiene grandi quantità di composti organici volatili, che derivano principalmente dal sangue (Rumchev et al., 2007) e fanno sperare di essere dei promettenti marcatori delle condizioni fisiologiche e patologiche (Belda-Iniesta et al., 2007). La disposizione delle SSCs potrebbe avere un ruolo nel monitoraggio di questi composti ma attualmente è solo una ipotesi (Sbarbati et al., 2010).

### **1.6.4. Controllo microbico**

Appare invece probabile che il DCS potrebbe essere coinvolto nell'analisi di composti prodotti provenienti dalla mucosa respiratoria stessa, che anche a causa dell'esposizione a sostanze pericolose ed attacchi microbici ha una continua rigenerazione del tessuto epiteliale e connettivo. Processi di necrosi o apoptotici liberano ingenti quantità di composti di origine cellulare e microbica. Fra questi ultimi sono presenti metaboliti utilizzati nella comunicazione fra i batteri. La loro rilevabilità fornirebbe una risposta alternativa a quella mediata dalle cellule immunitarie e collegata a meccanismi di secrezione (Merigo et al., 2007).

La classe dei recettori dell'amaro è composta da diversi geni, che nel complesso sono capaci di rilevare un'ampia varietà di composti chimici. Probabilmente gli SCCs si sono specializzate nell'esprimere maggiormente quei recettori che non sono attivati dai composti amari classicamente collegati all'alimentazione. Per esempio il recettore per l'amaro hTAS2R46, è specializzato a riconoscere un'ampia varietà di sostanze come i lattoni e i diterpenoidi, come il denatonium benzoato, mentre non risponde ad altre sostanze amare (Brockhoff et al., 2007). Lattoni e

diterpenoidi sono prodotti anche dai batteri, incluso il patogeno respiratorio *Pseudomonas aeruginosa* (Fuqua et al., 1994). Nella cavità nasale questo tipo di monitoraggio dei batteri, tramite la percezione dei loro metaboliti da parte delle SCCs, eliciterebbe risposte protettive come lo starnuto per espellere i batteri dalla cavità nasale o l'apnea per evitare di inalare ulteriori batteri (Baraniuk and Kim, 2007). Più distalmente gli SCCs potrebbero attivare meccanismi protettivi locali atti ad inattivare i metaboliti batterici (Chun et al., 2004) o ad accelerare l'attività mucociliare per diluire i batteri (Lindberg et al., 1987).

### **1.6.5. Monitoraggio dei fluidi provenienti dai polmoni**

Il materiale presente nell'AFS e l'AFS stesso non è necessariamente prodotto localmente, ma può provenire dai polmoni, venire trasportato dal sistema mucociliare ed essere monitorato in una zona più prossimale. In base a questa considerazione la presenza di un sistema sensoriale concentrato nella trachea potrebbe controllare in modo vantaggioso lo stato dell'ampia superficie alveolare. Comunque come anticipato all'inizio nell'introduzione la presenza di brush cells è stata descritta nell'epitelio alveolare dei polmoni da diversi studi (Meyrick e Reid, 1968; Luciano et al., 1969; Hijjiya et al., 1977; Allan, 1978; Filippenko, 1978; Hijjiya, 1978; Foliguet e Grignon, 1980; Chang et al., 1986). La loro immunoreattività alla citocheratina 18 e alla villina le rende identificabili anche al microscopio (Kasper et al., 1994).

### **1.6.6. Monitoraggio materiale proveniente dalla faringe**

Il materiale che viene riflesso dall'esofago in condizioni patologiche (esofagite, asma), o saliva e cibo potrebbe entrare nelle vie aeree durante la deglutizione. La mucosa della laringe presenta un epitelio sensoriale ricco in SCCs (Sbarbati et al., 2004a). In questa limitata porzione delle vie aeree il DCS è molto sviluppato comprendendo anche taste buds e clusters chemosensoriali suggerendo una capacità analitica molto accurata. Questa struttura è probabilmente collegata alla difesa delle vie aeree dall'introduzione di materiale pericoloso causando un riflesso di tosse.

### **1.6.7. Possibile modulazione del sistema immunitario**

Uno dei ruoli maggiormente intriganti del DCS è la sua possibile partecipazione ai meccanismi di difesa immunitaria (Sbarbati and Osculati, 2006; Gulbransen et al., 2008a)

Sia le cellule chemorecettoriali che immunitarie sono esposte ai microrganismi e la sinergia tra i due sistemi potrebbe essere mediata da citochine o altri composti. Recentemente è stato dimostrato che nelle vie aeree cellule immuno-reattive per la gustducina e  $PLC\beta 2$  colocalizzano con proteine secretorie delle cellule di Clara (CCSP), le CC10 e le CC26 (rispettivamente di 10 e 26 kDa) (Merigo et al., 2007). Poiché le CCSP mediano la comunicazione tra le cellule secretorie, le cellule ciliate e i macrofagi (Reynolds et al., 2007), la presenza di CCSP in elementi del DCS suggerirebbe che le SCCs potrebbero integrare i meccanismi di difesa.

Diversi pericolosi patogeni per comunicare e coordinare la loro attività utilizzano composti di segnalazione extracellulare come autoinduttori. Quando questi autoinduttori raggiungono una certa concentrazione, dovuta al numero di batteri cospecifici presenti, vengono attivate determinate batterie di geni che per esempio possono attivare la virulenza. Questa strategia di segnalazione, detta “quorum sensing” è coinvolta anche nella maturazione di biofilm resistenti agli antibiotici (Kolter, 2005).

Il DCS ha le capacità di intercettare le comunicazioni di quorum sensing e far partire una risposta localizzata basata su sistemi di difesa non immunitari (per esempio diluendo o rimuovendo le molecole segnale e i batteri, secernendo agenti antibiotici) prima che si scateni la virulenza. Dati ottenuti nel nostro laboratorio suggeriscono che le cellule del DCS siano attivate dagli acil-lattoni, che sono fattori di quorum sensing per i batteri Gram negativi (Sbarbati et al., 2009).

### **1.6.8. Possibile modulazione della secrezione esocrina**

La colocalizzazione di cellule immunoreattive alla gustducina e  $PLC\beta 2$  nelle vie aeree con le CC10, le CC26 e con “cystic fibrosis trans-membrane regulator” (CFTR), che sono considerati marcatori di secrezione nelle vie aeree, ha spinto a considerare un possibile ruolo secretorio del DCS stesso (Merigo et al., 2007). Per testare questa ipotesi è stata testata l’espressione degli stessi marcatori nella papilla vallata tramite tecniche di RT-PCR, immunistochimica e microscopia confocale. I risultati (per maggiori dettagli vedere la sezione risultati e discussione) mostrano che nei taste buds della papilla vallata CFTR, CC10 e CC26 sono espressi in un subset di TCRs immunoreattive alla gustducina (Merigo et al., 2008). Questa evidenza conferma che i processi di chemorecezione e secrezione possono essere correlati. Infatti risposte secretorie risultano inducibili tramite l’inalazione di composti amari volatili o l’amministrazione diretta degli stessi nelle vie aeree (Boschi et al., 2008). Questa azione di induzione della secrezione da parte di composti amari era peraltro ben nota a livello intestinale. Rimane però ancora sconosciuto l’esatta natura del legame fra chemorecezione e secrezione.

### 1.6.9. Altre funzioni ipotizzabili

Altri possibili ruoli del DCS potrebbero essere la connessione fra chemorecezione e movimento ciliare. Questa ipotesi è supportata dal fatto che recettori dell'amaro sono localizzati anche sulle ciglia dell'epitelio delle vie aeree, e che queste reagiscono ad uno stimolo amaro (al denatonium) aumentando la loro frequenza di movimento (Shah et al., 2009).

Un'altra ipotesi che è supportata solo da considerazioni morfologiche, è che le cellule chemorecettoriali possano controllare la bronco-costrizione (Sbarbati and Osculati, 2005a; Sbarbati and Osculati, 2005b).



**Figura 1.11. SCC immunoreattiva alla  $\alpha$ -gustducina in trachea di ratto.**

(Figura tratta da "A new fate for old cells brush cells and related element", Sbarbati e Osculati, 2005)

## **1.7. Il DCS nell'apparato digerente**

A livello del tratto gastro-intestinale (GI) ogni cambio del contenuto luminale modula le funzioni del GI, come la velocità di assorbimento, il senso di sazietà e la protezione contro sostanze pericolose. Eccetto riflessi locali, tutte le risposte del GI agli stimoli vengono percepiti dal sistema nervoso centrale (Tracy et al., 2004). Per esempio effetti post-ingestivi sono in grado di influenzare la preferenza per un cibo a prescindere dal grado di palatabilità, e anche in assenza di essa (de Araujo et al., 2008). In passato l'idea che nell'apparato digerente fossero presenti dei recettori era stata, come precedentemente introdotto, costruita solo sulle basi di dati ultrastrutturali che suggerivano che le brush cells avessero un ruolo nella chemorecezione dei composti presenti nel lume. Con la disponibilità di marcatori immunologici come la gustducina e della biologia molecolare il ruolo chemosensoriale di queste cellule è stato confermato (Hofer et al., 1996). La distribuzione di questi elementi è in certi casi molto ben definita. Regioni molto ricche in elementi del DCS sono particolarmente situate nelle interfacce tra differenti ambienti, come la “limiting ridge” nello stomaco di ratto (Luciano and Reale, 1992). La presenza del DCS nell'apparato digerente è di particolare interesse poiché esso può interagire con un ben sviluppato sistema nervoso periferico e un diffuso sistema endocrino.

È opportuno fare una considerazione anatomica. Mentre le vie aeree presentano una continuità fisica del DCS fra la cavità orale e la trachea, attraverso la laringe, che mostra anche strutture di transizione fra i taste buds e le SCCs, per quanto riguarda l'apparato digerente tale continuità è interrotta dall'esofago. Infatti l'esofago è caratterizzato da un epitelio squamoso stratificato dove non sono presenti cellule chemosensoriali. Una grande differenza fra i taste buds e le SCCs e la differenza di innervazione (Finger et al., 2005), che per i taste buds è molto abbondante.

### **1.7.1. Elementi tipici delle TCRs sono presenti nelle SCCs**

Diversi ritrovamenti hanno mostrato l'esistenza di percezione del gusto grazie alla coespressione di diverse proteine coinvolte nel signaling del gusto in cellule epiteliali solitarie nell'intestino. È stata riportata in topo e la presenza e in parte la colocalizzazione di TAS1R1, TAS1R3, TRPM5, e  $\alpha$ -gustducin in SSCs nell'epitelio di colon e soprattutto nelle “tuft cells” dei villi duodenali, che ha suggerito l'implicazione di queste cellule nella rilevazione degli L-aminoacidi (Bezencon et al., 2007). In topo diversamente dai TRCs, la maggior parte di queste cellule non esprimono PLC $\beta$ 2, suggerendo che vi sia un differente pathway di trasduzione segnale. Inoltre esperimenti di PCR hanno trovato che il recettore del dolce (TAS1R2) manchi nello stomaco e tutto l'intestino sia in uomo che nel topo

### **1.7.2. Presenza di proteine legate al gusto in altri tipi di cellule**

In ratto (nel digiuno) risultano espressi tutti i TAS1Rs e colocalizzano l'uno con l'altro e con la gustducina, la trasducina o il PLC $\beta$ 2 (diversamente dal topo) (Mace et al., 2007). La presenza dei TAS1Rs è stata trovata oltre che nelle SCCs, anche sulla superficie apicale degli enterociti e in punti strategici come le cellule di Paneth. È rilevante il ritrovamento degli stessi autori della risposta simultanea del sistema di chemorecezione gustativo con quello di assorbimento dello zucchero (GLUT2) che viene attivata non solo da saccaridi ma anche da dolcificanti artificiali.

Nello stesso anno viene riportata in topo una interessante coespressione in cellule epiteliali solitarie situate sulla parte superiore dei villi soprattutto nel digiuno, fra la gustducina e il glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (27%) e la serotonina (15%). Queste cellule hanno una distinta morfologia e pattern di marcatura della gustducina rispetto le rimanenti, dati che suggeriscono l'esistenza di un subset di cellule enteroendocrine che esprimono gustducina. La situazione di coesistenza fra cellule chemosensoriali e cellule enteroendocrine suggerisce una possibile azione sinergica. Una interazione simile risulta probabile lungo la linea di delimitazione (detta "limiting ridge" ) tra il *fundus* e il *corpus* in topo, dove sono strettamente associati clusters chemosensoriali e 2 popolazioni di cellule enteroendocrine, una produttrice grelina, l'altra serotonina. (Hass et al., 2007).

### **1.7.3. Il ruolo del DCS nell'apparato digerente**

La capacità di "sensing" molecolare delle cellule gastrointestinali ha un ruolo fondamentale nel controllo di diverse funzioni necessarie alla digestione in risposta all'arrivo dei nutrienti. Ad iniziare da vie ormonali e/o neuronali che regolano la quantità del cibo assunto, la secrezione pancreatica di insulina, il livello di assorbimento e la motilità intestinale. Di grande interesse è la capacità del GI di monitorare la presenza dei nutrienti tramite i recettori GPCRs che nella cavità orale percepiscono i gusti di dolce, umami e amaro. Per esempio lo svuotamento gastrico potrebbe essere controllato in parte anche dalla "limiting ridge" (Hass et al., 2007). La presenza nell'intestino di SCCs esprimenti i recettori dell'amaro sembra avere un importante ruolo nella rilevazione di composti pericolosi e tossine (Rozengurt, 2006), mentre i recettori per il dolce e l'umami hanno un ruolo nel rilevare i nutrienti e nella regolazione del loro assorbimento (Mace et al., 2009). Queste due funzioni sono state oggetto di studio di questa tesi e verranno approfondite nella discussione.

#### **1.7.3.1. Secrezione salivare**

Il riflesso della secrezione salivare è in parte mediata da riflessi centrali che coinvolgono il cervello (Baum, 1987; Garrett, 1987), ed è correlata alla stimolazione dei taste buds (Matsuo, 2000). In

particolare la ghiandola di von Ebner e la soprastante papilla circumvallata rappresentano un esempio di organo sensoriale effettore di secrezione (Sbarbati et al., 1999a; Sbarbati et al., 1999b). Infatti questa struttura è complessivamente formata da una porzione sensoriale (l'epitelio gustativo), un centro integrativo (ganglio di Remak) e una porzione secretoria (ghiandola di Von Ebner). La relazione fra queste parti è così stretta che i taste buds potrebbero essere considerati impiantati nei dotti escretori della ghiandola di Von Ebner (Sbarbati et al., 2002). Questo tipo di struttura rende razionale la presenza di meccanismi di rilevazione ulteriori rispetto quelli del gusto, possibilità che sono tuttora valutate dal nostro gruppo di ricerca. Comunque data la disposizione dell'epitelio gustativo appare evidente che ci possa essere un monitoraggio della saliva secreta dalla ghiandola di Von Ebner.

### **1.7.3.2. Secrezione enterica e biliare**

Anche la secrezione enterica e biliare e pancreatico potrebbe venire vagliata dal DCS (Sbarbati et al., 2010). Infatti la presenza delle SCCs in ghiandole dislocate in diverse parti del corpo e la loro collocazione nella porzione prossimale non solo nelle ghiandole salivari, ma anche nei dotti dei sistemi biliari (Toyono et al., 2007) e pancreatici (Hofer e Drenckhahn, 1998) e nelle ghiandole enteriche (Rozengurt e Sternini, 2007) suggerisce la possibilità di monitoraggio dei fluidi secreti. Si tratta di ipotesi che andrebbero verificate tramite studi funzionali, in particolar modo per quanto riguarda il possibile monitoraggio della composizione della bile (la cui sovrapproduzione è collegata a diverse malattie) da parte di SCCs situate nei dotti intra-epatici della bile che esprimono i recettori del dolce e dell'umami (TAS1R1, TAS1R2 e TAS1R3) (Toyono et al., 2007).

### **1.7.3.3. Controllo della flora batterica**

Il lume del tubo enterico è sede di diversi micro-ambienti che ospitano un largo numero di microrganismi. A causa della densità e della maggior diversità fra le diverse specie presenti, la popolazione microbica intestinale crea maggiori disturbi di quella presente nelle vie aeree. Le differenti porzioni dell'apparato intestinale ospitano una differente flora batterica, e sebbene la progressione dei nutrienti sia continua devono essere separate.

È interessante notare che i punti di "giunzione" fra un micro-ambiente e l'altro sono equipaggiati con batteri di SCCs, che vanno a costituire dei punti di controllo del contenuto luminale. La proposta che il DCS abbia un ruolo nell'immunità innata e nel controllo della microflora batterica è quindi ben sostenuta da un punto di vista anatomico (Sbarbati and Osculati, 2006).

#### **1.7.3.4. Secrezione endocrina**

La possibile interazione degli SCCs con elementi endocrini nel sistema digerente è stata recentemente esplorata. Questa associazione appare particolarmente evidente nel colon, dove l'espressione di elementi legati alla percezione gustativa è abbondante (Sternini, 2007). Nel modello corrente le cellule enteroendocrine della mucosa agiscono come chemorecettori primari dei cambi dell'ambiente luminale e in risposta rilasciano molecole segnale che attivano le terminazioni nervose. In topo è stata riportata l'espressione di recettori della famiglia dei TAS2Rs, gustducina e trasducina sia nei tratti del GI che in cellule enteroendocrine. Esperimenti di stimolazione con due sostanze amare classiche (il denatonium benzoato e il feniltiocarbammide) di una linea cellulare murina di cellule endocrine del colon (le STC-1 cells) hanno dimostrato che la risposta avviene, come nelle cellule gustative, con un incremento del calcio intracellulare e che induce la secrezione di colecistochinina (CCK) (Chen et al., 2006), un ormone che induce senso di sazietà e riflessi inibitivi dello svuotamento gastrico attraverso la stimolazione dei nervi vagali afferenti attivando i recettori CCK-1 o CCK-A (Glatzle et al., 2003).

#### **1.7.3.5. Sensing del glucosio e modulazione dell'assorbimento**

Ultimamente sta prendendo corpo l'evidenza che meccanismi di chemorecezione simili a quelli linguali stanno sono coinvolti nel sensing del glucosio e nella regolazione del suo assorbimento (Dyer et al., 2007). Questa azione sembra operare a diversi livelli e modificare l'assorbimento agendo sui trasportatori dedicati all'uptake degli zuccheri, come sodium-dependent glucose transporter isoform 1 (SGLT1) (Dyer et al., 2007) o il facilitative glucose/hexose transporter isoform 2 (GLUT2) e 5 (GLUT5) (Mace et al., 2007).

La composizione del contenuto luminale varia considerevolmente a seconda della dieta ed è quindi importante che l'epitelio intestinale sia in grado di percepire questi importanti cambi e regolare le proprie funzioni a seconda della situazione.

Particolarmente significativa è la modificazione della capacità di assorbimento dei monosaccaridi attraverso SGLT1, che è un canale trasportatore di glucosio sodio dipendente, che permette agli enterociti di trasportare attraverso la membrana apicale il D-glucosio presente nel lume importando anche ioni sodio.

Evidenze sperimentali suggeriscono che lo zucchero luminale è percepito da recettori GPCRs esposti sul lume delle cellule enteroendocrine che azionando pathway tipici della percezione gustativa e in ultimo incrementano l'assorbimento del monosaccaride. Questo avviene tramite l'aumento dell'espressione di SGLT1, il cui livello espressivo risulta direttamente regolata in funzione del cambio della concentrazione luminale dello zucchero (Dyer et al., 2007), e sembra

mediato dal rilascio di un ormone paracrino da parte delle cellule endocrine che agisce sugli enterociti circostanti (Shirazi-Beechey et al., 2011).

Oltre a questa via di trasporto attivo esiste la via del GLUT2, una proteina “carrier” transmembrana che trasporta il glucosio attraverso le membrane in maniera passiva. Anche questo tipo di trasporto è stimolato dalla presenza di zuccheri che percepiti TAS1Rs, attraverso l’attivazione di gustducina, transducina e PLC $\beta$ 2 in ultima via stimola la diffusione apicale di GLUT2 (Mace et al., 2009).

L’osservazione che anche i dolcificanti artificiali agiscano su questi tipi di trasporto (Mace et al., 2007) li rende nutrizionalmente attivi, poiché incrementando la percezione gustativa intestinale del dolce aumentano la capacità di assorbimento degli zuccheri presenti. La presenza dei TAS1Rs appare determinante in questo processo di regolazione, poiché topi TAS1R3 knockout o gustducina knockout non sono sensibili ad un incremento espressivo di SGLT1 da parte di zuccheri o dolcificanti (Margolskee et al., 2007). Non soltanto l’espressione di SGLT1 risulta inducibile, ma i trasportatori solubili GLUT2 e GLUT5 vengono non solo indotti a diffondere sulla membrana apicale, ma ne viene anche aumentata l’espressione in colture di enterociti (Le Gall et al., 2007).

Questa modulazione di espressione è stata utilizzata per verificare a livello intestinale quale fosse la risposta diete arricchite con alcuni alimenti, in uno studio condotto dal nostro gruppo con lo scopo di studiare l’impatto dei cibi sulla salute (per i dettagli vedere la discussione).

#### **1.7.3.6. Modulazione della secrezione di GLP-1**

Il rilascio di GLP-1 da parte delle cellule endocrine L in risposta al glucosio regola l’appetito, la secrezione di insulina e la motilità intestinale. È stato riportato che anche le L cells esprimano i recettori del dolce, la gustducina e altri elementi della traduzione del gusto (Jang et al., 2007). Topi knockout per il gene della gustducina in seguito ad ingestione di zuccheri risultano avere delle deficienze nella secrezione di GLP-1 e nella regolazione dell’insulina e del glucosio nel sangue. Un risultato simile è ottenuto bloccando recettori del dolce intestinali con l’agonista lactisole. In aggiunta anche in questo caso i dolcificanti artificiali elicitano una risposta. È quindi evidente che anche in questa via di segnalazione ormonale lo zucchero è percepito tramite meccanismi uguali a quelli gustativi.

## 2. SCOPO DELLA TESI

La presenza di cellule chemosensoriali solitarie (SCCs) in tutti i tessuti di origine endodermica è di particolare interesse perché permettono il monitoraggio di diverse sostanze e agiscono sulla modulazione della secrezione, dell'assorbimento e della risposta immunitaria.

Il nostro gruppo di ricerca da tempo individua e caratterizza le SCCs in base alla presenza di elementi marcatori delle cellule gustative e della morfologia ultrastrutturale con tecniche di immunoistochimica, microscopia confocale al laser e microscopia elettronica, trovando evidenze che hanno portato a definire il concetto di DCS.

Inoltre in base all'osservazione che le SCCs colocalizzano con elementi coinvolti nella secrezione o nell'assorbimento, si sta indagando se le cellule gustative e gli epitelii chemosensoriali esprimono anche quel tipo di elementi.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare i sistemi chemosensoriali diffusi coadiuvando le tecniche di immunoistologia e ricercando nuovi marcatori da studiare.

Da un lato l'utilizzo della tecnica di western blot consente di verificare la specificità della proteina legata dall'anticorpo utilizzato nell'immunoistochimica e confermare le positività trovate, dall'altro l'utilizzo della tecnica della RT-PCR e il disegno di primer gene-specifici permette di indagare la presenza di diversi trascritti genici in differenti tessuti anche in maniera semi-quantitativa.

Inoltre tramite il clonaggio degli stessi frammenti amplificati è possibile realizzare sonde di RNA per effettuare marcature istologiche attraverso la tecnica della ibridazione *in situ*, necessaria nel caso in cui non siano disponibili anticorpi, come per i recettori Tas2Rs.

Poiché nel nostro gruppo di ricerca si è reso necessario valutare anche l'effetto di alcune diete alimentari su modelli animali, è stata indagata la modulazione dei trascritti genici riguardanti il sensing e l'assorbimento intestinale. I risultati ottenuti hanno richiesto di approfondire mediante real time PCR un ancora poco studiato sistema di induzione della saziazione che ha diversi riscontri sia dal punto di vista della tutela della salute che come target di farmaci.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 RT-PCR

La RT-PCR è un utilizzo della PCR che permette di studiare espressioni geniche poiché non amplifica sequenze di DNA genomico ma solo quelle degli RNA trascritti. L'RNA viene dapprima estratto e poi retrotrascritto in vivo a cDNA, che farà da template per la PCR.

##### 3.1.1. Estrazione e purificazione RNA totale da tessuto

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. Vortex 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  $\mu\text{L}$  di acqua), misurare con Biofotometro e utilizzare la media delle tre letture come concentrazione dell'RNA espressa in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (rapporto A260/280 non deve essere < 1.6). Caricare 1 $\mu\text{g}$  di ogni campione su gel di agarosio al 2% per visualizzare la qualità dell'RNA (x  $\mu\text{L}$  di RNA + 1  $\mu\text{L}$  di 30% Glicerolo e portare a volume di 6  $\mu\text{L}$  con acqua).

### 3.1.2 Produzione del cDNA

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 o con random hesamers:

#### (1) Digestione con DNasi I

Per ogni campione si faranno 4 ripetizioni dove 2 prevedono la presenza di oligo dT e di random hesamers 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 assicurarsi che gli ampliconi prodotti con le successive PCR saranno ottenuti da uno stampo di cDNA e non di DNA genomico non digerito completamente:

- 1  $\mu\text{g}$  di RNA dove si aggiungeranno oligo dT e enzima RT superscript II;
- 1  $\mu\text{g}$  di RNA dove si aggiungeranno oligo dT senza enzima RT superscript II;
- 1  $\mu\text{g}$  di RNA dove si aggiungeranno random hesamers e enzima RT superscript II;
- 1  $\mu\text{g}$  di RNA dove si aggiungeranno random hesamers senza enzima RT superscript II.

Per la produzione di sonde, clonaggio e amplificazione di ampliconi lunghi sono stati utilizzati gli oligo dT in modo da avere

successivamente dei prodotti di PCR migliori

Retrotrascrizione RNA digerito con DNasi:

- 2  $\mu\text{g}$  di RNA a cui si aggiungeranno oligo dT e enzima RT superscript II;
- 2  $\mu\text{g}$  di RNA a cui si aggiungeranno oligo dT senza enzima RT superscript II (controllo RT-);

Quindi si prendono 4  $\mu\text{g}$  di RNA per ogni campione e si procede alla digestione del DNA con la DNasi I:

- x  $\mu\text{L}$  di RNA corrispondenti ai 4  $\mu\text{g}$  sopra citati;
- 4  $\mu\text{L}$  di 10X DNasi I reaction buffer;
- 4  $\mu\text{L}$  di enzima DNasi I;
- x  $\mu\text{L}$  di acqua RNasi free per portare il volume a 40  $\mu\text{L}$ .

Si mescola bene pipettando la soluzione e si lascia agire l'enzima per 15 min a RT. Si aggiungono 4  $\mu\text{L}$  di 25 mM EDTA ad ogni reazione per bloccare l'azione dell'enzima e si mette a  $65^\circ\text{C}$  per 10min. Ora l'RNA è pronto per la retrotrascrizione (abbiamo per ogni campione 44  $\mu\text{L}$  di RNA senza DNA).

## (2) Sintesi del first strand cDNA

Questa procedura è studiata per convertire da 1 ng fino a 5  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{L}$  di RNA ottenuto nel passaggio con DNasi I

~ 2  $\mu\text{L}$  di 10 mM dNTPs mix

~ 2  $\mu\text{L}$  di 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Oligo (dT)12-18

Per la reazione senza RT superscript II

~ 8  $\mu\text{L}$  di RNA ottenuto nel passaggio con DNasi I

~ 1  $\mu\text{L}$  di 10 mM dNTPs mix

~ 1  $\mu\text{L}$  di 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Oligo (dT)12-18

Incubare a  $65^\circ\text{C}$  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 $\mu\text{L}$   | 6 $\mu\text{L}$  |
| ~ 25 mM MgCl <sub>2</sub>              | 4 $\mu\text{L}$   | 12 $\mu\text{L}$ |
| ~ 0.1 M DTT                            | 2 $\mu\text{L}$   | 6 $\mu\text{L}$  |
| ~ RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor | 1 $\mu\text{L}$   | 3 $\mu\text{L}$  |

Aggiungere 18  $\mu\text{L}$  della mix di reazione ai 20  $\mu\text{L}$  di RNA + dNTPs + Oligo dT che serviranno per la reazione con enzima RT superscript II e aggiungere 9  $\mu\text{L}$  della mix di reazione ai 10  $\mu\text{L}$  di RNA + dNTPs + Oligo dT che serviranno per la reazione senza enzima RT superscript II. Mescolare gentilmente e spinnare. Incubare a  $42^\circ\text{C}$  per 2 min.

3. Aggiungere 2  $\mu\text{L}$  di enzima RT superscript II (100 unità in questo caso) nei tubini che prevedono l'aggiunta dell'enzima, mescolare e incubare a  $42^\circ\text{C}$  per 50 min.

4. Terminare la reazione mettendo a  $70^\circ\text{C}$  per 15 min per inattivare l'enzima. Mettere in ghiaccio immediatamente.

5. Spinnare i tubini e aggiungere 2  $\mu\text{L}$  di RNasi H nei tubini che prevedevano

l'aggiunta dell'enzima RT superscript II e 1  $\mu\text{L}$  di RNasi H nei tubini che non prevedevano l'aggiunta dell'enzima. Incubare per 20 min a  $37^\circ\text{C}$  e conservare in aliquote a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.1.3. Reazione di 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 o Promega (Germania) o Genespin (Italia) del tipo Hot Taq

L'enzima è una proteina di fusione fra l'enzima stesso e una sequenza che lo inibisce, o alternativamente ha un sito di bloccaggio da parte di un anticorpo. Fino a quando una temperatura molto denaturante ( $95^\circ\text{C}$ ) non toglie l'inibizione e permette all'enzima di amplificare la reazione della polimerasi non parte. I prodotti aspecifici vengono così limitati, perché inizia a trascrivere solo dopo il primo ciclo di denaturazione del termociclatore evitando la formazione di innesti errati.

Il buffer di reazione utilizzato è stato di tipo autoregolante: un agente chelante rilascia il magnesio quando viene sequestrato dalla Taq garantendo una concentrazione ottimale dello stesso.

La mix di reazione è così composta:

|   |                   |
|---|-------------------|
| ~ Buffer di reazione 10x                          | 2.5 $\mu\text{L}$ |
| ~ Miscela di dNTPs 2mM                            | 2.0 $\mu\text{L}$ |
| ~ Ogni primers 10 $\mu\text{M}$                   | 1.0 $\mu\text{L}$ |
| ~ Hot Taq   | 0.5U              |
| ~ H <sub>2</sub> O RNasi free portare a volume di | 25 $\mu\text{L}$  |

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

- ~ La temperatura di denaturazione deve essere di almeno  $95^\circ\text{C}$  per la Hot Taq;
- ~ La temperatura di annealing o appaiamento dei primers con il templatò varia a seconda della coppia di primers considerata. La temperatura ottimale di annealing viene testata per ogni coppia di primers con delle PCR a gradiente di temperatura attorno alla temperatura consigliata dai programmi con cui sono stati realizzati ;
- ~ Il tempo di estensione varia a seconda della velocità di polimerizzazione della Taq utilizzata 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       | } 25-35 cicli |
| 2. Denaturazione       | a 95°C             | 30 sec      |               |
| 3. Annealing           | 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 15-30 min a 100V e si fotografa il gel al trans-illuminatore.

### 3.1.4. Visualizzazione degli ampliconi tramite separazione elettroforetica su gel

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 100V con amperaggio variabile per un tempo di corsa fra i 15 e i 30 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.

Composizione soluzione 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).

### 3.2 Produzione di sonde di RNA per la ibridazione *in situ*

Poiché la produzione di sonde di RNA *in vitro* non è una reazione di amplificazione, occorre produrre una gran quantità di DNA di stampo. Occorre amplificare il frammento di RNA tramite RT-PCR e poi procedere al clonaggio dello stesso con vettori plasmidici di espressione in *E. coli* chimicamente competenti. (È stato utilizzato il Kit TOPO TA CLONING della Invitrogen)

#### *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 <sub>2</sub> (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               |

I prodotti di amplificazione vanno controllati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio per vedere la qualità dei prodotti di PCR: si deve ottenere una singola banda. In caso di bande aspecifiche occorre isolare dal gel la banda corretta e purificare il prodotto di amplificazione con colonnine a scambio ionico direttamente da gel.

#### 3.2.1. Inserzione dell'amplicone nel vettore di inserzione

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 MgCl<sub>2</sub> 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 µL
- Soluzione di Sali 1 µL
- Acqua sterile portare a volume di 5 µL
- Vettore pCRII-TOPO 1 µL

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

### **3.2.2. Trasformazione delle cellule competenti e clonaggio**

#### *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 µg/mL (mg/L) di Ampicillina o 50 µg/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 µL 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 µL 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.
- Un 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).

### 3.2.3. 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 ibridano con l'inserto. Artefatti possono essere ottenuti a causa di mancanza di appaiamento o per un temprato 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 µL di mix e risospendervi 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 µg/mL di Ampicillina o 50 µg/mL di Kanamicina.
- Isolare una singola colonia e inocularla in 1-2 mL di terreno LB contenente 50 µg/mL di Ampicillina o 50 µg/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.

### **3.2.4. Preparare la maxyprep**

*Per fare la maxyprep:*

mettere in ghiaccio le cellule crioconservate fino a che non si scioglie un po' il liquido in superficie, prelevare con un puntale un po' 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.

### **3.2.5. Purificazione dei prodotti di PCR e clonaggio diretto**

*Purificazione dei prodotti di PCR e clonaggio diretto in 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 µL 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.

*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.

*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.

### **3.2.6. Lisi delle cellule e recupero dei plasmidi**

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 il mescolamento 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.

### 3.2.7. Purificazione del DNA plasmidico de gel di agarosio

*Purificazione del DNA plasmidico da gel d'agarosio per separare la banda di interesse (con S.N.A.P. miniprep kit della Invitrogen)*

Preparare una soluzione di melting costituita da un 6M di NaI e un 10mM NaSO<sub>3</sub> in acqua RNAsifree 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, cetrifugare 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.

### 3.2.8. Excisione dell'inserto

*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.

### 3.2.9. 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.

### 3.2.10. Sequenziamento dei prodotti di PCR e dei plasmidi

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 di quale RNA polimerasi si necessiti 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 (conservare 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                      | } 2µL di DIG-dNTPs Mix |
| ATP 10 mM                      | 1 µL                      |                        |
| 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  $\mu\text{L}$  in totale.

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

Carico 2  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  rimasti dopo la corsa su gel (2  $\mu\text{L}$  di DNAsi per 20 min a 37°C). Come precedentemente fatto, carico 2  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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/ $\mu\text{L}$  con acqua RNAsi free e conservate a -80°C

### **3.3. Ibridazione *in situ***

*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 postfissa 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 H<sub>2</sub>O 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).

### **3.4. Preparazione sezioni istologiche**

#### *Produzione di sezioni su vetrino al criostato per ibridazione in situ (ISH)*

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 6-20µm alla temperatura di -20°C e si sistemano in modo seriale su dei vetrini carichi positivamente. Dopo aver raccolto tutte le sezioni necessarie, si lasciano qualche minuto ad asciugare a temperatura ambiente e si possono conservare per qualche settimana a -80°C.

### **3.5. Ibridazione della sonda**

Data la delicatezza e la fotosensibilità della sonda tutti i trattamenti e lavaggi in jar di vetro sono effettuati con soluzioni RNase free e al buio.

L'esperimento si divide in tre giorni.

#### 1. Primo giorno:

- 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 µg/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 ibridazione che aggiungeremo.
- Mettere i vetrini dentro ad un box umido e pipettare 50 µL di mix di ibridazione sopra ogni sezione.
- Ibridare 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 NBT/BCIP 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4
- 20X SSC: 3M NaCl, 300mM sodium citrate, portare a 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 sulphate, 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 MgCl<sub>2</sub>
- 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

### 3.6. Lista primer

Primer utilizzati nelle indagini di RT-PCR delle famiglie dei Tas1Rs e Tas2Rs e per la produzione di frammenti di cDNA utilizzabili per la produzione di sonde di RNA.

| gene                        | UniGene<br>Rn | forward              | reverse              | length  |
|-----------------------------|---------------|----------------------|----------------------|---------|
| $\alpha$ -Gustducin (Gnat3) | Rn.10456      | CTGCTCTGACGATCTATCTC | GGTCACTTACAGCTCACTTC | 1443 bp |
| Tas1R1 (rT1R1)              | Rn.92309      | CGGTTCACTGTTGAGGAGAT | CCTGAAGAACACTCTAGCCA | 618 bp  |
| Tas1R2 (rT1R2)              | Rn.222086     | CAGTTCTGCATAACCTCACG | CTTGTAGGACCACATGGAAC | 716 bp  |
| Tas1R3 (rT1R3)              | Rn.10456      | ATGTGCTACGCCAAGTGAAC | AGGTGAAGTCATCTGGATGC | 855 bp  |
| Tas2R1/119 (rT2R1)          | Rn.48782      | CATGGACTGGCTCAAGAGGA | CTAAGACAAGGCAGCACAGA | 544 bp  |
| Tas2R5/114 (rT2R5)          | Rn.48785      | TCATTCTCACTGGCTTGGCA | TAGGATAAGTGAGTGGCAGC | 701 bp  |
| Tas2R7/121 (rT2R7)          | Rn.48786      | TCGGAGCTGTGACCAATGGA | AGAGTAAGAGGAAGGAGACC | 666 bp  |
| Tas2R10/107 (rT2R4)         | Rn.48784      | CAGGATGCTTACTTACCTCG | CTTCAAGGAGGCTTGCTTCA | 472 bp  |
| Tas2R13 (rT2R8)             | Rn.48787      | TAGTCACTTCAGCCTCTGGT | GTATCCAACGAGAAGTCTGC | 605 bp  |
| Tas2R14/123 (rT2R2)         | Rn.48792      | GATCTGCTTCATTTTGCCTG | AGCATTGCACTGATGTCAGC | 855 bp  |
| Tas2R4/108 (rT2R16)         | Rn.154318     | GCTTGGCCATCACTAGATTC | GGCTCTCAGATTCTTCCTCA | 629 bp  |
| Tas2R126 (rT2R12)           | Rn.48794      | GGCTTCATTGTGCTGATGCT | GTGCCTCGGAACTTGAGATT | 809 bp  |
| Tas2R105 (rT2R9)            | Rn.48788      | GCCAAGAACAAGAAGCTCTC | GGATAGACGGATGCAGTTGT | 710 bp  |
| Tas2R134 (rT2R34)           | Rn.143008     | CGGTAAGAGTGGAGTCAGTC | CGCCTCTTGTCTTGTGATCT | 945 bp  |
| PKD2L1                      | Rn.162531     | ACACAGCCGAGAACAGAGAG | CCATCAGTCGGTTCACTTCC | 980 bp  |
| PKD2L2                      | Rn.207191     | CATGACCTGCATTACCGAAG | GAGCCGAGTGCCTCCATTCT | 498 bp  |
| GAPDH                       | Rn.91450      | ACTGGCGTCTTCACCACCAT | ATCCACAGTCTTCTGGGTGG | 273 bp  |

### Lista primer per le altre indagini di RT-PCR

| Gene          | Forward primer                   | Reverse primer                  |
|---------------|----------------------------------|---------------------------------|
| GADHP         | 5'-ACTGGCGTCTTCACCACCAT -3'      | 5'-ATCCACAGTCTTCTGGGTGG -3'     |
| CFTR          | 5'-GCGATGCTTTGTCTGGAGATT -3'     | 5'-CCACTTGTAAGGAGCAATCCATA -3'  |
| CC26          | 5'-AAGCTACCATTTCCCATCATCGACG -3' | 5'-TTGCCAGATGGGAGCTCTTTGG -3'   |
| CC10          | 5'-TTACAACATCAGCCCACATCTACA -3'  | 5'-TGTGATGCCGATCTTCATGGT -3'    |
| Acquaporina 2 | 5'-CTTGGCTCAGCCCTCCAGTG-3'       | 5'-GCAGGGCTACCCAGGTTGTC-3'      |
| Acquaporina 3 | 5'-CTTCGCTGTCACCCCTTGCCA-3'      | 5'-AGACTTCTGAACCCCAGCCA-3'      |
| Acquaporina 4 | 5'-GAGTGACGGAGCTGCAGCGA-3'       | 5'-ATGAACCGTGGTGACTIONCCA-3'    |
| Acquaporina 5 | 5'-CCGGCTGTTCCATGAACCCA-3'       | 5'-CTGAGGTCTGAGCTGTGGCA-3'      |
| FATP4         | 5'-GGCACTGGGCAACGGTCTCC-3'       | 5'-GCCTGGCTGGCCTGGTTGAC-3'      |
| CD36          | 5'-AATGGCACAGATGCAGCCTCCT-3'     | 5'-AATGTCCAGCACACCATAACGACGT-3' |
| CFTR          | 5'-GCGATGCTTTGTCTGGAGATT-3'      | 5'-CCACTTGTAAGGAGCAATCCATA-3'   |
| CC10          | 5'-TTACAACATCAGCCCACATCTACA-3'   | 5'-TGTGATGCCGATCTTCATGGT-3'     |
| CC26          | 5'-AAGCTACCATTTCCCATCATCGACG-3'  | 5'-CGCCACAATCTTTCTACGGAACTGC-3' |
| SGLT1         | 5'-CACCAGTTACCTGGGGCCAC-3'       | 5'-TGGCAGAAGACAGCCACTGC-3'      |
| GLUT2         | 5'-GTCCAGAAAGCCCCAGATACC-3'      | 5'-GTGACGTCCTCAGTGCCCCTTAG-3'   |
| GLUT-5        | 5'-CGACGTCCAATATGTGACGGCTG-3'    | 5'-TGCTCCGATCATGTAGGCGGA-3'     |
| PEPT-1        | 5'-ATGGCCCTGCAGATCCCACAGTA-3'    | 5'-TCAGCCCACTGTTTGTGCGAAGTGG-3' |

### 3.7. PCR Real Time

Le sequenze dei primer utilizzati sono stati:

|                |                |                           |
|----------------|----------------|---------------------------|
| CD 36          | forward primer | TCCTCTGACATTTGCAGGTCCA    |
|                | reverse primer | CAGTGGTTGTCTGGGTTCTGGAGT  |
| NAPE-PLD       | forward primer | CCGGGTTCCAAAGAGGAGCTTG    |
|                | reverse primer | CACGTGACTCGTAGGCCAGC      |
| PPAR- $\alpha$ | forward primer | CCCTGCTGTCCCCACCAGTA      |
|                | reverse primer | TCGCCGAAAGAAGCCCTTGC      |
| $\beta$ -actin | forward primer | CCTGGCCTCACTGTCCACCTT     |
|                | reverse primer | CGCAGCTCAGTAACAGTCCGC     |
| HPRT1          | forward primer | TTGGATACAGGCCAGACTTTGTTGG |
|                | reverse primer | ACTTGGCTTTTCCACTTTCGCTGA  |

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti con TriFast (Euroclone, Milano, Italia), seguendo le istruzioni del produttore. Dopo la determinazione spettrofotometrica del contenuto totale di RNA, tracce di DNA genomico sono stati rimossi per il trattamento con RNasi-free DNasi I Amp Grade (Invitrogen, Milano, Italia) e la elica stampo di cDNA è stato sintetizzata con la trascrittasi inversa M-MLV (Invitrogen). La PCR Real-time quantitativa è stata condotta in un sistema di PCR Real-

Time Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA, USA) che impiega il Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) e livelli di espressione di mRNA sono stati normalizzati utilizzando  $\beta$ -actina come standard interno. Per ogni reazione di PCR è stato eseguito anche il controllo negativo della mancata reazione di trascrittasi inversa (RT-).

La PCR è iniziata con un ciclo di 50 ° C per 2 min e uno di 95 ° C per 10 minuti seguita da 40 cicli a 95 ° C per 30 s, 55 ° C per 30 s, e 72 ° C per 20 s. I prodotti non specifici della PCR sono stati identificati dalle curve di dissociazione, nessun controllo negativo RT- è stato amplificato e i prodotti della reazione a catena della polimerasi sono stati separati su gel di agarosio e colorato con bromuro di etidio per confermare la presenza del singolo prodotto.

I dati sono stati quantificati utilizzando metodo comparativo del ciclo soglia (Ct) (Livak e Schmittgen, 2001) e sono stati normalizzati a  $\beta$ -actina, e questo valore ( $2\Delta\Delta Ct$ ) è stato regolato in modo che i campioni di tessuto della dieta di controllo abbiano una media relativa del livello di mRNA uguale a 1. I dati sono presentati come media  $\pm$  SD (n = 3). L'analisi statistica della differenza nei livelli di mRNA è stato eseguito da t-test Student a due code.

### **3.8. Immunoblotting**

Le proteine sono state estratte utilizzate dai tessuti seguendo le indicazioni del kit TriZol reagent (Invitrogen). Sono state quindi quantificate spettrofotometricamente (metodo di Lovry).

10 o 20  $\mu$ g di ogni estratto proteico viene corso elettroforeticamente in un gel di poliacrilamide (6–10%) con sodium dodecylsulfate.

Successivamente le proteine sono state trasferite I una membrane di nitrocellulosa e questa bloccata con una soluzione di latte in polvere a 5% in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20 (pH 7.4)(TBS-T). Successivamente la membrane viene incubata per 1h e 30 a RT o ON a 4 C° con la soluzione contenente anticorpo primario anti rabbit 3% bovine serum albumin in TBS-T. Dopo dei lavaggi un anticorpo secondario horseradish peroxidase-labelled diluito 1:1000 viene incubato 1h. Il legame delle immunoglobuline viene visualizzato tramite impressione su lastra fotografica della reazione di chemiluminescenza sviluppata con l'aggiunta del reagente "Luminol" (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Per normalizzare le quantità di proteina è stato utilizzato come standard interno il gene della GAPDH o della  $\beta$ -actina.

Anticorpi primari utilizzati:

rabbit polyclonal antibody anti T2R6 (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1 : 1000

rabbit polyclonal antibody anti T2R38 (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1 : 1000

mouse monoclonal anti-amylase (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1 : 1000

## 4. Risultati e discussione

### 4.1. Il DCS nella cavità orale

Vista la recente grande mole di lavori riguardanti il DCS nelle vie aeree e nell'apparato digerente grazie all'utilizzo dei nuovi marcatori, sono stati evidenziati alcuni pathways o recettori tipici delle cellule recettoriali gustative (TCRs) anche in cellule differenti dalle SCCs.

Queste coespressioni aprono possibili scenari di modulazione già accennati nell'introduzione (capitoli 1.6 e 1.7). Sulla base della presenza di elementi gustativi in cellule specializzate nell'assorbimento e nella secrezione esocrina il nostro gruppo di ricerca sta valutando se non venga anche l'opposto. Sono stati ricercati nelle TCRs presenti nei calici gustativi elementi di meccanismi cellulari legati all'assorbimento e alla secrezione.

Diverse sono le possibili ipotesi di alcune coesistenze di meccanismi cellulari di origine differenti in sottopopolazioni di TCRs. Certamente la forte innervazione dei taste buds e l'invio del segnale al sistema nervoso centrale aumenta di molto la rilevanza dei possibili ruoli di queste coespressioni.

#### *Proteine esaminate coinvolte nella secrezione*

Il "cystic fibrosis transmembrane regulator" (CFTR) è un canale trasportatore di ioni cloro regolato da cAMP, che permette l'assorbimento di e la secrezione di Sali in diversi tessuti epiteliali e che è stato estesamente studiato per il suo coinvolgimento nelle fibrosi cistica (Cheng et al. 1980; Bear et al. 1992).

Le cellule di Clara, anche chiamate cellule bronchiolari, secernono materiale di tipo sieroso nei bronchioli per mantenere fluido il materiale mucoso prodotto dalle cellule caliciformi mucipare.

La proteina secretoria specifica delle Clara cells (CCSP) avente peso in kDa 10 (CC10) oltre che nei polmoni risulta espressa in altri organi (Hermans and Bernard 1999) ed è stata rilevata in diversi fluidi biologici (fluido alveolare, sputo, urina e siero)(Singh et al. 1985). Nei polmoni il suo ruolo secretorio è protettivo sia contro agenti infiammatori che stress ossidativi.

La proteina secretoria specifica della Clara cell avente peso in kDa 26 (CC26) è molto espresso nell'epitelio olfattivo e respiratorio (Novoselov et al. 1999; Hofman et al. 2002).

Possiede una attività perossidasi che protegge le cellule contro stress ossidativi come perossido di idrogeno, acidi grassi e fosfolipidi idroperossidati (Fisher et al. 1999).

CC26 e CC10 sono espresse principalmente nelle cellule non ciliate dell'epitelio della trachea e dei bronchi e con una maggior densità nei bronchioli (Bedetti et al. 1987; Lund et al. 1988), ma in maniera distinta e con differenti meccanismi di secrezione (Stripp et al. 2002).

Le acquaporine sono una famiglia di proteine canale coinvolte nel movimento transmembrana dell'acqua in diversi epitelii. Tre tipi di acquaporine (AQ1, AQ2, and AQ5) sono state recentemente osservate nei taste buds di ratto (Watson et al. 2007).

#### *Proteine esaminate coinvolte nell'assorbimento*

SGLT1 (Sodium/GLucose coTransporter 1) è un cotrasportatore controgradiente di glucosio, sodio dipendente ed è espresso nella mucosa del piccolo intestino, e nel rene dove contribuisce al riassorbimento del glucosio.

GLUT2, Glucose transporter 2 (GLUT2) conosciuto anche come solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (SLC2A2) è una proteina carrier di transmembrana che permette il movimento passivo di glucosio attraverso le membrane cellulari. È il principale trasportatore di glucosio nel trasferimento dal fegato al sangue, e nel riassorbimento renale.

GLUT5 un trasportatore indispensabile per l'assorbimento del fruttosio che permette il trasporto dal lume intestinale dentro gli enterociti per diffusione facilitata. È espresso anche nel rene, nel muscolo scheletrico ed in altri organi.

#### **4.1.1. Localizzazione del CFTR e di CCSP nella papilla circumvallata di ratto**

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente osservato che cellule immunoreattive per la  $\alpha$ -gustducina e la Pcl $\beta$ 2 nelle vie aeree colocalizzavano con l'espressione di CFTR e di CC10 e CC26 (Merigo et al., 2007). Per estensione è stato supposto che anche le TCRs stesse all'interno dei taste buds potessero esprimere questi marcatori di secrezione.

Quindi è stato indagata la loro presenza con analisi di immunoistochimica e microscopia confocale a scansione laser.

Gli esperimenti di RT-PCR hanno rilevato la presenza di tutti e tre i trascritti genici all'interno della papilla circumvallata e anche nei bronchioli e nella trachea (si veda figura 4.1.1) dove sono ben espressi, mentre come organo negativo è stato utilizzato l'esofago confermando i dati di immunoistochimica.

#### *CFTR*

Gli studi di colocalizzazione hanno riportato la presenza del CFTR nei taste buds della papilla circumvallata anche all'interno di cellule che non esprimono la gustducina per circa la metà dei casi. Dal lato opposto solo poche cellule che esprimono la gustducina risultano prive di CFTR. Per i dettagli delle immunoreattività si veda Merigo et al., 2008, "Immunohistochemical localization of

cystic fibrosis transmembrane regulator and Clara cell secretory protein in taste receptor cells of rat circumvallate papillae”.

Questo studio ha dimostrato per la prima volta la presenza di CFTR nelle TCRs. Altri tipi di canali del cloro si trovano nei TCRs (Herness and Sun 1999; Miyamoto et al. 2001; Huang et al. 2005). La loro funzione non è ben compresa ma è stato suggerito che potrebbero avere un ruolo nella trasduzione del gusto (Herness and Sun 1999).

#### *CC10 e CC26*

Anche le cellule immunoreattive per CC10 e CC26 risultano numerose nei taste buds ma colocalizzano solo in parte con la gustducina, ma mai fra di loro confermando l'espressione distinta osservata in altri tessuti.

Poiché appare che le CCSP agiscano a necessario legame fra l'epitelio delle vie aeree e il sistema immunitario (Reynolds 2007), il nostro gruppo di ricerca suggerisce CC10 possa partecipare a meccanismi di difesa dell'epitelio gustativo in risposta a stimoli esterni attraverso un segnale paracrino.

Il CC26 grazie alla sua attività perossidasi può sia proteggere i tessuti da specie reattive all'ossigeno e regolare il metabolismo fosfolipidico

#### **4.1.2. Localizzazione di CCSP nelle ghiandole salivari**

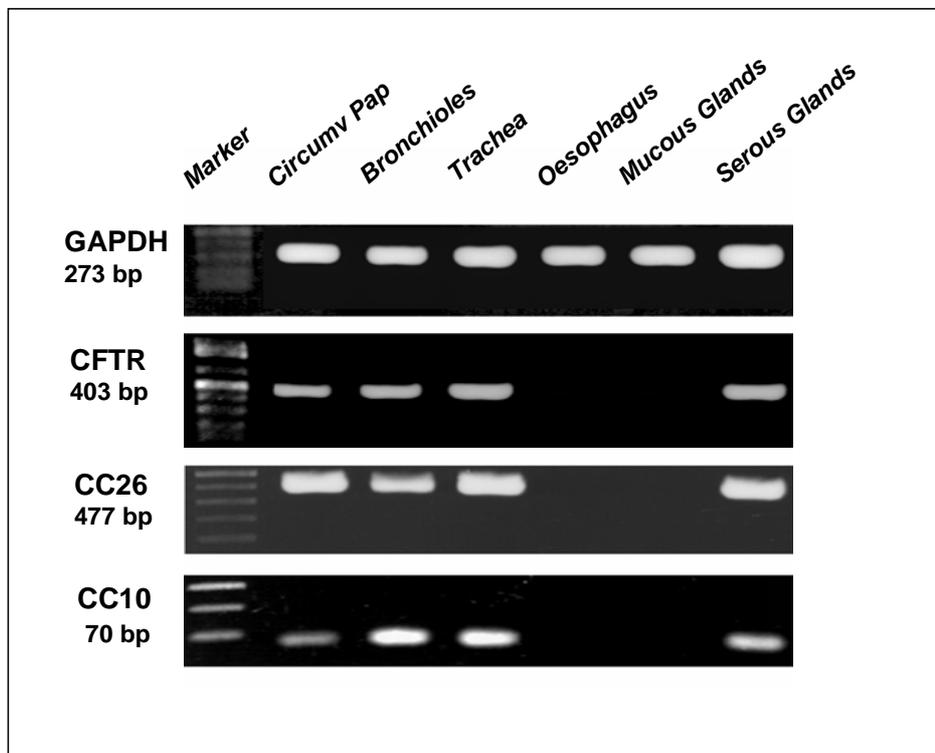
La stessa indagine di RT-PCR su CFTR, CC10 e CC26 è stata estesa anche alle ghiandole salivari maggiori di ratto, ( si veda figura 4.1.1), poiché era recentemente stato riportato che CC10 risulta presente nello sputo e nella saliva umani ((Nicholas et al., 2006). Si conferma così in ratto l'espressione delle CCSP nelle ghiandole mucose non sono presenti.

Nella cavità orale la saliva, secreta dalle ghiandole salivari maggiori e minori, è il primo tramite biologico che viene in contatto con le sostanze assunte come cibo, bevute o inalate e contribuisce ad una prima linea di difesa orale. Recentemente la deficienza di CC10 è stata correlata alla proteina Annexina-1 (ANXA1), la quale ha proprietà immunomodulatorie e antinfiammatorie. Per cui considerati il rilevante ruolo difensivo delle CCSP e di ANXA1 nell'apparato respiratorio e l'importanza della secrezione salivare nella difesa orale e anche nella protezione dell'apparato respiratorio e gastrointestinale il nostro gruppo ha indagato la localizzazione tramite immunoistochimica nella parotide, la ghiandola sotto linguale e quella sotto mandibolare (Cecchini et al., 2008, “Immunohistochemical localization of Clara cell secretory proteins (CC10-CC26) and Annexin-1 protein in rat major salivary glands”). Lo studio riporta un'eterogeneità di espressione dei tre marcatori nelle differenti porzioni delle ghiandole, credendo che queste cellule hanno delle

identità individuali e suggerisce che possa esistere un complesso sistema di segnalazione paracrina che attivi i meccanismi di difesa.

**Figura 4.1.1. Indagini di RT-PCR sull'espressione di CFTR, CC26 e CC10.**

L'analisi tramite PCR rileva la presenza dei trascritti dei tre geni all'interno della papilla circumvallata e delle ghiandole sierose, come nella trachea e nei bronchioli dove risultavano ben espressi. Non viene rilevata alcuna presenza nella ghiandola mucosa e nell'esofago (controllo negativo). Il gene costitutivo GAPDH è stato utilizzato come normalizzatore e controllo.



**4.1.3. Espressione di amilasi nei taste receptors della papilla circumvallata**

La sensibilità percettiva delle cellule chemosensoriali è molto influenzata dalla possibilità di riuscire captare i composti sia da un punto di vista fisico, che chimico mediante la loro degradazione. Una funzione particolarmente importante è data da delle ghiandole salivari minori situate al di sotto della papilla circumvallata dette di von Ebner.

Si tratta principalmente di una ghiandola sierosa sotto il controllo del nervo simpatico e parasimpatico. Dal punto di vista sensoriale la sua funzione è importante perché secerne enzimi che frammentando le molecole rendono accessibili i siti chimici riconosciuti dai recettori. Per questo suo ruolo è stato proposto (Sbarbati et al. 1999) che assieme alla papilla circumvallata costituisca un'unità funzionale del meccanismo di gusto periferico.

Per esempio le lipasi linguali che sono secrete dalle ghiandole di von Ebner oltre a iniziare la digestione dei trigliceridi introdotti con la dieta (le lipasi linguali sono acido resistenti e la loro

attività prosegue anche nello stomaco) rendono disponibili gli acidi grassi liberi rendendo possibile percepire il livello di grasso contenuto in un cibo.

Questo oltre ad aumentare l'appetibilità degli alimenti grassi, permette di attivare le secrezioni biliari per preparare l'intestino all'arrivo del cibo e di percepire prima dell'arrivo di stimoli post-assorbitivi la quantità di cibo ingerito (Laugerette et al., 2005).

Il coinvolgimento delle ghiandole di von Ebner in un questo tipo di secrezione permette la diffusione dell'amilasi direttamente nel solco che circonda la papilla circumvallata (Azzali et al. 1989; Riva et al. 1999) approvigionando il micro ambiente (Mese and Matsuo 2007) in cui sono esposti i recettori dei calici gustativi. Ciò permette la rilevazione da parte dei recettori dedicati al sensing del dolce di polisaccaridi e di oligosaccaridi (Tremblay and Charest 1968; Field et al. 1989), che altrimenti non verrebbe percepito come fonte zuccherina.

I roditori hanno una grande capacità di riconoscere cibi ricchi in amido e di distinguerne le diverse concentrazioni che però non è collegata alla secrezione di amilasi salivare (Ramirez 1991). Quindi i roditori possiedono un meccanismo di chemocezione dei polisaccaridi che non richiede l'amilasi. È stato proposto che abbiano un recettore specifico per i polisaccaridi non ancora caratterizzato che utilizza gli stessi meccanismi di traduzione del segnale del dolce ( $\alpha$ -gustducin e TRPM5) (Sclafani et al. 2007), ma non il recettore (T1R3) (Zukerman et al., 2009).

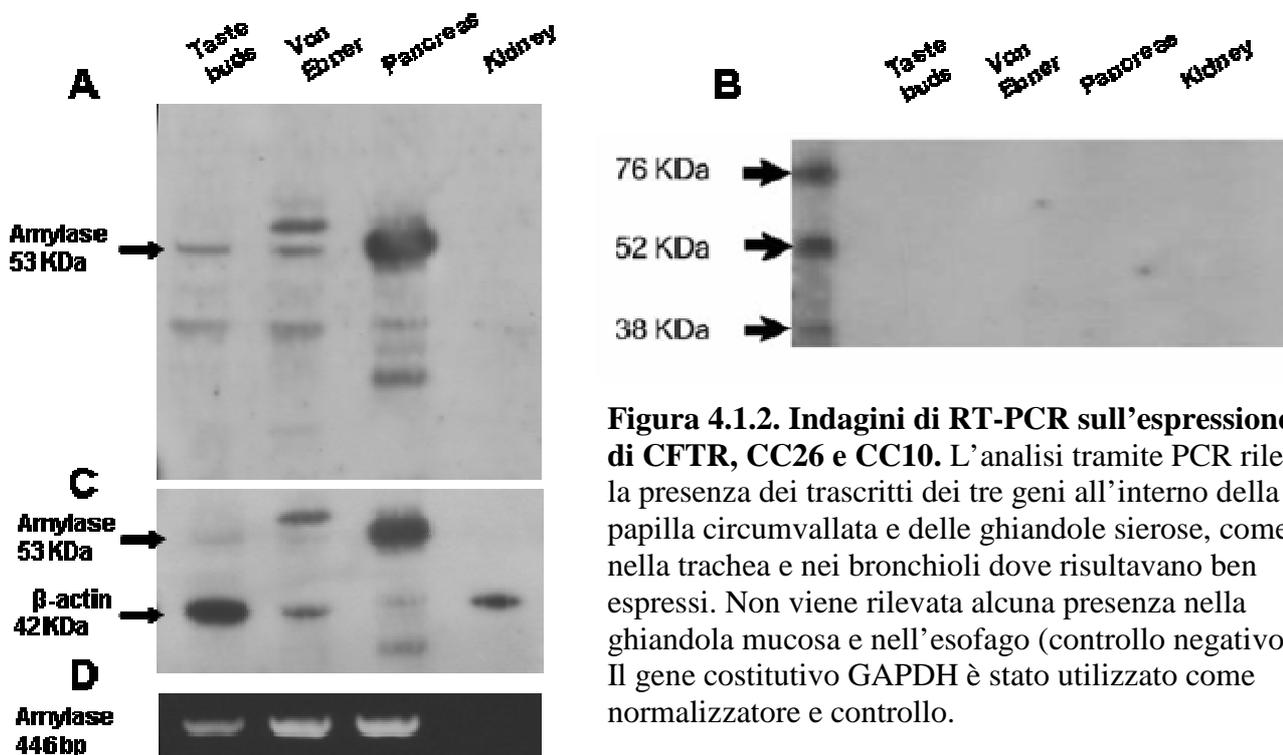
La recente scoperta che gli enterociti dell'epitelio duodenale sono in grado di esprimere le amilasi luminali pancreatiche ha suggerito che allo stesso modo le TCRs potessero esprimere l'amilasi espressa nella cavità orale.

Il lume duodenale ha un'associazione anatomica con le cellule esocrine del pancreas attraverso i dotti pancreatici che drenano l'amilasi pancreatica sulla superficie dell'epitelio duodenale. Questa organizzazione strutturale ricorda quella della papilla circumvallata e delle sottostanti ghiandole di von Ebner. Il nostro gruppo ha sondato la possibilità che come per gli enterociti anche TCRs possano esprimere amilasi tramite immunocitochimica ( Merigo et al., 2008, “ Amylase expression in taste receptor cells of rat circumvallate papillae”). Poiché stata trovata una marcatura positiva la presenza della proteina e la specificità della marcatura è stata confermata tramite western blot (figura 4.1.2). Come organo di controllo positivo ho utilizzato campioni tessutali di pancreas, come controllo negativo il rene. La banda che dà immunoreattività è di circa 53 kDa, ossia il peso atteso in kDa dell'amilasi, confermando la specificità dell'anticorpo. Come standard interno è stata usata la beta actina. Il raffronto delle immunoreattività verso la beta actina indica che nei taste buds l'amilasi è come atteso molto meno espressa rispetto alle ghiandole di von Ebner. Come ulteriore controllo la membrana è stata ibridata anche con l'anticorpo primario bloccato con il peptide di bloccaggio, che non dà alcun segnale. Un'ulteriore verifica della presenza dell'amilasi è stata

effettuata sugli stessi tessuti amplificando l'RNA messaggero mediante reazione di RT-PCR (figura 2D).

In seguito a queste verifiche lo studio è proseguito ricercando le colocalizzazione nei TCRs con altri marcatori immunocitologici: protein gene product 9.5 (PGP 9.5) e chromogranin A (CgA) per le cellule endocrine,  $\alpha$ -gustducin and phospholipase e PLC $\beta$ 2 come marcatori delle cellule di tipo II, CFTR e CC10 come marcatori di secrezione.

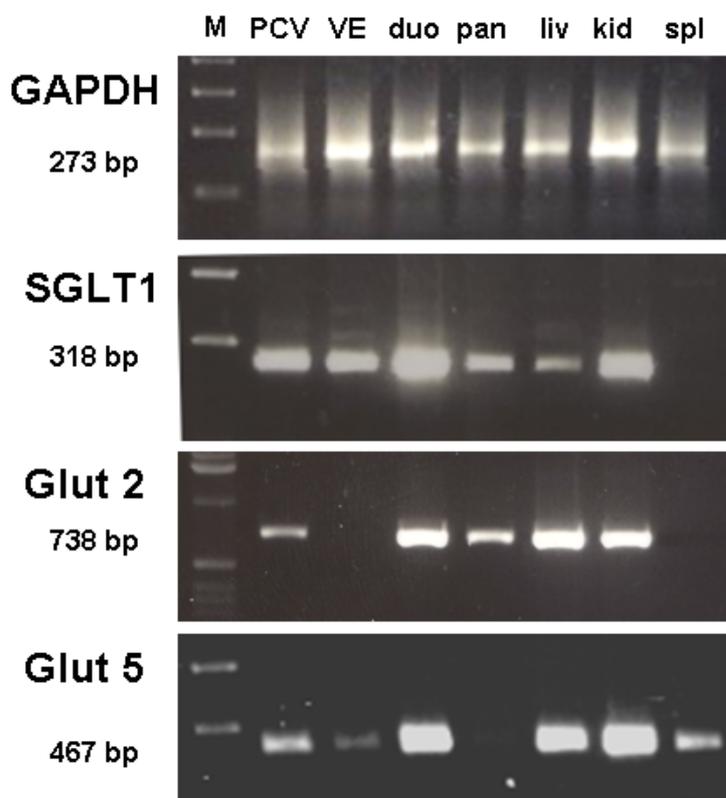
L'utilizzo di tecniche di immunostochimica ha permesso di evidenziare per la prima volta la presenza di amilasi all'interno dei calici gustativi e la loro colocalizzazione con proteine coinvolte nella traduzione del segnale gustativo ( $\alpha$ -gustducin, PLC $\beta$ 2) e la secrezione (CC10 e CFTR). L'immunoreattività dell'amilasi nella zona apicale delle TCRs e la conferma della trascrizione genica di questo enzima suggerisce che le TCRs producano e secernano amilasi prendendo anche essi parte alla digestione dei carboidrati. Inoltre la colocalizzazione con cellule capaci di trasdurre il segnale chemosensoriale suggerisce che tale produzione possa essere regolata, e conferma il concetto che all'interno dei taste buds agiscano diversi pathways.



**Figura 4.1.2. Indagini di RT-PCR sull'espressione di CFTR, CC26 e CC10.** L'analisi tramite PCR rileva la presenza dei trascritti dei tre geni all'interno della papilla circumvallata e delle ghiandole sierose, come nella trachea e nei bronchioli dove risultavano ben espressi. Non viene rilevata alcuna presenza nella ghiandola mucosa e nell'esofago (controllo negativo). Il gene costitutivo GAPDH è stato utilizzato come normalizzatore e controllo.

#### 4.1.4. Espressione di trasportatori dello zucchero nei TCRs

Le recenti scoperte realizzate nel nostro gruppo di differenti pathways nelle TCRs unita alla considerazione che nell'intestino cellule esprimenti marcatori gustativi possono possedere meccanismi di assorbimento dei nutrienti ha allargato la ricerca anche ai trasportatori degli zuccheri. Le indagini di immunocitochimica sono ancora in corso stanno rilevando la presenza di SGLT1, GLUT2 e GLUT5 all'interno dei taste buds. La loro presenza è confermata da indagini di RT-PCR (figura 4.1.3). Curiosamente risultano espressi anche nelle ghiandole di von Ebner.



**Figura 4.1.3. Espressione di trasportatori dello zucchero nei TCRs della papilla circumvallata.**

Le indagini di RT-PCR indicano la presenza dei trasportatori degli zuccheri SGLT1, GLUT2 e GLUT5 all'interno dei taste buds. PC, papilla circumvallata; VE, ghiandole di von Ebner; DUO, duodeno; pan, pancreas; liv, fegato; kid, rene; spl, milza)

#### **4.1.5. Caratterizzazione di cellule SCCs mediante sonde di RNA**

I recettori della famiglia TAS2R o T2R sono una famiglia multi-genica di GPCRs specializzata nella rilevazione delle sostanze amare. Oltre al ruolo gustativo sono interessanti per la loro funzione di monitorare composti potenzialmente pericolosi, che sono generalmente amari. Nel loro complesso i Tas2R si sono specializzati nel rilevamento di molecole dalle caratteristiche chimiche più svariate. Hanno infatti subito un processo di divergenza genica che ha specializzato alcuni di questi recettori a percepire solo alcune classi di molecole. Infatti posseggono una diversità un'identità aminoacidica variabile dal 21 al 90% (Bufe et al., 2002), e alcune specie, per esempio i roditori, hanno prodotto geni che non hanno ortologhi in altre specie.

Molto recentemente è stato suscitato interesse verso questi recettori da un punto di vista farmacologico e nell'uomo molti dei recettori Tas2Rs (20 su 25) sono stati "deorfanzati" di alcuni dei loro ligandi.

In base a questa loro specializzazione il loro utilizzo come marcatori non sarebbe solo un ulteriore criterio di marcatura di cellule con capacità chemosensoriali, ma la presenza selettiva di alcuni recettori rispetto ad altri aiuterebbe a caratterizzare funzionalmente sotto insiemi di SCCs e aumenterebbe le conoscenze sui ruoli del DCS in generale, oltre ad avere un interesse di tipo farmacologico.

La scarsa disponibilità di anticorpi per l'immunoistochimica aggiunto al malfunzionamento di quelli commercializzati ha da sempre ostacolato l'utilizzo di questi marcatori molecolari nella caratterizzazione delle SCCs e più generalmente delle cellule gustative. La produzione di animali transgenici per questi geni non è stata ancora realizzata per via del costo e dell'interesse non ancora elevato.

Comunque il problema è stato in parte aggirato producendo delle sonde di RNA complementari all'mRNA messaggero, una tecnica chiamata ibridazione *in situ*, poiché l'appaiamento della sonda non avviene in vitro ma sul preparato istologico.

##### **4.1.5.1. Produzione della sonda e ibridazione**

Il lungo processo di produzione della sonda è riportato nei materiali e metodi, ma è qui riassunto per semplicità.

Il frammento di RNA che si desidera utilizzare come sonda viene amplificato a partire dal RNA totale mediante RT-PCR. L'amplicone prodotto viene (previo sequenziamento al fine di verificare la specificità) inserito in un vettore plasmidico, con cui si trasformano delle cellule batteriche competenti al fine di clonarlo. Le cellule batteriche vengono disseminate su una piastra petri. Le

colonie batteriche positive alla transfezione (contengono un gene di resistenza ad un antibiotico e un gene in grado di degradare un composto generando un colore) vengono poste in una coltura cellulare liquida. Le cellule vengono lisate e i plasmidi vengono recuperati. Tramite reazione di restrizione il frammento viene exciso dal plasmide e separato su gel di agarosio. I frammenti di DNA recuperati possono essere infine utilizzati come stampo per la produzione in vitro di un'elica di RNA con orientamento complementare (antisenso) o uguale (senso, usata come controllo negativo) al messaggero tramite le RNA polimerasi T7 o SP6. Il filamento viene sintetizzato con una mix di ribonucleotidi in cui l'uracile è coniugato alla digossigenina, una molecola che sarà il target di un anticorpo legato ad un enzima come in un immunoistochimica. Diversamente da un immunoistochimica vi è una delicata fase di ibridazione della sonda in cui la temperatura gioca un ruolo importante sull'appaiamento specifico della sonda.

La sonda essendo di RNA a singola elica è molto fragile. Inoltre l'alta temperatura utilizzata (45-60 gradi) per un tempo protratto tende a concentrare la soluzione che interagisce con i preparati istologici aumentando la possibilità che si creino artefatti e richiederebbe una camera di incubazione speciale.

Rispetto ad un immunoistochimica questa tecnica presenta una potenzialità molto maggiore di legarsi al giusto target.,

Infatti un anticorpo è selezionato casualmente contro un particolare antigene della proteina che si vuole marcare, ma non è escluso che vi possano essere dei target simili.

Invece l'ibridazione *in situ* se messa a punto rispetto questa tecnica consente una specificità virtualmente assoluta poiché si basa sull'appaiamento ad una sequenza nucleotidica che è unica. Poiché non è una reazione che avviene in vitro vi sono diverse cause che rendono complesso ottenere un buon risultato di ibridazione. La ripetizione di alcuni domini conservati in altre proteine, come quelli  $\alpha$ -eliche transmembrana dei Tas2R, potrebbe introdurre brevi sequenze di omologia con altri target, ed essere un motivo per cui per certi marcatori le sonde di RNA non hanno molto successo.

D'altronde le proteine GPCRs sono una super famiglia genica con quasi 800 geni predetti nell'uomo, che rappresentano ben il 4% dell'intero genoma codificante per proteine.

#### **4.1.5.2. Risultati di ibridazione di sonde per i Tas2Rs**

All'inizio di questo progetto di tesi era stato pianificato di creare diverse sonde basate su alcuni dei recettori Tas2Rs conosciuti in ratto.

A causa della complessità di questa tecnica e della delicatezza del processo ibridazione della sonda che avrebbe richiesto una camera di ibridazione adeguata i risultati di marcatura non hanno

corrisposto alle aspettative. Il costo relativamente alto della sintesi delle sonde ha bloccato il progetto, per cui sono state testate solo poche sonde di RNA.

I maggiori problemi sono stati creati dalla non avvenuta ibridazione o dall'alto segnale di fondo dovuto al trattenimento fisico della sonda in particolar modo in certi tessuti.

Il riuscito utilizzo di questi marcatori sarebbe stato un potente mezzo per indagare la loro presenza all'interno delle vie aeree e lungo l'apparato digerente, dove contemporanei studi di espressione dell'mRNA messaggero hanno indicato la loro presenza.

In letteratura sono già stati riportati esempi di marcatura con sonde ma limitate alla cavità nasale e alla cavità orale o a colture di cellule differenziate.

Ad oggi infatti sia per le vie aeree inferiori che nel tratto gastrointestinale non sono pubblicati studi che mostrino marcature di cellule positive ai Tas2R.

Comunque le sonde utilizzate hanno mostrato una positività non dubbia per quanto riguarda i calici gustativi della papilla circumvallata, mentre i calici gustativi della papilla fungiforme come atteso non risultano marcati. L'utilizzo della sonda senso, che non essendo complementare ad alcuna sequenza non può appaiarsi ha confermato la specificità del metodo. Sebbene vi sia background sembrano marcate positivamente anche alcune cellule epiteliali della trachea.

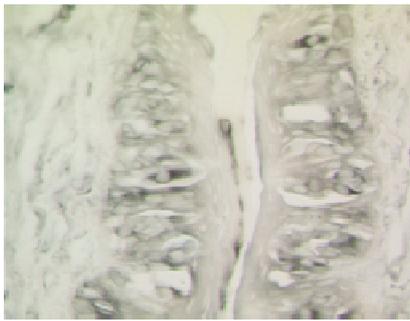
Più distalmente nelle vie aeree nelle diverse porzioni dell'apparato digerente non è risultata alcuna marcatura.

Sono stati amplificati e clonati i frammenti per la produzione delle seguenti sonde: Tas2R1/119 (rT2R1), Tas2R5 (rT2R5), Tas2R7 (rT2R7), Tas2R10 (rT2R4), Tas2R13 (rT2R8), Tas2R14 (rT2R2), Tas2R34 (rT2R16), Tas2R41/126 (rT2R12), Tas2R105 (rT2R9), Tas2R134 (rT2R34) per i recettori dell'amaro e PKD2L1 e PKD2L2 come recettori candidati per la percezione dell'acido. Ad eccezione dei recettori per T2R1 e T2R5 tutti i clonaggi sono andati a buon fine. Per i primers e la lunghezza dei frammenti si vedano i dettagli nella sezione materiali e metodi. Dai frammenti isolati sono state prodotte e testate le sonde limitatamente a quelle per i recettori dell'amaro T2R9(Tas2R105) e T2R7 (Tas2R121)(figura 4.1.4) che hanno dato i risultati sopraccitati per il recettore candidato dell'acido PKD2L1(figura 4.1.5) (sono riportate alcune immagini qui sotto a titolo dimostrativo), mentre quella per il T2R4 non ha prodotto alcuna marcatura.

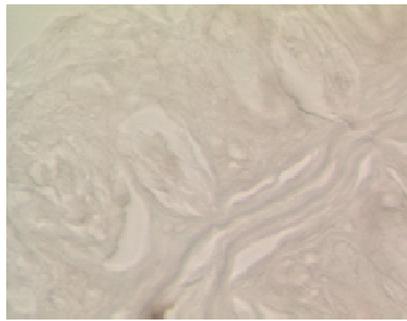
#### **4.1.5.3. Sonda per il recettore candidato dell'acido PKD2L1**

Il PKD2L1 è un canale ionico non selettivo che assieme a PKD1L3 forma un eterodimero che è il maggior candidato per la percezione del gusto acido.

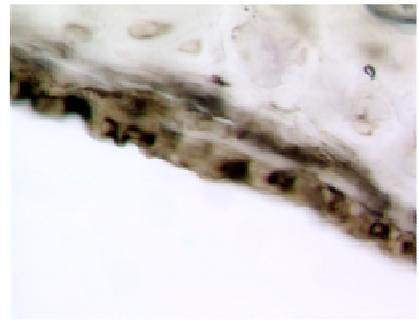
All'interno dei taste buds risultano espressi selettivamente dalle cellule di tipo III, (Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006; Lopez Jimenez et al., 2006), ovvero cellule presinaptiche. Studi di



Papilla circumvallata, ingrandimento 40x



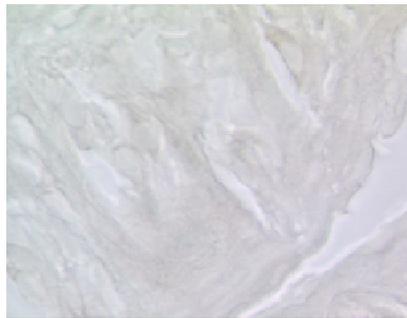
Papilla circumvallata, ingrandimento 60x (sonda senso)



Trachea, ingrandimento 60x

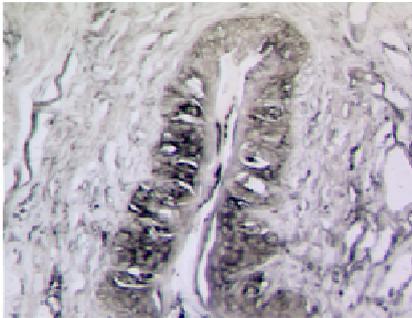


Papilla circumvallata, ingrandimento 100x

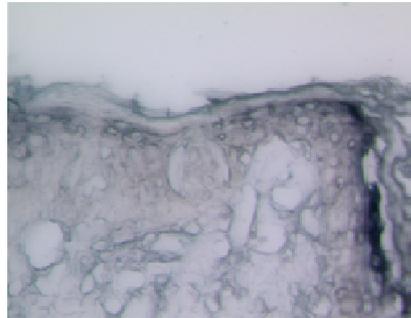


Papilla circumvallata, ingrandimento 100x (sonda senso)

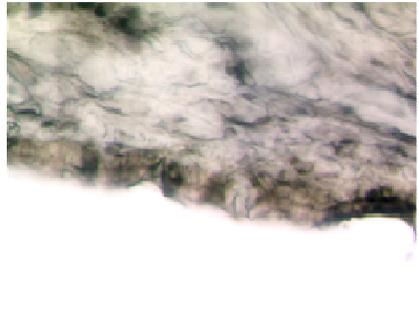
**Sonda Tas2R121/T2R7**



Papilla circumvallata, ingrandimento 20x



Papilla fungiforme, ingrandimento 20x



Trachea, ingrandimento 20x



Papilla circumvallata, ingrandimento 100x

**Sonda Tas2R105/T2R9**

**Figura 4.1.4. Ibridazione in situ con sonde verso i Tas2Rs nelle papille e nella trachea.**

colocalizzazione all'interno dei taste buds trovano ovviamente assenza di coespressione con gli elementi della trasduzione del gusto come TrpM5 e PLC $\beta$ 2 (Kataoka et al., 2008) e probabilmente anche la gustducina.

In ogni modo attualmente PKD2L1 è il marcatore più promettente delle cellule adibite al sensing dell'acido, ed è quindi un nuovo potenziale marker nella caratterizzazione di una distinta sottofamiglia di SCCs, sebbene la sua espressione sembri piuttosto limitata rispetto agli altri recettori gustativi.

Comunque la disponibilità di anticorpi verso questo tipo di marcatori ha reso meno interessante l'utilizzo di una sonda di RNA.

I risultati di ibridazione (vedere immagini sotto) confermano la positività nei taste buds della papilla circumvallata. Risultano positive anche diverse cellule solitarie nella glottide. Più distalmente nelle vie aeree non è più presente, così come nell'apparato digerente, in accordo con lo screening fatto sull'espressione del messaggero tramite analisi di RT-PCR (figura 4.1.6).



### Sonda PKD2L1

**Figura 4.1.5. Ibridazione in situ per il recettore dell'acido nelle papille e nella glottide.**



**Figura 4.1.6. Espressione del gene PKD2L1**

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.

## 4.2. Il DCS nelle vie aeree

### 4.2.1. Espressione di CFTR e CC26 nella cavità nasale durante lo sviluppo

La superficie della cavità nasale dei mammiferi è ricoperta da una mucosa respiratoria che in ristrette aeree presenta due distinti epitelii chemosensoriali: l'epitelio olfattivo e l'epitelio sensoriale dell'organo vomero nasale. Sono due epitelii sensitivi anatomicamente separati e specializzati il primo nel percepire gli odori, il secondo i ferormoni. Negli ultimi anni il nostro gruppo ha caratterizzato il fenotipo chimico dell'organo vomero nasale di topo dallo stadio embrionale a quello della maturità sessuale (Zancanaro et al., 1999, 2002; Merigo et al., 2005).

Più recentemente è stato ipotizzato per l'olfatto un ruolo regolatorio, secretorio per il canale cloruro attivato da cAMP CFTR (Grubb et al., 2007), le proteine secretorie delle cellule di Clara (Merigo et al., 2008) e le proteine canali per l'acqua acquaporine (Ablimit et al., 2006).

Con lo scopo di studiare le basi strutturali dei meccanismi operanti nell'epitelio chemosensoriali del naso, il nostro gruppo ha analizzato la distribuzione e l'espressione di CFTR, CC26 e acquaporine nell'epitelio olfattivo e nell'epitelio sensoriale del vomero nasale di topo durante lo sviluppo dalla fase embrionale all'età adulta.

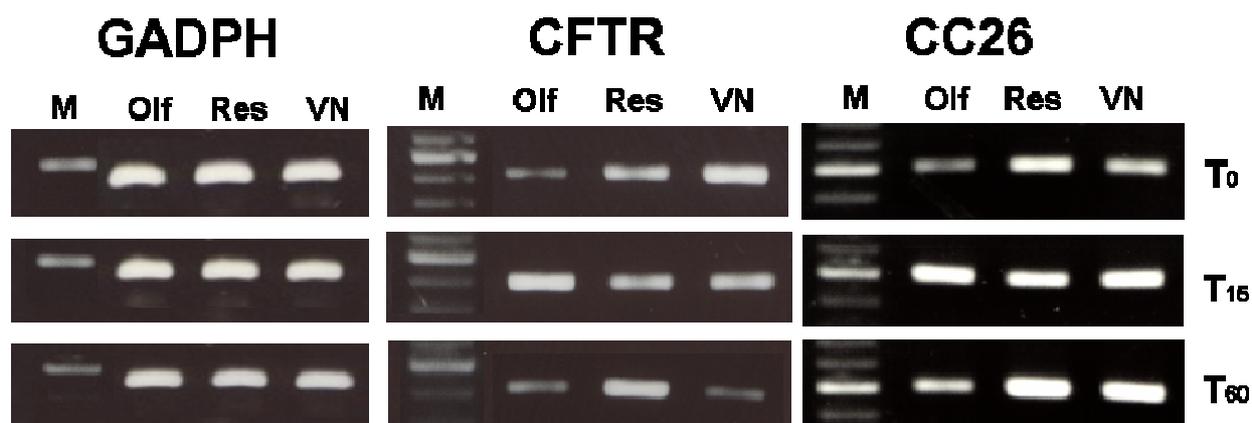
In questo studio ancora in fase di pubblicazione (Merigo et al., "Epithelial Membrane Transporters Expression in the Developing to Pubertal Mouse Vomeronasal Organ and Olfactory Mucosa") sono state utilizzate tecniche di RT-PCR per verificare il livello di espressione, di immunoistochimica per studiare la distribuzione e di doppia marcatura immunofluorescente con la proteina marcatrice di cellule olfattive OMP (olfactory protein marker) per studiare la colocalizzazione.

Tramite analisi di RT-PCR è stato ricercato semi-quantitativamente il livello di espressione di CFTR e CC26 nell'epitelio respiratorio, nell'epitelio olfattivo e nell'epitelio sensoriale del vomero nasale al primo giorno di nascita, al quindicesimo e a due mesi di età. Le analisi sono state fatte su un pool di 9 animali per ogni età della fase post-natale (nascita, 15 e 60 giorni) e i livelli di espressione sono stati normalizzati verso il GAPDH.

I risultati di RT-PCR (figura 4.2.1) indicano che mentre i livelli mRNA di CFTR nell'organo vomero nasale sono più alti al T<sub>0</sub> e al T<sub>15</sub> che al T<sub>60</sub> mentre per il CC26 si evidenzia un trend opposto.

Invece nell'organo vomero nasale si hanno due trend opposti tra CFTR e CC26, con il primo che decresce e il secondo che cresce durante lo sviluppo, a livello dell'epitelio respiratorio al T<sub>15</sub> si rilevano i picchi di espressione per entrambi i marcatori. Questi dati risultano essere in buon accordo con le osservazioni di immunoistologia. Dagli esperimenti di microscopia confocale al

laser le cellule immunoreattive a CFTR e CC10 non risultano colocalizzare con OMP in nessuno degli epiteli sensoriali. Nel complesso viene dimostrato che CFTR, CC26 e le acquaporine vengono espresse nell'epitelio chemosensoriali a diversi stadi dello sviluppo e con pattern di espressione non identici fra epitelio sensoriale dell'organo vomero nasale ed epitelio olfattivo.



**Figura 4.2.1. Espressione di CFTR e CC26, nell'epitelio olfattivo (Olf) nell'epitelio respiratorio (Res) e nell'epitelio sensoriale del vomero nasale (VN) al primo giorno di nascita (T<sub>0</sub>), al quindicesimo (T<sub>15</sub>), e a due mesi di età (T<sub>60</sub>).**

#### **4.2.2. Espressione dei recettori gustativi dell'amaro e del dolce nelle vie aeree**

L'irritazione della mucosa delle vie aeree induce una molteplicità di riflessi protettivi come il tossire, l'apnea e la chiusura della laringe. A questo processo partecipano sia le terminazioni nervose libere che i taste buds presenti nella laringe e le cellule solitarie chemosensoriali (SCCs). Queste ultime sono situate anche nell'epitelio respiratorio nasale, nell'organo vomero nasale nella faringe come pure più distalmente nelle vie aeree inferiori.

Come ampiamente descritto nell'introduzione le SCCs sono caratterizzate dall'esprimere i recettori gli elementi coinvolti nella cascata di segnale della trasduzione del gusto: la G-protein  $\alpha$ -gustducin, la fosfolipasi C beta2 (PLC $\beta$ 2), e il "transient receptor potential channel M5" (TrpM5) (Finger et al., 2003; Tizzano et al., 2006; Kaske et al., 2007; Lin et al., 2008; Sbarbati et al., 2004a; Sbarbati et al., 2004b; Merigo et al., 2007; Merigo et al., 2005).

In particolare in topo la creazione di animali esperimenti la proteina GFP (Green Fluorescence protein) sotto il promotore del gene TrpM5 o del gene Tas1R3 ha permesso di localizzare facilmente lungo le vie aeree la presenza di SCCs. (Kaske et al., 2007; Lin et al., 2008; Tizzano et al. 2010; Gulbransen et al., 2008).

Studi di "gene knockout" del TrpM5 hanno dimostrato che questo canale è necessario sia per la trasduzione del segnale gustativo nei taste buds, che per quello chemosensoriali nelle SCC (Tizzano et al., 2010; Perez et al., 2002; Zhang et al., 2003).

L'espressione di recettori della famiglia dei Tas1Rs da parte delle SCCs non ha un ruolo gustativo ma ha la capacità di indurre una sensazione di dolore e di irritazione, poiché sono connessi a nocicettori polimodali del nervo trigemino (Finger et al., 2003; Gulbransen et al., 2008a).

Recentemente è stato dimostrato che le SCCs nella cavità nasale sono attivate da varie sostanze, comprese quelle amare e dalle molecole di segnalazione del "quorum sensing" (Lin et al., 2007; Gulbransen et al. 2008; Tizzano et al., 2010) che inducono riflessi protettivi delle vie aeree. Queste scoperte sono per ciò in accordo con la presenza nella cavità nasale sia di ratto che di topo di SCCs esperimenti i recettori Tas2R (Finger et al., 2003; Ohmoto et al., 2008). A questi meccanismi di monitoraggio iniziali dell'aria inspirata si aggiungono quelli dell'epitelio chemosensoriale della laringe e quelli delle SCCs localizzate nelle vie aeree inferiori che sono già stati analizzati nell'introduzione.

La disponibilità di topi transgenici per questi marcatori ha reso semplice l'individuazione delle SCCs, ma diverse questioni rimangono aperte.

Per meglio caratterizzare i meccanismi di chemorecezione presenti nelle vie aeree è stata studiata in ratto l'espressione degli elementi della cascata di trasduzione del segnale gustativo e dei recettori

nelle vie aeree inferiori (dalla laringe ai polmoni).

I risultati mostrano che nel tratto più distale delle vie aeree vi è una diminuzione delle SSCs e una differente espressione dei recettori gustativi della famiglia dei GPCRs.

### *Risultati*

Nello studio (Tizzano et al., 2011, “ Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways”) in cui sono stati inseriti i presenti risultati di RT-PCR (mostrati in figura 2 ) le osservazioni sui topi transgenici hanno permesso di constatare che le SSCs sono presenti con una densità minore nelle vie aeree profonde e tendono a essere assenti nei bronchioli con diametro inferiore ai 400  $\mu\text{m}$ . La marcatura istochimica con traccianti dei nervi (PGP 9.5) indica che mentre nella cavità nasale e nella laringe le SSCs sono strettamente associate alle fibre peptidergiche dei nervi, mentre nella trachea risultano meno innervate. Come atteso le cellule esprimenti Tas1R3 sono un sottoinsieme di quelle esprimenti  $\alpha$ -gustducin o TrpM5, e inoltre risultano presenti soltanto fino alla trachea. Nella trachea e nei bronchi mentre quasi tutte le SSCs marcate con la GFP per il TrpM5 esprimono PLC $\beta$ 2, solo poche colocalizzano con  $\alpha$ -gustducin.

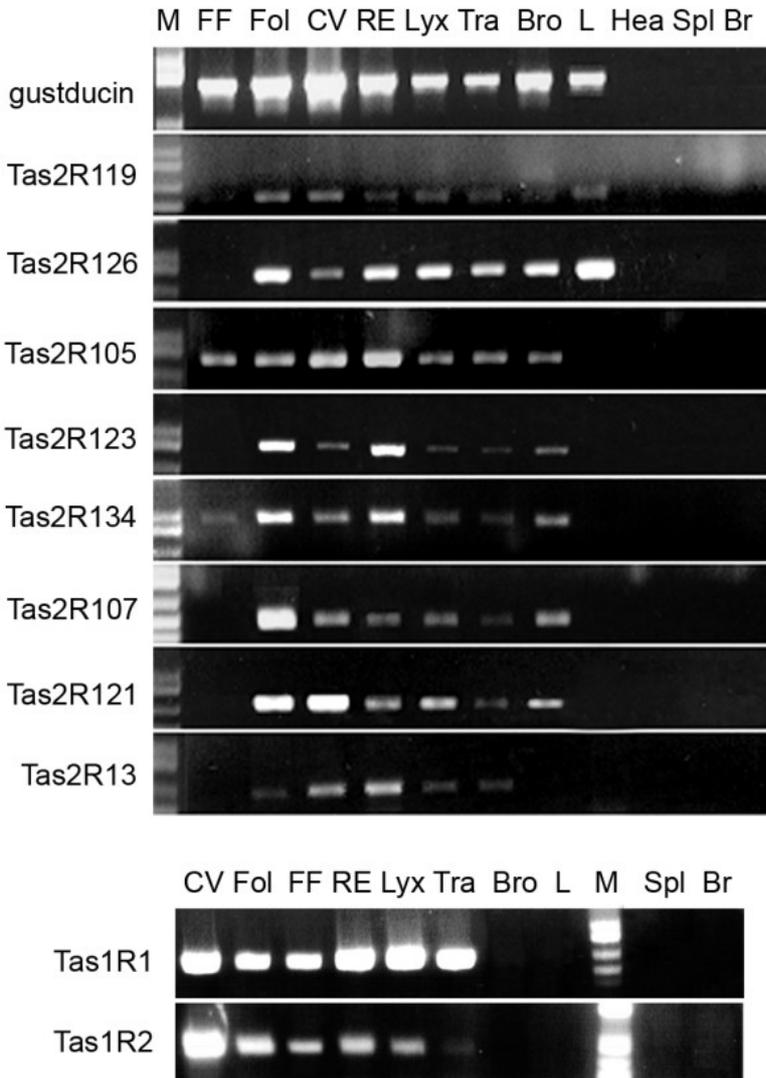
Uno studio simile è stato condotto in ratto in animali non modificati geneticamente ricercando la presenza di SCCs nella cavità orale e nelle vie aeree inferiori tramite marcatura mediante ibridazione in situ con sonde per  $\alpha$ -gustducin e Tas1R3.

La  $\alpha$ -gustducin risulta presente nelle vie aeree nella trachea tramite ibridazione in situ, e nei bronchi e nei polmoni è presunta tramite gli esperimenti di RT-PCR, confermando quanto trovato in topo.

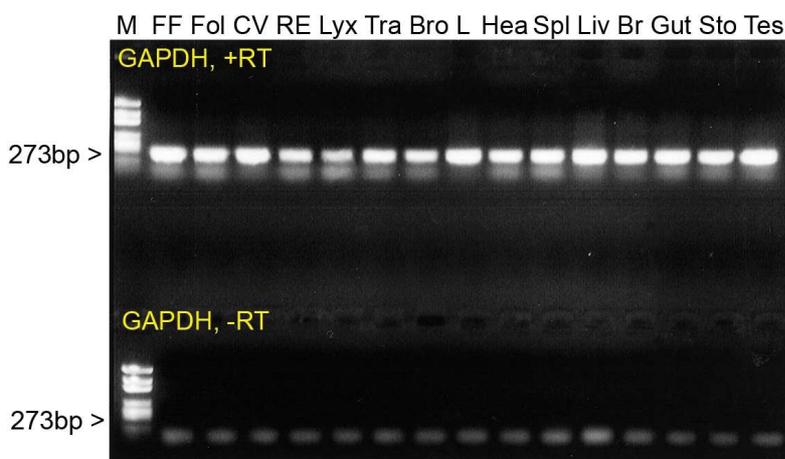
Ugualmente anche Tas1R3 risulta espresso nelle vie aeree ma in maniera meno abbondante nella trachea mentre più distalmente le indagini di RT-PCR (figura 4.2.2) mostrano l'assenza di tutta la famiglia dei Tas1Rs. I risultati dell'espressione dei Tas2Rs indicano che tutti i geni sono espressi nelle vie aeree, alcuni anche nei polmoni mostrando una differenza di espressione tra le famiglie dei Tas1Rs e dei Tas2Rs.

Pochi risultano espressi nella papilla fungiforme, poiché è una struttura dedicata maggiormente alla rilevazione dei composti dolci. È interessante notare che nella papilla fungiforme risulta espresso il gene Tas2R105 o T2R9 che è l'unico recettore dell'amaro di ratto ad essere stato “deorfanzato” (Bufe et al., 2002). Riconosce infatti il cicloesimide, un inibitore della biosintesi delle proteine negli organismi eucarioti, che è molto tossico e repellente per i roditori. La soglia di rilevazione è molto bassa anche rispetto agli altri composti amari (meno di 1  $\mu\text{M}$ ), e quindi non sorprende che possa essere presente anche nei taste buds delle papille fungiformi.

Controlli di verifica del cDNA e su campioni RT- sono stati eseguiti (figura 4.2.3).



**Figura 4.2.2. Espressione dei recettori Tas1R s e di alcuni membri della famiglia dei Tas2Rs nelle vie aeree di ratto.** Tutti i geni Tas2Rs analizzati risultano espresso nelle papille CV e Fol, mentre soltanto Tas2R105 e Tas2R134 risultano presenti nella FF. Tutti i Tas2Rs testati sono espressi nell'epiteliorespiratorio nasale, nella laringe e nella trachea e anche nei bronchi con l'eccezione Tas2R13. Solo Tas2R119 e Tas2R126 risultano presenti nel polmone. Nessuno dei tessuti utilizzati come controllo negative risultano positive ai Tas2Rs o Tas1Rs. M = marcatore di peso molecolare; CV = circumvallata; Fol = papilla foliata; FF = papilla fungiforme; RE = epitelio respiratorio; Lyx = laringe; Tra = trachea; Bro = bronchi; L = polmoni; Hea = cuore; Spl =milza; Br = cervello.



**Figura 4.2.3. Controllo su cDNA RT-.** Come standard interno è stato utilizzato il gene della gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH). L'amplicone contiene un introne di circa 200 bp, che permette di discriminare la presenza di contaminazioni di DNA genomico. A ulteriore conferma le reazioni di PCR su cDNA RT- come templato non danno l'amplicato.

### *Discussione*

La funzione delle SCCs nelle vie aeree inferiori è ancora in parte solo speculativa, come riportato nell'introduzione, ma sulla base di alcuni studi sembra coinvolgere la modulazione di risposte locali a livello epiteliale come l'azione mucociliare, le funzioni secretorie e l'attivazione del sistema immunitario innato. Per queste funzioni il nostro gruppo di ricerca ha riportato che anche le SCCs situate nella trachea, come già dimostrato per quelle presenti nella cavità nasale, rispondono alle molecole di "signaling" utilizzate dai batteri (Sbarbati et al., 2009). Diversamente da quanto accade per le SCCs nasali la risposta rimane solo locale e attiva cellule dendritiche o macrofagi tramite il rilascio di citochine.

La presenza della classe dei recettori dell'amaro appare quindi essere causa del riconoscimento delle molecole del "quorum sensing", e quindi dell'induzione della risposta da parte delle SCCs.

Tuttavia recenti studi su colture di cellule differenziate umane hanno prodotto conferme sul ruolo strategico dei Tas2Rs nelle vie aeree, ma hanno introdotto anche nuove questioni sul tipo di cellule che dispongono di questi recettori. Da un lato studi in vitro su cellule epiteliali umane di trachea o di muscolo liscio polmonare rispettivamente confermano l'influenza dei recettori dell'amaro sul movimento ciliare (Shah et al., 2009) e sull'induzione di un effetto bronco-dilatatorio che è stato convalidato in vivo in modelli di asma in topo, (Deshpande et al., 2010). Dall'altro estendono i tipi di cellule che presentano i recettori e gli elementi trasduttivi del segnale. Questi risultano presenti all'interno delle ciglia stesse delle cellule epiteliali ciliate (Shah et al., 2009) e addirittura nelle cellule muscolari lisce del tratto respiratorio (Deshpande et al., 2010). Queste osservazioni mettono in dubbio l'ampiezza del ruolo delle SCCs nelle vie aeree inferiori in mammiferi di grandi dimensioni come l'uomo.

Comunque il fatto che le famiglia di recettori dei Tas1Rs, che nella lingua hanno il compito di rilevare aspetti positivi del cibo, risulti presente anche nelle vie aeree inferiori, sebbene limitatamente alla laringe e alla trachea apre diversi interrogativi sul loro ruolo.

Gli stessi recettori implicati nella rilevazione di composti desiderabili nella cavità orale e nell'intestino, nella cavità nasale, dove monitorano la presenza di sostanze irritanti, e nella laringe inducono riflessi protettivi delle vie aeree. Nella trachea è probabile che inducano meccanismi simili a quelli elicitati dai recettori dell'amaro.

### **4.3. Il DCS nell'apparato digerente**

#### **4.3.1. Espressione dei recettori dell'amaro nell'apparato digerente**

I composti amari sono percepiti nella cavità orale attraverso la famiglia multigenica dei TAS2Rs che è presente oltre che nelle vie aeree e anche nel tratto , dove gli scopi di questo tipo di sensing sembrano essere la modulazione della motilità intestinale, dell'assorbimento, e la segnalazione paracrina ed endocrina.

La comprensione del ruolo della famiglia dei TAS2Rs può essere interessante nella prevenzione di disagi umani e i suoi recettori potrebbero essere un target per i farmaci.

Non è conosciuto estesamente quali dei singoli recettori siano espressi nell'apparato digerente.

Ho ricercato con la tecnica della RT-PCR l'espressione di alcuni TAS2Rs lungo l'intero apparato gastrointestinale di ratto. Di un iniziale set di possibili ampliconi, sono state utilizzate solo le coppie di primer che hanno prodotto una positività nella papilla circumvallata. In aggiunta ho eseguito dei western blot con anticorpi verso due geni addizionali, per un totale di 10 recettori TAS2Rs vagliati. Sebbene in ratto sia stato deorfanzizzato un solo recettore (il T2R9/TAS2R105; Bufe et al., 2002), in base a relazioni di ortologia e omologia di sequenza con recettori di altre specie di cui sono stati caratterizzati dei ligandi, per alcuni dei geni vagliati ho potuto dare un'interpretazione funzionale. Infatti nell'uomo attualmente sono stati trovati dei ligandi per 20 su 25 recettori umani (Meyerhof et al., 2010) e nel topo 2 su circa 33 (Chandrashekar et al., 2000).

#### ***Risultati***

I risultati di RT-PCR (si veda figura 4.3.1 e 4.3.2) indicano che tutti i geni vagliati sono trascritti nella papilla circumvallata, nella laringe e nell'organo vomeronasale, mentre solo un subset di questi (T2R4, T2R12 e T2R16). risulta presente anche nel tratto digerente. In particolare il recettore T2R16, che è stato caratterizzato essere specifico per il classico composto amaro denatonium benzoato, appare presente in tutti i tessuti esperimenti cellule chemosensoriali. In accordo con l'abbondanza di trascritto attesa i segnali di amplificazioni nelle papille circumvallate e papille foliate sono molto forti, mentre nelle papille fungiformi risultano spesso assenti o sono molto deboli, come del resto nell'apparato intestinale.

In totale abbiamo esaminato i geni dieci: T2R2, T2R3, T2R4, T2R7, T2R8, T2R9, T2R12, T2R16 con RT-PCR, e T2R6, T2R38 con Western Blot. Solo uno di questi geni del ratto sono stati direttamente deorfanzizzato (il rT2R9), ma per altri quattro, considerando l'alta omologia di sequenza, è ragionevole supporre che esse individuino il medesimo ligando dei loro ortologi umani

e murini. Qui di seguito sono riportati i nomi alternativi, ortologi e ligandi putativi di questi cinque recettori:

Il rT2R9 o Tas2R105 (e il suo ortologo in mT2R5 mouse) è un recettore per cicloesimide (Cyx) (Bufe et al., 2002), un inibitore della biosintesi delle proteine negli organismi eucarioti, prodotta dal batterio *Streptomyces griseus*, che è molto tossico per i ratti. Il Cyx è un repellente per roditori e la sua soglia di repulsività per ratti e topi è molto più bassa di quella di altri stimoli amari (meno di 1  $\mu$ M), tale che i ratti preferiscono morire di sete piuttosto che ingerire una soluzione di 15  $\mu$ M di Cyx (Hettinger et al., 2007).

Il rT2R3 o Tas2R16 (ortologo di hT2R16 e mT2R18) per omologia con il recettore umano è putativamente attivato dalla  $\beta$ -configurazione del legame glicosidico e dalla posizione sterica del gruppo idrossile in C4 del piranosio di beta-gluco-piranosidi (Bufe et al., 2002), una famiglia di composti che comprende ad esempio la salicine e l'amigdalina, ma anche vari glucosidi tossici cianogeni. Nell'uomo la variante allelica che permette una dieta con un'ingestione cronica di basso livello degli alimenti cianogeni è stata collegata con una maggiore protezione contro la malaria, ma in genere in zone dove la malaria non è più presente da tempo è selezionato positivamente l'allele ad alta sensibilità (Soranzo et al., 2005).

Il rT2R4 o Tas2R10, ortologo di hT2R10 (al Bufo et al., 2002) (e mTas2R107 o mT2R4) per omologia con quello umano sarebbe il recettore di stricnina, un fitoalcaloide che provoca convulsioni muscolari e che viene utilizzato come pesticida per i roditori (il letale la dose è di 1 mg / kg), ma è anche una delle sostanze più amare conosciute e il suo sapore è rilevabile in concentrazioni fino a 1 ppm.

Il rT2R16 o rTas2R108 è ortologo del recettore dei classici composti amari denatonium benzoato e PROP in topo T2R/Tas2R8 o T2R/Tas2R108 (Chandrashekar et al., 2000) e in *Homo sapiens* hT2R4 o Tas2R4 (Chandrashekar et al., 2000).

Il rT2R38 è ortologo di mT2R38 e hT2R38, che è stato definito come un rilevatore di PTC e di PROP (al Bufo et al., 2005). Comunque date le caratteristiche di questi due composti probabilmente sono rilevati anche da ulteriori recettori dell'amaro (Hayes 2008).

Il feniltiocarbamide (PTC) e il composto tiourea collegato 6-n-propiltiouracile (PROP) sono dei classici composti amari perché hanno un gruppo chimico in comune, il tiocianato ( $\text{NC} = \text{S}$ ), che ha un sapore amaro e attiva il recettore T2R38 (Bufe et al., 2005), e che è presente anche in composti glucosinolati che si trovano naturalmente in Brassicaceae verdure (broccoli, cavolini di Bruxelles, cavoli e cavoli) e che è associato con potenti effetti anti-cancro (Fahey et al., 1997). Non è conosciuto se oltre questi vantaggi, la presenza di queste sostanze modificare il flusso intestinale o regolare positivamente la digestione.

| Homo sapiens  | rat                   | mouse               | ligand   |
|---------------|-----------------------|---------------------|--|
| <b>hT2R16</b> | rT2R3                 | mT2R18              | beta-glucopyranosides                                      |
| <b>hT2R10</b> | rT2R4/Tas2r10         | mT2R4/mTas2R107     | strychnine   |
| <b>hT2R4</b>  | rT2R16/rTas2R108      | <b>mT2R8/Tas2R8</b> | denatonium benzoate and 6-n-propylthiouracil ( PROP)       |
| <b>hT2R38</b> | rT2R38                | mT2R38              | phenylthiocarbamide (PTC) and 6-n-propylthiouracil ( PROP) |
| -             | <b>rT2R9/Tas2R105</b> | <b>mT2R5</b>        | cycloheximide  |

Tabella riassuntiva dei ligandi ipotizzati di alcuni dei recettori studiati in base a considerazioni di ortologia. Per ogni specie è riportato il corrispettivo ortologo se presente. I recettori “deorfanzizzati” sono riportati in grassetto.

## Discussione

### Porzione orofaringea

Il primo risultato della presente indagine è che tutti i T2R indagati sono presenti nella lingua risultano presenti anche nella laringe. Questo è concorde con i dati presenti nella letteratura, e non è sorprendente se si considera la grande complessità dei taste buds. Anche sulla laringe sono presenti taste buds simili a quelle sulla lingua e molte cellule chemosensoriali che formano un continuo funzionale con la cavità orale nella rilevazione dei composti. Invece fra la cavità orale e l'apparato digerente vi è un'interruzione di continuità poiché l'esofago non presenta cellule chemosensoriali. La presenza di recettori T2R è quindi in accordo con la presenza di un epitelio ricco di cellule chemosensoriali nella posizione strategica della laringe, che è l'ultima barriera di monitoraggio durante la deglutizione per evitare l'ingestione di alimenti nocivi.

### Apparato digerente

#### T2R2, T2R3, T2R7, T2R8 e T2R9

Mentre nella lingua e nella laringe i recettori vagliati sono tutti espressi ci sono diversità di espressione nell'apparato intestinale. La maggior differenza è l'assenza di alcuni recettori amaro (T2R2 cioè T2R3, T2R7, T2R8 e T2R9).

Non è possibile dare una interpretazione certa. Inoltre, questo particolare dato è in contrasto con il precedente report (che si limita alla parte superiore del tratto gastrointestinale) di Wu e Rozengurt (2005). Da tempo è nota la diversità di comportamento in risposta all'amaro tra le varietà di ratto. L'assenza di espressione da noi rilevata per questi recettori può significare un livello di espressione più basso e non rilevabile o la mancanza dovuta alla diversa varietà (in questo caso Wistar rispetto a Sprague-Dawley). L'importante ruolo delle rT2R9 (recettore per il Cyx) avrebbe fatto ipotizzare la sua presenza. Comunque la sua assenza potrebbe essere funzionalmente irrilevante, poiché Cyx è

per i roditori tanto repellente che la presenza del suo recettore nel tratto gastrointestinale può essere superflua. E' interessante notare che risulta essere uno dei pochi recettori dell'amaro espressi nella papilla fungiforme (si veda il capitolo precedente), probabilmente a causa della sua specializzazione nel rilevare il Cyx.

#### *T2R16 e T2R4*

Questo studio riporta la presenza diffusa in tutto il tratto gastrointestinale ad eccezione del colon, del recettore rT2R4 che probabilmente è il recettore della stricnina nel ratto. Questa è un'ulteriore diversità con la precedente sopraccitata ricerca che ne segnala la mancanza e che supporta da un punto di vista funzionale la differenza percettiva verso i composti amari dei differenti ceppi di ratto. Anche l'rT2R16, il recettore del classico composto dal gusto amaro denatonium benzoato e di PROP, è presente in tutto l'apparato digerente.

Questo dato è in linea con la recente scoperta che l'infusione intragastrica di denatonium benzoato attiva un meccanismo di detossificazione che ritarda la digestione (Glendinning et al., 2008). Considerata la diffusione e il ligando di rT2R4, suggeriamo che allo stesso modo del recettore del denatonium benzoato anche il ruolo di rT2R4 possa essere coinvolto in questo meccanismo di protezione. La presenza di cellule chemosensoriali svolge un ruolo critico nel controllo delle funzioni di digestione, come l'attività secretoria, l'attività di assorbimento e di afflusso di sangue nel tratto intestinale. Una sostanza amara nel tratto gastrointestinale può ridurre la velocità a cui sono ingeriti alimenti e prolungare il tempo di digestione. Una capacità indispensabile per i roditori, che sono privi della capacità di espellere le sostanze tossiche una volta ingerite, perché mancano del riflesso del vomito.

Così come il rT2R16, è ragionevole che il rT2R4 e ulteriori recettori dell'amaro siano coinvolti in questo meccanismo, ed è probabile che assieme abbiano un'ampia capacità di rilevazione per diverse sostanze amare (Meyerhof et al, 2005; Brockhoff et al, 2007 ).

Poiché l'intestino può monitorare i nutrienti in più siti (Hofer et al., 1999) e impiegare diverse strategie di rilevamento a seconda delle concentrazioni luminali e le lunghezze di esposizione intestinale, è corretto ritenere che come per T1R, i recettori dell'umami e dolce (Bezençon et al. 2007; Mace et al, 2007; Margolskee et al, 2007) che hanno una diversità di espressione e differente presenza lungo l'intestino, anche i recettori amari presenti nel tratto digerente non siano presenti ovunque.

#### *T2R12, T2R6 and T2R38*

I risultati di espressione di T2R12, T2R6 and T2R38 confermano i dati concernenti lo stomaco e il

duodeno riportati in precedenti studi (Wu e Rozengurt, 2002 e 2006).

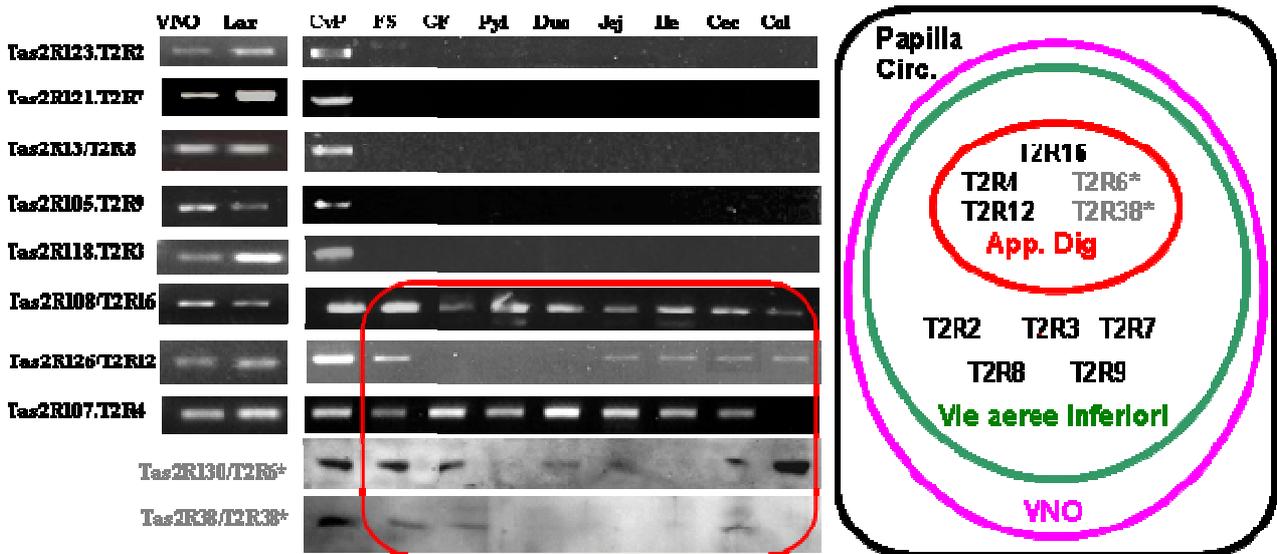
Il rT2R12 è presente nell'apparato digerente solo nel *corpus* e nel tratto tra il digiuno e il colon. I dati supplementari di Western blot (limitato all'apparato digerente) indicano la presenza di rT2R6 in tutti i tratti ad eccezione del digiuno e dell'ileo. Infine, troviamo che il rT2R38PTC, recettore di PROP e glucosinolati, è presente solo nello stomaco e nel ceco. I glucosinolati sono scomposti in isotiocianati dalle mirosinasi vegetali (questo accade se le piante sono consumate crude) nel piccolo intestino o da mirosinasi batteriche del colon, e i loro metaboliti sono rilevabili nelle urine umane 2-3 ore dopo l'assunzione di verdure del genere *Brassica* (Cartea e Velasco, 2008). Questo recettore è presente anche nel colon umano (Rozengurt et al, 2006.), e ciò suggerisce una correlazione con la formazione di isotiocianati.

Se nei ratti i glucosinolati hanno un qualche effetto, la presenza del recettore rT2R38 permette di rilevare la loro presenza prima della loro degradazione; in ogni caso anche i prodotti della degradazione degli isotiocianati sono amari. Questi composti possono essere responsabili di induzione selettiva all'apoptosi delle cellule tumorali, a sostegno della potenziale prevenzione e / o beneficio terapeutico dei prodotti di idrolisi dei glucosinolati contro diversi tipi di cancro (Fahey et al., 1997).

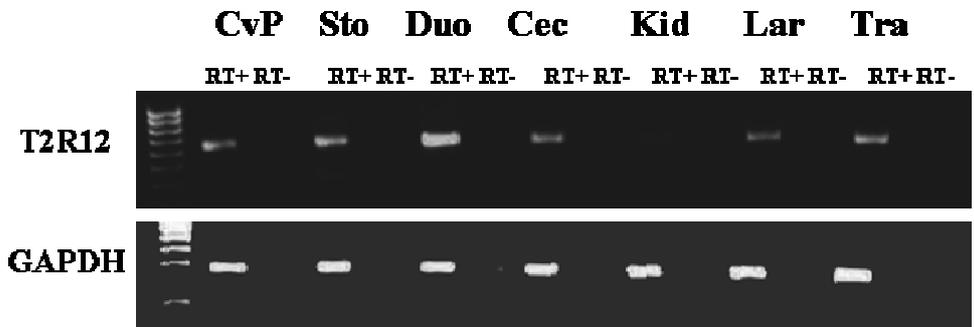
Generalmente la percezione di una sostanza amara co-evolve con la capacità di una specie di mangiare una pianta che è velenosa per le altre. Comunque vi possono essere alcune differenze intraspecifiche dovute a differenze alleliche.

La capacità di percepire il PTC è un carattere mendeliano e persone che possono o che non possono sentire il sapore del PTC si trovano in tutte le popolazioni umane, perché c'è stata una selezione bilanciata di entrambi gli alleli. Se i "PTC tasters" hanno meno probabilità di mangiare alimenti che potrebbero essere tossici, i non "tasters" hanno a disposizione una dieta con più varietà di scelta. Comunque la variabilità nella percezione del gusto amaro può influenzare il rischio di malattie cardiache, dell'obesità (l'adiposità in donne di mezza età è associata all'insensibilità genetica al gusto per PTC e PROP), del diabete, del cancro e anche le sensazioni emotive (i "super tasters" per il PROP risultano molto emotivi, Macht et Al. 2007).

Allo stesso modo sono presenti differenze nella percezione del gusto fra i roditori (i topi per esempio non sono sensibili alle amarezze del PTC) e tra le varietà all'interno della stessa specie (Tobach et al., 1974). Topi che sono ingegnerizzati per esprimere il recettore umano del PTC sviluppano avversione verso questo composto (Mueller et al., 2005). Tutte queste evidenze palesano l'importanza dell'espressione o meno di questi recettori o dell'allele presente sia nell'influenzare i comportamenti alimentari che nell'incidere sulla statistica dei disagi.



**Figura 4.3.1. Espressione dei membri della famiglia dei Tas2Rs RT-PCR.** (\*) I risultati per T2R6e T2R38, sono stati prodotti tramite western blot e limitatamente all'apparato digerente. Legenda: organo vomero nasale (VNO), laringe (Lar), trachea (Tra), bronchi (Bro), papilla circumvallata (CvP), fore stomach (FS), gastric fundus (GF), piloro (Pyl), duodeno (Duo), digiuno (Jej), ileo (Ile), ceco (Cec), colon (Col).



**Figura 4.3.2. Controllo della qualità del cDNA e dell'assenza di contaminanti negli esperimenti di RT-PCR.** Come standard interno è stato usato il gene del GAPDH. Per verificare l'assenza di contaminanti genomici gli esperimenti sono stati condotti su campioni di cDNA RT-. . Legenda: papilla circumvallata (CvP), fore stomach (STO), duodeno (Duo), ceco (Cec), laringe (Lar), trachea (Tra).

### Conclusioni

Le SCCs sparse all'interno del tratto respiratorio e gastrointestinale, possiedono similitudini morfologiche e molecolari con le cellule gustative linguale sostenendo l'idea dell'esistenza di un sistema diffuso chemosensorial (DCS).

Quando le spiacevoli sensazioni gustative suscitate da molti composti amari sono mascherate dalla presenza di zuccheri o di sodio o dall'adattamento individuale per il gusto amaro di alcuni innocui o se non vantaggiosi (per esempio per la resistenza alla malaria) il meccanismo di protezione orale dall'ingestione di sostanze nocive amare può essere aggirato. La presenza di cellule chemosensoriali nel tratto gastrointestinale permette di monitorare i composti presenti nel suo lume e può stimolare meccanismi di detossificazione, modificare la motilità (Glendinning et al., 2008), la secrezione, l'assorbimento (Mace et al., 2007), la fame e anche provocare la risposta infiammatoria (Bezençon et al., 2008).

Abbiamo osservato che in confronto alla lingua e alla laringe, nelle vie aeree e nel tratto gastrointestinale vi è un numero minore e selettiva di T2R. È interessante notare che tra i recettori T2R che risultano espressi nell'apparato digerente, alcuni sono espressi limitatamente in tratti distinti. Questa variazione del pattern di espressione T2R può riflettere funzioni differenti in diverse porzioni del tubo digerente e aiutare a ipotizzare il ruolo svolto, ma suggerisce anche che possano esserci cellule chemosensoriali che esprimano specifici clusters di recettori T2R.

Questo è uno studio preliminare che prende in considerazione l'esistenza nei diversi tessuti di un'espressione selettiva dei recettori T2Rs e che necessita di ulteriori indagini. Oltre ad estendere questo vaglio a tutti i geni T2Rs conosciuti, occorrerebbe indagare le differenze fra le diverse varietà. Inoltre occorrerebbe che venissero identificati i diversi alleli per poterne dare una interpretazione funzionale. Comunque questo darebbe solo un'idea del tipo di specializzazione delle cellule chemorecettoriali presenti. Per questo sono necessari studi di microscopia accoppiati a tecniche di marcatura citologica. La marcatura immunochimica delle cellule che li esprimono incontra delle difficoltà a causa scarsa reperibilità ed efficienza di anticorpi. Per aggirare la mancanza di anticorpi disponibili contro la famiglia T2R e di discriminare con maggiore specificità rispetto all'immunoistochimica tra le cellule chemosensoriali esprimenti i recettori amaro, si potrebbe ricorrere all'impiego di tecniche di ibridazione *in situ*, andando a rilevare tramite una sonda di RNA il trascritto genico. Tuttavia questa tecnica sebbene dia una specificità molto elevata è di difficile messa a punto, specie in alcuni tessuti. Come anticipato nella sezione dei risultati dedicata alla cavità orale l'utilizzo di sonde prodotte per l'amaro, che avrebbe dovuto essere di compendio al presente screening dei tessuti interi mediante PCR, ha dato dei responsi positivi limitatamente ai taste buds della papilla circumvallata. D'altronde al momento in letteratura risultano ancora assenti dati riguardanti la marcatura di cellule per i recettori dell'amaro nelle vie aeree e nell'intestino, lasciando pensare che ciò potrà essere aggirato solo con la creazione di animali transgenici. In aggiunta la piena comprensione della funzione dei recettori dell'amaro necessita anche di determinare specificità fra ligando-recettore per ogni singolo T2R, dato che molti

recettori amari sono ancora orfani del loro ligandi, perché i test funzionali per T2R espressione nelle cellule eterologhe hanno avuto poco successo, ma per ridurre questa lacuna è possibile sviluppare diversi modelli di espressione eterologa (Conte et al., 2006). Molto recentemente la loro funzione in campo umano ha suscitato interesse sono stati fatti diversi sforzi e al momento 20 dei 25 recettori dell'amaro umani sono stati deorfanzati (Meyerhof et al., 2010).

In conclusione risultati mostrano che in confronto a lingua e la laringe, nel tratto gastrointestinale è presente un numero minore e selezionato di recettori T2R. La loro espressione lungo il tratto digerente è variabile, e questo potrebbe riflettere le differenti funzioni di diverse porzioni e suggerisce inoltre l'esistenza di clusters di recettori T2R.

#### **4.3.2. Regolazione dei sistemi di assorbimento duodenale in funzione della dieta**

Nel nostro gruppo di ricerca è stata posta l'attenzione sull'impatto che possono avere gli alimenti sulla salute. Con il fine di mettere appunto un sistema in grado di discriminare gli effetti di alcuni alimenti sono state elaborate diverse diete integrate con tali alimenti e sono state amministrate ad animali di laboratorio. Il progetto coordinato dal dott. Degli Innocenti è stato finalizzato a valutare con differenti tecniche gli effetti sugli animali.

Sono state impiegate analisi imaging di risonanza magnetica nucleare, valutazioni metaboliche sui metaboliti presenti nel siero mediante spettroscopia NMR (risonanza magnetica nucleare), indagini istologiche e citologiche mediante microscopia ottica ed elettronica a scansione e a trasmissione, e analisi di biologia molecolare su alcuni tessuti.

Per quanto riguarda la biologia molecolare si è deciso di vagliare una porzione dell'intestino in quanto ha una grande capacità di adattamento funzionale al tipo di dieta e perché è l'organo dove gli effetti sono più diretti.

L'arrivo stesso dei nutrienti è paradossalmente da considerarsi una fonte di stress per l'organismo, poiché rompe l'omeostasi, e devono essere attivati molti meccanismi che limitino l'assunzione del cibo, mentre i pasti sono in corso (Woods, 1991).

La veloce rigenerazione dell'epitelio intestinale è un indicatore della capacità di adattamento dovute a eventi di compensazione. Tuttavia il perdurare di una situazione di stress alimentare oltre a essere causa di infiammazioni croniche può attuare delle modificazioni che possono essere prolungate e comprendere meccanismi di desensibilizzazione. Questo fenomeno può avvenire per esempio da parte di un'alimentazione ricca in grassi, e verrà analizzato nel prossimo capitolo.

È possibile che anche le SCCs vengano coinvolte in questi meccanismi, e che possano essere sensibili a certi tipi di dieta.

Per esempio si conosce che la completa attivazione dei meccanismi adibiti all'uptake degli zuccheri (SGLT1 e GLUT2) è dovuta alla stimolazione dell'eterodimero recettore del dolce Tas1R2-Tas1R3. È interessante notare che dato che questi recettori riconoscono a livello intestinale anche i dolcificanti artificiali. Ne consegue che questi dolcificanti dal basso contenuto calorico e l'alta capacità dolcificante hanno comunque la capacità di massimizzare l'assorbimento intestinale degli zuccheri ponendo degli interrogativi sull'effettività delle loro proprietà dietetiche (Mace et al., 2007).

Sono state quindi vagliati se vi erano cambi nell'espressione dei recettori delle famiglie dei Tas1Rs e dei Tas2Rs.

Poiché le diete integrate introducono rispetto alle diete standard degli sbilanciamenti nella quantità di peptidi, zuccheri, o acidi grassi è stato valutato se sono stati indotti dei mutamenti a livello di espressione degli elementi coinvolti nel loro assorbimento e nella secrezione. Le indagini di RT-PCR sono semiquantitative e sono finalizzate a rilevare solo cambiamenti macroscopici rispetto agli animali di controllo che hanno seguito la dieta standard, e la loro abbondanza relativa è rapportata al livello di espressione del gene GAPDH che è stato utilizzato come gene normalizzatore.

### *Materiali e metodi*

A ratti Wistar di 6 settimane di età di circa 200 g di peso è stata somministrata per 1 mese una dieta supplementata con alcuni alimenti utilizzati nell'alimentazione umana. Gli oli e la margarina sono stati somministrati utilizzando pane come vettore, per cui la dieta di controllo è supplementata con pane rispetto a una dieta standard)

Le diete testate:

Dieta controllo

Olio di cocco

Olio di oliva

Margarina

Farina di castagne (cruda)

Formaggio "abbucciato"

Carne chianina (cruda)

Per le indagini è stato estratto l'RNA totale dai campioni di tessuto di duodeno di 5 animali per gruppo dietetico, utilizzando il reagente TriFast (Euroclone, Milan, Italy), secondo le istruzioni indicate dal produttore.

Dopo il controllo dell'integrità su gel e la quantificazione spettrofotometrica, per ogni gruppo è stato fatto un pool dei singoli RNA. 1 µg di RNA totale è stato trattato con RNase-free DNase I Amp Grade (Invitrogen, Milan, Italy) per rimuovere eventuali tracce di DNA genomico ed è stato sintetizzato il cDNA utilizzando M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Le RT-PCR sono state eseguite utilizzando un termociclatore Eppendorf Mastercycler e i livelli di espressione sono stati normalizzati utilizzando il gene GAPDH come standard interno.

I prodotti ottenuti con la PCR sono stati identificati in base alla loro dimensione mediante elettroforesi su gel al 1,5% di agarosio. Per ogni trattamento si è proceduto alla valutazione dell'espressione del seguente pool di geni:

T1R2 per la rilevazione del dolce,

SGLT1, GLUT2, GLUT5 per il trasporto di glucosio e fruttosio,

T1R1 per la rilevazione di aminoacidi,

PEPT1 per l'uptake di peptidi

T2R2, T2R3, T2R4, T2R6, T2R7, T2R10, T2R12, T2R38 per la rilevazione di sostanze amare,

CD36 e FATP4 per l'uptake di acidi grassi,

CC26 per la secrezione esocrina

La subunità alfa della G-protein gustducina per stimare gli elementi esprimenti recettori chemosensoriali.

### ***Risultati***

La presenza dei marcatori delle cellule chemosensoriali è risultata di difficile rilevabilità a causa della bassa presenza degli stessi, e del sistema di prelievo del tessuto per l'estrazione del RNA, che non è stato limitato al solo epitelio ma esteso all'intero organo. Per cui non sono riportati risultati riguardanti la loro espressione. L'espressione dei rimanenti geni sono riportate in figura 4.3.3.

Per quanto riguarda il gene per l'assorbimento degli acidi grassi FATP4, il trasportatore attivo del glucosio SGLT1. In contemporanea alla nostra ricerca è stato riportato che in ratti Sprague-Dawley un infusione duodenale di tre ore di glucosio aumenta fino a 3 volte l'espressione di questo trasportatore rispetto a una infusione di acqua (Stearns et al., 2010). Potrebbe trattarsi di un effetto acuto, e comunque un caso limite con un controllo con nessun nutriente, quando in una situazione di alimentazione normale vi sono comunque gli zuccheri derivati dalla digestione dei carboidrati. Comunque se nel nostro studio vi fosse un effetto sul SGLT1 la grossolanità della tecnica di quantificazione non lo rileverebbe.

Se l'espressione del trasportatore attivo del glucosio SGLT1 non appare incrementabile in queste diete, non è così per i trasportatori passivi degli zuccheri. Come ipotizzabile appare un incremento del trasportatore solubile di membrana GLUT5 che è dedicato al trasporto del fruttosio limitatamente alla dieta con farina di castagne, l'unica contenente in maniera apprezzabile questo nutriente.

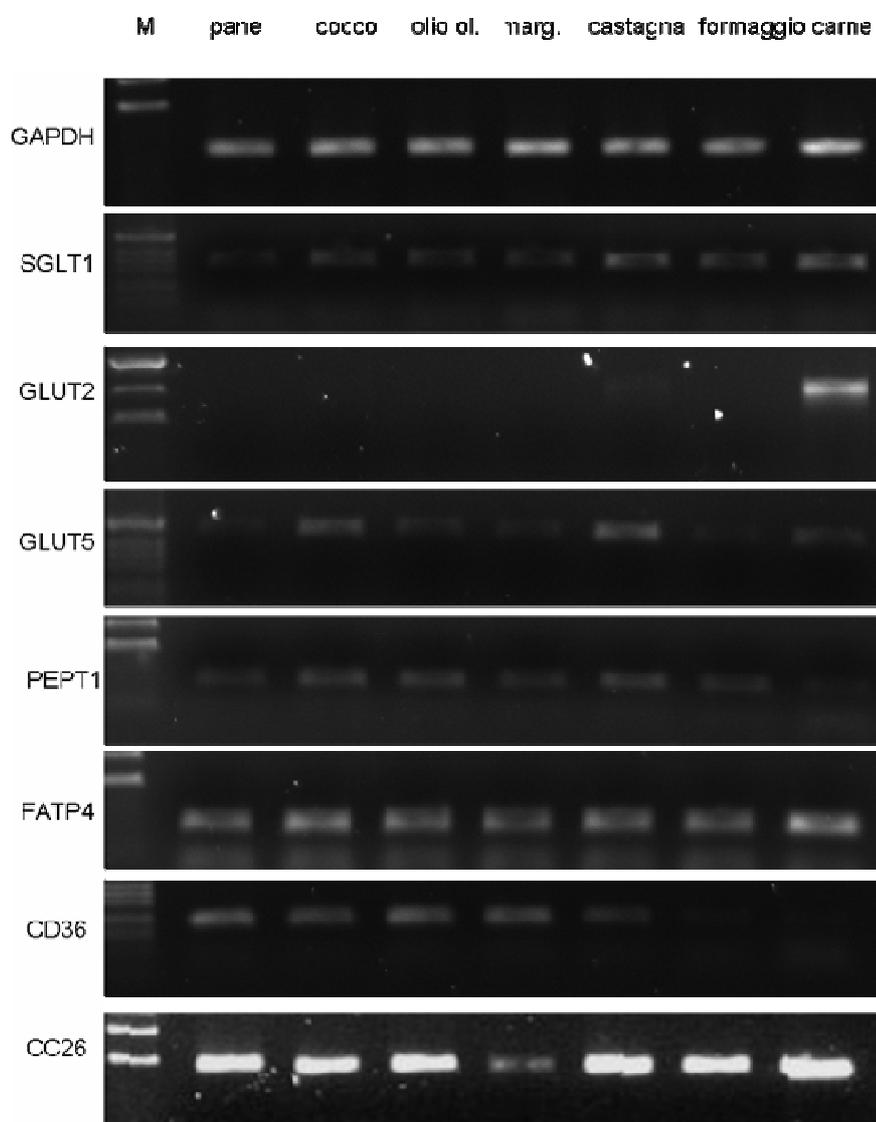
Inoltre vi è in aumento anche del GLUT2, che è dedicato al glucosio, sempre nella dieta con farina di castagne ma in particolar modo con la dieta integrata da carne.

Stranamente in questa ultima dieta il trasportatore di peptidi appare espresso più debolmente. Potrebbe trattarsi di un meccanismo di compensazione dovuta all'eccessiva assimilazione di proteine.

Per quanto riguarda la proteina di secrezione CC26 non vi sono cambi di espressione eccetto per la dieta con la margarina. Su questo effetto si possono fare solo delle ipotesi ma sicuramente può

essere interpretato negativamente. Infatti CC26 possiede un'attività perossidasi che protegge da stress ossidativi (Fisher et al. 1999).

Un discorso a parte è dedicato al trasportatore degli acidi grassi CD36, che oltre a facilitare l'assorbimento funge anche da retto di questi composti funzionali svolgendo diverse mansioni all'interno dell'organismo (recettore gustativo, controllo dell'omeostasi e "scavenger receptor"). La sua espressione appare fortemente diminuita nella dieta arricchita con formaggio e carne. Il suo livello espressivo potrebbe avere delle oscillazioni in risposta a i pasti, anche se sembra che venga diminuito da assunzione cronica di elevate quantità di grassi. Queste differenze richiedono maggiori approfondimenti a causa del coinvolgimento di questa glicoproteina di membrana in meccanismi che inducono sazietà. Questa interessante possibilità viene discussa nel prossimo capitolo.



**Figura 4.3.3. L'espressione dei geni indagati nelle sette diete testate** (controllo, olio di cocco, olio di oliva, margarina, farina di castagne, formaggio "abbucciato", carne chinina).

#### **4.4.3 Influenza delle diete lipidiche sul sensing intestinale degli acidi grassi e sul controllo della saziazione**

##### **Ambito del progetto**

Sempre nell'ambito del progetto volto alla di valutazione degli alimenti umani su animali da laboratorio, sono stati studiati gli effetti di alcuni oli alimentari.

Sono stati presi in considerazione degli oli extravergine di oliva, alimento caratterizzante la dieta mediterranea e risaputamente provvisto di diverse proprietà benefiche per la salute.

L'intero studio coordinato dal dott. Degli Innocenti è stato progettato per trovare delle differenze fra 3 miscele di oli extravergini di oliva di origine accertata (lago di Garda, Arezzo, Grosseto) grazie alla sensibilità della NMR nel rilevare i metabolici del siero.

Si tratta di un protocollo innovativo per testare non solo l'impatto degli alimenti sull'organismo tramite la loro somministrazione controllata, ma anche per valorizzare la tipicità degli stessi.

A confronto sono state poste una dieta supplementata con olio di oliva extravergine di bassa qualità, una con olio di cocco e un gruppo di controllo.

Complessivamente sono state testate 6 differenti diete in altrettanti gruppi di 5 ratti maschi e 5 ratti femmine, per un totale di 60 ratti. La dieta è stata molto prolungata per circa 2 mesi, e il contenuto di energia proveniente da grassi è stato del 20%, in modo da massimizzare gli effetti prodotti.

In questo progetto l'utilizzo della biologia molecolare è stato focalizzato nell'evidenziare quali fossero gli aspetti negativi di una dieta ricca in acidi grassi saturi rispetto al consumo di olio di oliva, oltre agli eventuali vantaggi del consumo di olio di oliva. Come organi sono stati presi in considerazione l'intestino prossimale a causa dell'alto carico diretto di grassi ingeriti, il tessuto adiposo inguinale e il fegato poiché coinvolti nel metabolismo dei grassi sono molto suscettibili ad un elevato apporto cronico di lipidi.

Per prima cosa è stata vagliata se l'espressione genica di due trasportatori degli acidi grassi, il FATP4 e il CD36, cambiasse fra le diete mediante real time PCR semiquantitativa. L'espressione della proteina FATP4 non risultava cambiare fra le diverse diete, come confermato anche nel capitolo precedente. Invece è stato notato che l'espressione del CD36 diminuiva rispetto al controllo principalmente nella dieta con olio di cocco.

Non essendoci differenza apparente tra gli oli extravergine di oliva pregiati la ricerca è stata ristretta al gruppo di controllo e alle diete supplementare con olio di cocco, olio di oliva di Arezzo e olio di oliva di basso pregio merceologico. Quindi è stato deciso di verificare e quantificare tramite PCR real time i livelli di questi cambiamenti. Le differenze trovate hanno spinto a studiare anche altri due geni che coinvolgono il CD36 nella produzione di un segnale di sazietà.

## **Riassunto**

**Introduzione** Il consumo di olio di oliva è implicato nei benefici della dieta mediterranea, e il suo più abbondante componente, l'acido oleico, è il precursore metabolico del mediatore lipidico OEA. Nell'intestino prossimale livelli postprandiali di OEA attivano PPAR- $\alpha$  inducendo un effetto anoressico. E' noto che una dieta lipidica influisce sulla espressione della traslocasi degli acidi grassi CD36, e che la delezione di questo gene abbassa i livelli intestinali di OEA, ma sono mancanti studi di diete che prendano in considerazione questa relazione.

**materiali e metodi** Abbiamo indagato in ratto gli effetti sul duodeno, il fegato e il tessuto adiposo di una dieta di 2 mesi supplementata con olio di oliva o con olio di cocco (olio saturo) valutando i livelli di trascrizione genica di CD36, di NAPE-PLD (l'enzima che sintetizza OEA), di PPAR-  $\alpha$  e affiancando indagini di istologia e MRI.

**risultati** Riportiamo che una dieta iperlipidica rispetto al controllo comporta nel duodeno un calo di tutti e tre i marcatori molecolari ma in maniera maggiore per l'olio di cocco, che induce anche infiammazione, mentre a livello del fegato porta ad un grande incremento di espressione di CD36.

**Conclusioni** Come presupposto nel duodeno la diminuzione di CD36 è accompagnata ad un calo di NAPE-PLD e PPAR-  $\alpha$ . L'esistenza di una correlazione di espressione di questi geni supporta l'ipotesi che CD36 abbia un importante ruolo nella modulazione di NAEs e quindi nel controllo dell'appetito. La diminuzione di questo tipo di sensing intestinale unito agli effetti infiammatori sono ulteriori elementi dannosi della tipica dieta occidentale ricca in grassi, soprattutto se saturi. I grassi saturi hanno un evidente impatto negativo anche nel fegato dove è presente una tendenza alla steatosi, mentre la dieta con olio d'oliva non sembra comportare effetti indesiderati.

## **Introduzione**

### **Proprietà dell'olio di oliva**

É conosciuto che un regolare consumo di olio di oliva è associato a diversi benefici come la riduzione dei disagi alle coronarie del cuore, dell'aterogenesi, la prevenzione dell'ossidazione delle LDL, e proprietà anti infiammatorie e vasodilatatorie.

Questo alimento è una miscela di composti che agisce su differenti vie metaboliche, e da tempo molte ricerche sono state e vengono tuttora indirizzate a valutare l'effetto della componente polifenolica, terpenica e di sostanze antiossidanti sulla salute (Cicerale et al. 2009, 2010; Camargo et al., 2010; Estruch, 2010; Konstantinidou et al., 2010), ma ultimamente l'attenzione si è spostata anche sul contenuto in acidi grassi insaturi e sull'acido oleico, l'acido grasso più presente nell'olio d'oliva. Infatti è stato individuato nell'intestino tenue un meccanismo di controllo dell'uptake di

acidi grassi e dell'induzione di "saziamento" (cioè un senso di sazietà che aumenta la latenza fra un pasto e l'altro) che funziona controllando il livello del mediatore lipidico Oleoylethanolamide (OEA), di cui l'acido oleico è il precursore metabolico, e che in altri tessuti è coinvolto nel controllo del metabolismo dei lipidi.

### **L'assorbimento degli acidi grassi per via diffusiva**

Negli ultimi anni approcci biochimici hanno suggerito un coinvolgimento di specifiche proteine nel trasferimento attraverso le membrane cellulari di "long-chain fatty acids" (LCFA), e conseguentemente è stato pensato che solo i corti e medi acidi grassi venissero assorbiti per diffusione.

Sono state caratterizzate tre proteine presentanti alta affinità per gli LCFA che sono localizzati nelle membrane con orsetto a spazzola ("brush border membrane", BBM) degli enterociti: la "plasma membrane-associated fatty acid-binding protein" (FABPpm), la "fatty transport protein 4" (FATP4) e il "fatty acid transporter" (FAT) o CD36. Recentemente nuove evidenze sui meccanismi cellulari e molecolari coinvolti nell'assorbimento del grasso nell'intestino hanno spinto a riconsiderare il meccanismo di assorbimento dei grassi nell'intestino (per una review vedere Niot et al., 2010). Ora è stato proposto che tutti gli acidi grassi liberi ("free fatty acids", FFA) possano attraversare le membrane plasmatica degli enterociti a grazie a uno strato "non mescolato" (unstirred water layer) in contatto con le BBM degli enterociti che costituisce un microclima in grado di promuovere la permeazione degli LCFA. Infatti un complesso di glicoproteine formato dal muco e dai glicocalici e un lì confinato basso pH generato da pompe protoniche permette agli LCFA di protonarsi e di attraversare spontaneamente la superficie. Una volta protonati gli LCFA sono assorbiti all'interno della membrana superficiale e in seguito ricollocati dal foglietto esterno a quello interno del doppio strato di fosfolipidi mediante un movimento "flip flop", ed infine de-assorbiti dal foglietto interno dentro vescicole. Proprio il movimento flip flop attraverso il doppio strato di fosfolipidi sarebbe uno step limitante nell'assorbimento a causa di limitazione steriche, ma è stato proposto che queste nella punta dei microvilli sarebbero minori e che quindi in lì sarebbe maggiormente favorita la permeazione degli FFA (Kampf et al., 2006).

A causa di questo occorre notare che non solo gli studi sull'assorbimento dei grassi in altri tessuti non dà indicazione sull'assorbimento intestinale, ma che anche gli studi effettuati su cellule isolate perdono di rilevanza, mentre rimangono validi gli studi condotti *in vivo* con metodi che rispettano il microclima intestinale e la circolazione linfatica.

### **Ruolo di CD36 negli enterociti**

In questa innovativa visuale le tre proteine di membrana con affinità per i lipidi isolate nella BBM degli enterociti acquistano nuove possibili funzioni. In particolar modo la glicoproteina CD36, che presenta un largo dominio extracellulare idrofobico con un'alta affinità per gli LCFA protonati e un'espressione modificabile dalla dieta, che potrebbe avere interessanti coinvolgimenti nella segnalazione cellulare.

Infatti Niot riporta che i loro dati non pubblicati indicano che quando ratti tenuti a digiuno sono alimentati vi è una rapida e lipide-dipendente sparizione del CD36 dalla BBM degli enterociti attraverso un meccanismo sconosciuto. L'autore suggerisce un possibile coinvolgimento nella segnalazione cellulare seguito da degradazione attraverso la ubiquitina. L'ipotesi della degradazione appare possibile dato che studi su linee cellulari HEK e su ovociti hanno già riportato l'ubiquitazione di CD36 a seguito di esposizione a acido palmitico e acido oleico (due ligandi di CD36), mentre l'insulina ha un effetto opposto – Smith 2008). Comunque già in precedenza Schwartz (2008) aveva suggerito che CD36 potesse essere coinvolto nel controllo del messaggero lipidico oleoylethanolamide (OEA), un mediatore lipidico anoressizzante membro della famiglia delle N-acylethanolamines (NAEs).

### **L' effetto anoressizzante dei NAEs e la loro modulazione**

Le NAE sono una famiglia di lipidi che includono l'endo-cannabinoide anandamide (o Arachidonoyl Ethanolamide, AEA), e che possiedono effetti antinfiammatori, analgesici, neuromodulatori e agiscono sulla regolazione dell'appetito.

Questo ultimo aspetto è molto interessante perché è stato dimostrato che il livello NAEs è influenzato dall'alimentazione e dalla dieta e che i loro precursori sono LCFA. Considerando che il livello di anandamide aumenta durante il digiuno stimolando l'appetito e diminuisce dopo il pasto, il livello dei lipidi anoressizzanti OEA, palmitoiletanolamide (PEA) e linoleoylethanolamide (LEA) (e dei loro precursori corrispondenti) hanno un andamento opposto (Petersen et al. 2005; Fu et al, 2007). Questo effetto anoressizzante sembra essere mediato attraverso l'attivazione degli attivatori trascrizionali "peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$ " (PPAR- $\alpha$ ), e necessita di una fibra sensoriale vagale intatta perché agisce attraverso l'attivazione del nucleo del tratto solitario nella corteccia cerebrale e il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (Hansen e Diep 2009; Borrelli e Izzo 2009). Fu (Fu et al., 2007) ha riferito che la risomministrazione di cibo nel ratto a digiuno per 24 ore induce un veloce (10 minuti) aumento del livello di OEA negli enterociti mentre quello di PEA rimane invariato e quello di AEA diminuisce. I livelli di OEA sono aumentati sia da un immediato aumento di attività di sintesi dell'enzima NAPE-PLD che da una maggiore espressione dell'enzima

(a 60 minuti è misurato un aumento di trascrizione del mRNA). Successivamente lo stesso autore (Fu et al., 2008), attraverso l'impiego di vettori virali per aumentare localmente la trascrizione di questo gene, conferma che il semplice aumento di espressione del mRNA di NAPE-PLD induce un aumento del livello di OEA e PEA, un incremento dell'espressione di PPAR- $\alpha$  e di CD36, e stimola un effetto anoressico. Comunque OEA sembra essere il mediatore più importante tra i NAEs anoressizzanti perché LEA, attraverso somministrazione orale, non inibisce l'assunzione di cibo (Petersen et al., 2005), e PEA possiede una minor capacità di attivazione rispetto a OEA (concentrazione a cui attiva PPAR- $\alpha$  al 50% , EC50 = 3.1  $\mu$ M per PEA, EC50 = 120 nM per OEA). In condizioni fisiologiche PEA attiva PPAR- $\alpha$  molto più lentamente di OEA, che raggiunge invece concentrazioni nel piccolo intestino che possono attivare completamente PPAR- $\alpha$  (300 nM) (Fu et al., 2007).

### **Effetto delle diete sui NAEs**

È rilevante che la dieta ad alto contenuto di grassi (45E%) riduca i livelli di NAE nel digiuno in modo diverso a seconda del tipo di grasso amministrato (Artmann et al. 2008). L'elaborazione ulteriore di questo studio (Diep et al. 2010) riporta che i livelli di PEA, OEA e Lea hanno una diminuzione in funzione del livello del contenuto in grassi presente nella dieta e della lunghezza del periodo di somministrazione e suggerisce la presenza di un "sensore del grasso" nel piccolo intestino. Questo aspetto è molto interessante per l'alimentazione umana, perché l'alto contenuto in grassi della dieta occidentale potrebbe ridurre la capacità di percezione di un segnale anoressizzante corretto attraverso la modulazione dei NAEs.

### **Possibile ruolo di CD36 nella segnalazione cellulare**

Come già menzionato Schwartz (Schwartz et al., 2008) ha proposto per primo che poiché CD36 è necessario per la risposta di OEA al "refeeding" e insieme al PPAR- $\alpha$  stesso è uno dei geni bersaglio dell'attivatore trascrizionale PPAR- $\alpha$  (Fu et al., 2003), CD36 potrebbe partecipare ad un'amplificazione del meccanismo anoressico incrementando il livello di OEA. Successivamente è stato riportato che l'eliminazione genetica di CD36 è correlata alla diminuzione nel digiuno (ma non nel duodeno) del livello di OEA (Guijarro et al., 2010), che assieme ai riferimenti riportati da Niot sulla scomparsa di CD36 dalla BBM degli enterociti (Niot et al., 2010) suggeriscono un suo ruolo nella segnalazione cellulare.

### **Il nostro studio**

I pochi studi condotti sugli effetti di brevi diete iperlipidiche o di somministrazione LCFA hanno

riportato riferito di contrasto sull'espressione di CD36. Mentre alcuni riportavano un incremento del CD36 (Poirier et al, 1996; Petit et al., 2006), altri una diminuzione (Chen et al., 2001). In particolare Chen riporta per la prima volta che esiste un'espressione differenziale lungo l'asse intestinale, e che una dieta iperlipidica diminuisce i livelli di CD36 in maniera significativa limitatamente al digiuno e al duodeno (questo ultimo in maniera maggiore). La conduzione di una dieta prolungata per 2 mesi di una dieta povera in grassi e di una dieta ricca in LCFA grassi insaturi (olio di oliva) o LCFA saturi con una buona presenza di acidi grassi di media lunghezza (olio di cocco), è stata la condizione di partenza per indagare aspetti che non sono stati ancora chiariti. Infatti attualmente in letteratura manca uno studio che prenda in considerazione gli effetti di una dieta iperlipidica sia sul livello di espressione CD36 che sulla sintesi di NAEs anoressizzanti, e che potrebbe chiarire se esiste una relazione tra la variazione glicoproteina e il livello di segnalazione anoressizzante, che candiderebbe CD36 come sensore del grasso nel piccolo intestino. Con l'obiettivo di rispondere in parte a queste questioni e valutare anche l'impatto sulla salute e sui tessuti abbiamo l'espressione del mRNA di CD36, NAPE-PLD and PPAR- $\alpha$  nel piccolo intestino, estendendo la ricerca anche nel fegato e nel tessuto adiposo inguinale.

## **Risultati**

### **Intestino**

La quantificazione attraverso la real time PCR mostra che l'implementazione della dieta con oli grassi induce una diminuzione pronunciata dei livelli di espressione di CD36 nel duodeno (fig. 4.4.1 A). Tuttavia abbiamo trovato che nelle diete con olio di oliva la riduzione è minore rispetto a quella con olio di noci di cocco e questo presume un impatto minore.

Simile è il profilo di espressione del mRNA di NAPE-PLD, con una minor riduzione nella dieta con olio extra vergine di oliva di qualità rispetto ad altre diete ad alto contenuto di grassi. Anche per l'espressione del mRNA di PPAR- $\alpha$  vi è un calo importante rispetto alla dieta a basso contenuto di grassi. Interessantemente tra le differenti diete il livello di espressione di NAPE-PLD e PPAR- $\alpha$  sembra seguire lo stesso trend di espressione CD36.

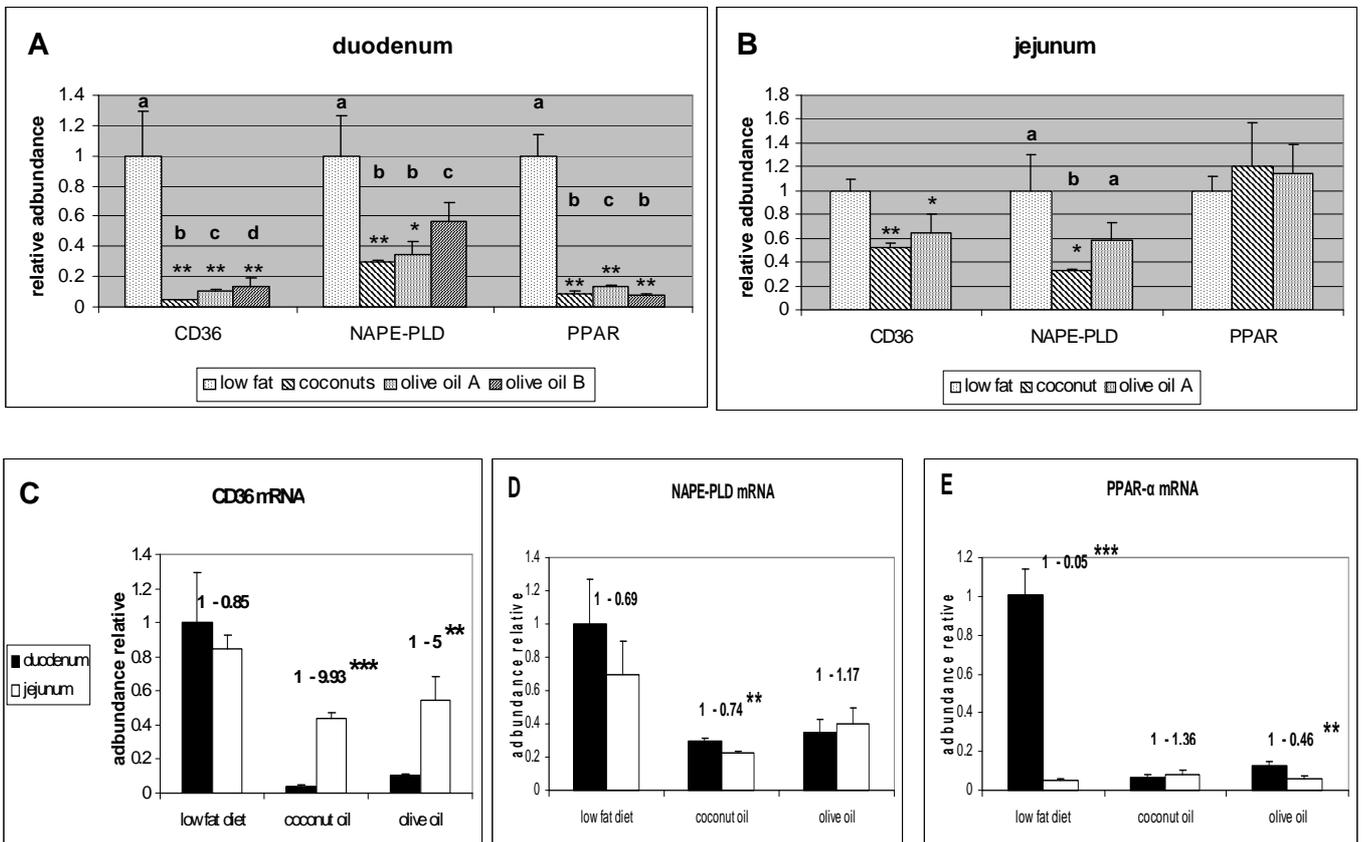
Per valutare la potenziale relazione tra l'espressione di questi geni nel duodeno si è calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson. Abbiamo trovato l'esistenza di una correlazione positiva tra i livelli di mRNA di CD36 e NAPE-PLD ( $r = 0,757$ ,  $p = 0,004$ ), CD36 e PPAR- $\alpha$  ( $r = 0,725$   $P = 0,008$ ) e NAPE-PLD e PPAR- $\alpha$  ( $r = 0,595$ ,  $P = 0,041$ ).

Le analisi istologiche hanno evidenziato a livello duodenale nei gruppi a dieta iperlipidica un modesto aumento dell'infiltrato linfatico nella mucosa. Tale infiltrato, negli animali sottoposti a

dieta supplementata con olio di cocco dà luogo talora ad ammassi nella tonaca propria che arrivano a scompaginare l'architettura villare.

L'esame ultrastrutturale in duodeno ha evidenziato rispetto ai controlli una riduzione dell'orletto microvillare negli animali trattati con cocco (1179 nm rispetto a 1242 del controllo), mentre per le diete con olio d'oliva l'orletto appare ben conservato. Successivamente per verificare se questa tendenza è simile più distalmente nell'intestino, abbiamo esteso l'analisi sull'espressione dell'RNA anche nel digiuno mediale degli animali stessi (fatta eccezione per l'olio d'oliva di alta qualità) (fig. 4.4.1 B). A livello di digiuno vi è una diminuzione significativa, ma più piccola nell'espressione di CD36 e di NAPE-PLD, ma senza differenze significative tra le diete iperlipidiche, mentre tra l'espressione di PPAR- $\alpha$  non c'è differenza nemmeno tra le diete ricche di grassi con quella povera in grassi.

**Figura 4.4.1. I livelli di espressione dei tre geni misurati nel duodeno e nel digiuno.** I dati di PCR real time relativi ai tre geni nel duodeno (A) e digiuno (B) sono raffrontati fra le diete, ponendo arbitrariamente a 1 il valore della dieta di controllo. L'abbondanza relativa dell'espressione dei tre diversi geni viene confrontata tra il duodeno e il digiuno (C,B,E) e viene riportato il rapporto ponendo il valore misurato nel duodeno uguale a 1. Le diverse lettere indicano gruppi significativamente diversi, gli \* indicano il grado di significatività calcolato con il test di Student (\* = < 0.05, \*\* = < 0.01, \*\*\* = < 0.001), la deviazione media standard è indicata dalle barre; n = 3.



Come conseguenza nel digiuno abbiamo trovato una correlazione di Pearson significativa di solo tra i livelli di mRNA di CD36 e di NAPE-PLD ( $r = 0,926$ ,  $p = 0,001$ ).

Il confronto tra l'abbondanza relativa tra duodeno e nel digiuno (figura 4.4.1 C, D, E) permette di osservare che, mentre i livelli espressivi di CD36 nella dieta a basso contenuto di grassi sono simili, nelle diete iperlipidiche il livello di mRNA digiunale CD36 sono molto più elevata di quella duodenale (5 -10 volte).

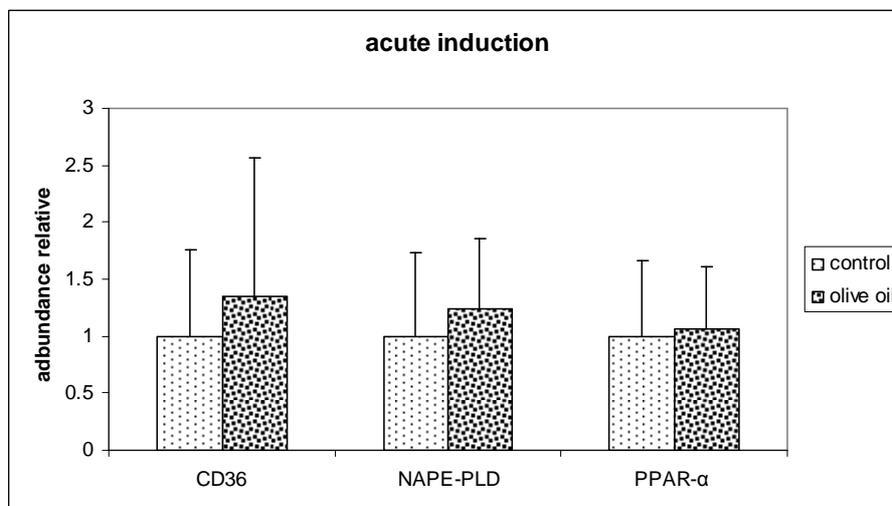
Inoltre nel trattamento dietetico povero in grassi i livelli di espressione di PPAR-  $\alpha$  duodenale risultano 20 volte più abbondanti di quello del digiuno.

Per controllare che l'effetto dieta sull'espressione genica sia dovuto alla somministrazione cronica e non alla singola assunzione abbiamo somministrato in un'unica dose una quantità di olio pari a quella somministrata giornalmente. Dopo sei ore dalla somministrazione acuta di olio d'oliva non sono rilevate differenze di espressione per i tre geni considerati (figura 4.4.2)

## Fegato

Nel fegato i dati di espressione dei 3 geni presi in considerazione (figura 4.4.3A) non mostrano correlazioni tra le loro variazioni di espressione. In ogni modo riportiamo delle differenze significative all'interno delle diete. C'è un grande effetto di sovraespressione di CD36 causato dalla grande quantità di acidi grassi saturi presenti nella dieta con olio di cocco, mentre le diete con olio di oliva non differiscono da quella di controllo.

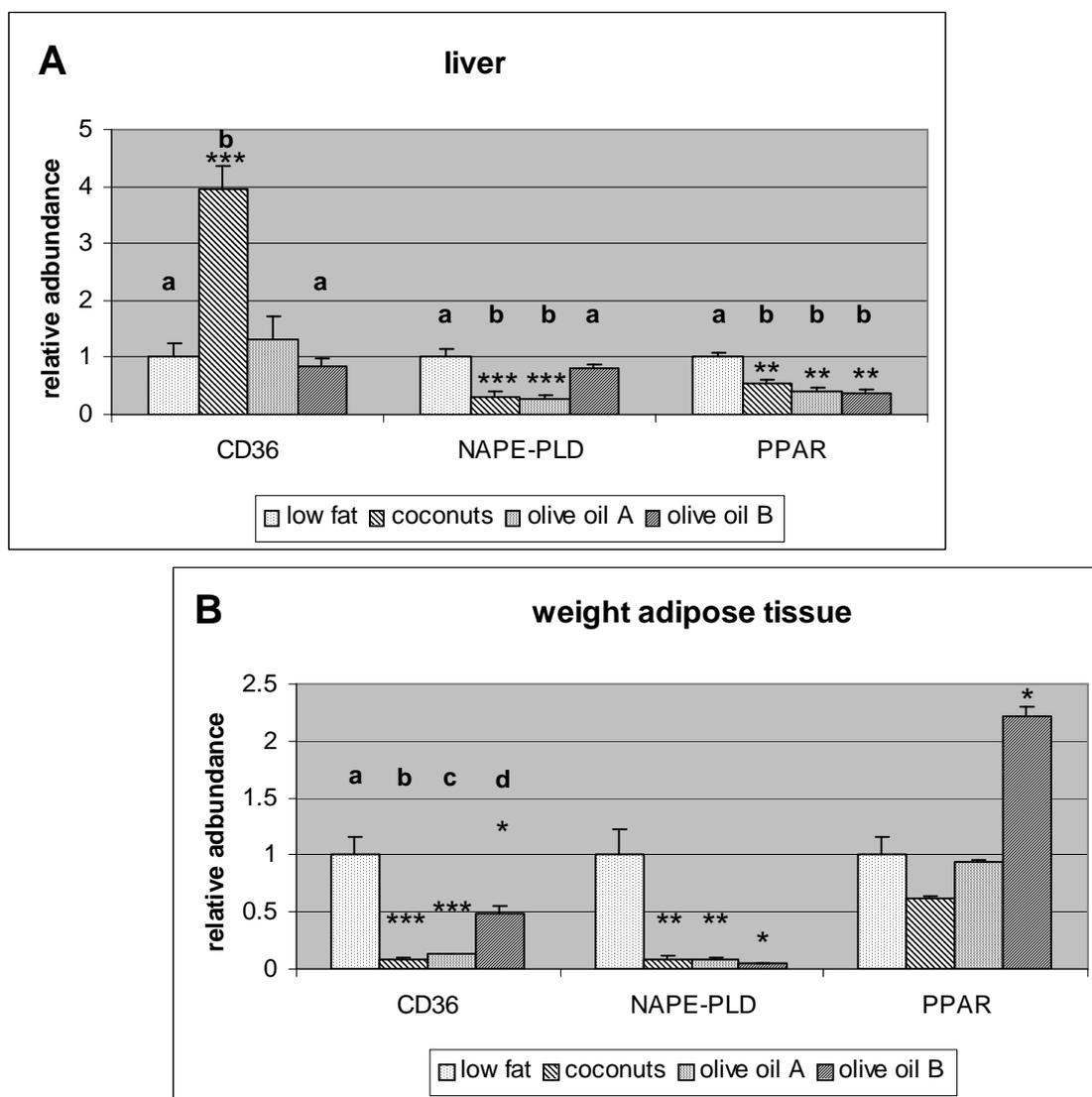
Per quanto riguarda il NAPE-PLD c'è una sotto regolazione rispetto al controllo, ma non per l'olio di oliva ad alta qualità. Invece l'espressione di PPAR-  $\alpha$  decresce indiscriminatamente in tutte le diete ricche in grassi.



**Figura 4.4.2. Effetti sul duodeno di una somministrazione acuta di olio.** A sei ore dalla somministrazione non si misurano differenze significative mediante l'analisi della varianza ( $n = 5$ ).

La MRS ha mostrato che in tutti i gruppi trattati con dieta iperlipidica si ha un aumento significativo rispetto al tempo 0 dei lipidi intra-epatici. Tale aumento non è tuttavia significativamente superiore a quanto si ha nei controlli a dieta standard nello stesso lasso di tempo. Tra i vari gruppi a dieta iperlipidica non si hanno differenze di rilievo per quanto riguarda la quantità di lipide misurata tramite rapporto idrolipidico.

Negli animali trattati con olio di oliva si ha invece un significativo aumento dell'indice di insaturazione, che non si ha negli altri gruppi.



**Figura 4.4.3. I livelli di espressione dei tre geni misurati nel fegato e nel tessuto adiposo.** I dati di PCR real time relativi ai tre geni nel fegato (A) e nel tessuto adiposo (B) sono raffrontati fra le diete, ponendo arbitrariamente a 1 il valore della dieta di controllo. Le diverse lettere indicano gruppi significativamente diversi, gli \* indicano il grado di significatività calcolato con il test di Student (\* = < 0.05, \*\* = < 0.01, \*\*\* = < 0.001), la deviazione media standard è indicata dalle barre; n = 3.

Nessuna differenza significativa si è invece avuta nell'indice di poliinsaturazione. Che si abbassa in tutti i gruppi a dieta iperlipidica rispetto ai controlli.

I controlli istologici hanno rivelato una normale morfologia del fegato in tutti gruppi.

### **Tessuto adiposo**

Nel tessuto adiposo inguinale l'espressione del mRNA di CD36 è diminuita dalle diete ricche in acidi grassi, ma in maniera più elevata nelle diete con olio di cocco, mentre l'espressione NAPE-PLD diminuisce molto ma indiscriminatamente in tutte le diete grasse (figura 4.4. 3 B).

Il PPAR-  $\alpha$  è diminuito dalla dieta con olio di cocco, ma mentre l'olio di oliva economico non crea cambiamenti rispetto al controllo, l'olio di oliva di alta qualità raddoppia i suoi livelli. Riportiamo l'esistenza di un link tra l'abbondanza relative di mRNA di CD36 e PPAR-  $\alpha$  ( $r = 0.656$ ,  $P = 0.020$ ).

### **Discussione**

#### **Intestino**

Studi che si sono avvalsi dell'utilizzo di delezione genica di CD36 e PPAR-  $\alpha$  hanno evidenziato il loro necessario coinvolgimento nell'induzione del senso di sazietà da parte dei NAEs (Schwartz et al., 2008). In aggiunta la loro espressione risulta inducibile attraverso la somministrazione esogena o endogena di OEA (Yang et al., 2006; Fu et al., 2010), che è utilizzabile per indurre "saziazione", al contrario la delezione genica di CD36 è correlata alla diminuzione del livello di OEA nel digiuno (Guijarro et al., 2010). Questi dati candidano a nuovi ruoli il trasportatore di membrana CD36 e spingono a fare nuove considerazioni sul tipo di trigliceridi introdotti con la dieta, poiché è stato riportato come differenti oli alimentari, possano influenzare i livelli di NAEs sia nell'intestino che in altri tessuti a causa della differente composizione dei loro precursori metabolici (Artmann et al., 2008). Inoltre l'attivazione di PPAR-  $\alpha$  a livello intestinale gioca un ruolo importante nel regolare diversi pathway metabolici, l'apoptosi e il ciclo cellulare e nella repressione della risposta infiammatoria (Bünger et al., 2007). Date queste premesse era presumibile supporre che l'acido oleico assunto con la dieta, essendo il precursore metabolico del mediatore lipidico OEA, potesse agire nell'intestino alla stregua di un farmaco agendo sulla stessa catena di amplificazione del segnale tramite l'aumento dei livelli di OEA, avendo un'azione di induzione di PPAR-  $\alpha$  e del trasportatore CD36.

#### *Le diete lipidiche abbassano l'espressione duodenale di CD36*

Pochi studi di somministrazione alimentare prolungati hanno considerato il cambiamento dei

trasportatori degli acidi grassi intestinali, in particolare per la glicoproteina CD36.

Da tempo è chiaro che la sua abbondanza nei diversi segmenti intestinali di trasportatori di acidi grassi rispecchia il maggior uptake di acidi grassi dell'intestino prossimale (Chen et al., 2001).

In ratto è stato riportato che una breve dieta di tre giorni con olio di girasole accresce in tutto l'intestino i livelli di CD36 (Poirier et al., 1996), mentre in topo viene riportato che una high-fat diet induce un incremento nel digiuno di CD36 e altri trasportatori lipidici (Petit et al., 2006) trovando che l'intestino si adatta alla richiesta di un maggior assorbimento di grassi.

In letteratura non sono presenti lavori che riportano una dieta ricca in grassi diminuisca l'espressione di CD36. Noi riportiamo un calo di espressione duodenale di CD36 in seguito a una dieta iperlipidica di 2 mesi piuttosto marcato (abbattimento di circa 10 volte).

A questo calo si accompagna anche quello di espressione di NAPE-PLD e PPAR –  $\alpha$  (che è in accordo con i cali dei livelli di NAEs già descritti da altri autori (Diep et al., 2011). Inoltre riportiamo l'esistenza di una correlazione diretta tra le espressioni di questi tre geni che confermerebbe il possibile ruolo di CD36 nella modulazione dei NAEs almeno nel duodeno, sebbene siano state considerate diete differenti.

#### *Effetto dovuto a una regolazione di feedback*

Il calo di espressione di questi geni, come avviene d'altronde per gli "anorectic" NAEs in risposta ad una dieta iperlipidica, potrebbe essere dovuto sia ad un effetto postprandiale (Petersen et al., 2006; Fu et al., 2007) che a un effetto cronico (Diep et al., 2011).

Infatti potrebbero avvenire veloci regolazioni di feedback anche per CD36 in concomitanza delle modificazioni dei livelli di NAEs che sono legate ai livelli di attività enzimatica e trascrizionali di NAPE-PLD (Fu et al., 2007).

I livelli intestinali di NAPE-PLD cambiano in relazione al feeding e al digiuno, e sebbene questo ciclo di attivazione e repressione genica non sia stato finemente studiato i dati presenti in letteratura permettono di fare alcune considerazioni.

Viene riportato che in ratto in seguito ad un digiuno prolungato 24 ore, il refeeding causa un quasi istantaneo aumento dell'attività enzimatica e un incremento nella trascrizione genica che è massimo attorno ad un'ora, per poi ritornare ai livelli della condizione free feeding dopo 4 ore di esposizione al cibo (Fu et al., 2007). Similmente l'espressione di CD36 subisce un decremento in seguito ad un ora di somministrazione di oleato tramite gavage intraduodenale (Chen et al., 2001).

Potrebbe quindi esistere anche a livello degli enterociti dei meccanismi di feedback sul traslocatore CD36 che potrebbe coinvolgere il trafficking nel citosol, il riciclo e la degradazione. Uno studio su cellule HEK e ovociti (Smith et al., 2008) riporta un'ubiquitinazione in seguito a esposizione ad

acido palmitico o acido oleico. Questo sarebbe in accordo con quanto riferisce Niot (Niot et al., 2010) che riporta una sparizione del CD36 dalla BBM.

Schwartz ha proposto che CD36 oltre ad avere un ruolo nell'incentivare la produzione dei NAEs, abbia un ruolo di amplificazione del segnale poiché l'attivazione di PPAR-  $\alpha$  induce anche la trascrizione di CD36 andando quindi a incrementare ulteriormente il livello di NAEs.

Noi ipotizziamo che alla luce di una sua probabile degradazione è maggiormente probabile un ruolo nella modulazione del segnale di saziazione. Infatti dopo aver indotto la produzione di NAEs la sua degradazione verrebbe rimpiazzata dall'attivazione di PPAR-  $\alpha$ , che attiva la sua trascrizione genica permettendo il suo ripristino per il prossimo ciclo di segnalazione.

#### *Effetto dovuto alla cronicità del trattamento dietetico*

Un aspetto sicuramente importante dal punto di vista della nutrizione e della salute umana è l'effetto cronico di una dieta iperlipidica su questo poco conosciuto sistema di fat sensing intestinale. La prova di singola somministrazione effettuata non fa registrare cambiamenti fra i controlli negativi (somministrazione di soli carboidrati) e positivi (carboidrati implementati con olio di oliva) a 6 ore dall'induzione (e con 5 ore di digiuno), quando plausibilmente dovrebbero essere ricondotte allo stato basale i cambiamenti espressivi di questi geni. E' possibile che il maggior impatto di una somministrazione cronica in seguito all'adattamento dell'intestino crei cambiamenti trascrizionali molto importanti e non subitamente riconducibili ai livelli di una singola induzione.

Sarebbe inoltre interessante approfondire dopo quanto tempo si manifestano questi effetti e in che misura e tempi siano reversibili. Infatti, uno studio (Petit et al., 2006) di somministrazione di diete iperlipidiche in topi per tre settimane riporta che i livelli di FATP4 rimangono più elevati anche tre settimane dopo al ritorno ad un'alimentazione normale.

#### *Il possibile effetto delle alterazioni alla mucosa intestinale*

I cambi trascrizionali che riportiamo potrebbero comunque essere legati al fatto che a livello intestinale l'espressione di queste proteine sembra essere colocalizzata negli enterociti maturi e che quindi potrebbero essere rapportati anche alla superficie villare.

Infatti la proteina di membrana CD36 nell'intestino è espressa nei microvilli degli enterociti localizzati nella parte superiore dei villi intestinali mentre risulterebbe assente nelle cripte (Poirier et al., 1996), e anche l'enzima NAPE-PLD (Fu et al., 2007) e PPAR-  $\alpha$  (Bünger et al., 2007) vengono espressi negli enterociti. Quindi possibili alterazioni alla mucosa intestinale dovute alla dieta iperlipidica potrebbero aver influenzato le misure dei livelli trascrizionali di questi tre geni. Da tempo è noto che a causa del delicato equilibrio fra proliferazione cellulare e desquamazione, una

situazione di stress prolungato della mucosa intestinale causa una desquamazione accelerata con perdita dei villi (Menge 1976).

In topo è stato riportato che una dieta ricca in lipidi è da considerarsi un forte stimolatore della rigenerazione della mucosa (Buts et al., 1990; Dunel-Erb et al., 2001) e anche in ratto in condizioni di “bowel resection” dà iperplasia epiteliale e sembra dare vantaggi al riadattamento nel tratto distale dell'intestino (Sukhotnik et al., 2003, 2004 and 2008) sebbene ulteriori indagini hanno mostrato che gli  $\omega$ -3 fatty acids hanno effetto positivo sul riadattamento solo se somministrati intraperitonealmente, e non tramite la dieta (Sukhotnik et al., 2010).

Tuttavia a livello intestinale un carico consistente e prolungato di acidi grassi è da considerarsi una situazione di stress che dà infiammazione. E' stato in precedenza riportato che somministrazioni di grassi saturi (burro) causano una migrazione di linfociti T a causa di un aumento nell'espressione di molecole di adesione, che sono mediate da TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) prodotte dai macrofagi intestinali, che invece non vengono indotte da acido oleico e linoleico (Fujiyama et al., 2007).

Anche la somministrazione di acidi grassi insaturi induce tramite un meccanismo differente un accumulo di linfociti ma confinato alle placche di Peyer (Tsuzuki et al., 1997) e una secrezione maggiore di citochine infiammatorie da parte delle cellule epiteliali (Yoshida et al., 2001). Nel 2009 viene riportato che una “high saturated fat diet” aumenta l'apoptosi degli enterociti dei villi duodenali di ratto in maniera dipendente dal tempo (Gniuli et al., 2009, 2010). D'altro canto è pure riportato che l'attivazione di PPAR- $\alpha$  reprime la risposta infiammatoria intestinale, reprime i geni coinvolti nell'apoptosi e nella proliferazione a favore della differenziazione degli enterociti con un incremento dell'altezza e dell'area dei villi (Bünger et al., 2007).

Anche noi abbiamo osservato zone infiammate che presentano l'orletto a spazzola accorciato accorciati, che assieme a una minor superficie villare potrebbero contribuire ad un calo dell'espressione delle proteine di membrana.

#### *Effetto a livello prossimale e distale*

Questi effetti sono presumibilmente massimi nel tratto prossimale del duodeno a causa del grande carico iniziale di lipidi, mentre nell'intestino distale non è attesa una consistente alterazione della struttura. Infatti, in accordo con le espressioni geniche misurate nella porzione duodenale attigua al piloro (1-4 cm distalmente dallo sfintere pilorico) abbiamo registrato un aumento dell'infiltrato linfatico, uno sfaldamento dei villi nelle diete iperlipidiche, in particolare nella dieta con FA saturi che presenta anche un generale assottigliamento dell'orletto microvillare. Quindi una minor espressione del CD36 sembrerebbe dovuta non soltanto ad un meccanismo di downregulation del gene CD36, ma anche ad una diminuzione del numero di enterociti esprimenti la proteina a parità di

segmento intestinale e di superficie epiteliale degli stessi. Poiché dagli stessi animali avevamo prelevato anche un segmento di digiuno centrale, dove è previsto il maggior uptake degli LCFA, abbiamo potuto valutare che la downregulation è qui molto minore (all'incirca si dimezza) sebbene sia sempre superiore per l'olio di cocco. Comunque più a valle potrebbero non avvenire modificazioni dell'espressione di CD36 a causa della perdita di significato biologico o per la ridotta quantità di lipidi transitata, come riportato nell'ileo da uno studio di cambio di espressione sull'intero intestino (Chen et al., 2001).

Infatti è stato riportato che l'infusione di acido oleico ha la capacità di aumentare la latenza fra i pasti se somministrato a livello del duodeno, ma non a livello dell'ileo dove ha solo la capacità di indurre sazietà (decrese cioè la quantità di cibo consumato durante il pasto) (Woltman and Reidelberger, 1995).

Il calo di espressione di NAPE-PLD nel digiuno è più attenuato e con un'abbondanza relativa di trascritto non differente dal duodeno, mentre non vi sono mutamenti nei livelli di espressione di PPAR- $\alpha$  rispetto alla dieta low fat.

Sebbene vi sia un decremento in tutte le diete iperlipidiche, interessante l'olio di oliva ha un impatto minore rispetto all'olio di cocco, probabilmente non solo a causa del basso contenuto in corti e medi FA, ma anche del maggior contenuto in LCFA precursori dei NAEs

Questo è suggerito dal dato che un'infusione intraduodenale di acido oleico stimola la produzione di OEA (Schwartz et al., 2008), o che fra diverse diete integrate con oli vegetali quella con olio di oliva abbatta di meno i livelli di OEA (Artmann et al., 2008)

#### *Perché i dati presenti in letteratura sono contrastanti*

Anche in questo caso risulta differente l'effetto di una dieta rispetto alla singola somministrazione, ma occorre considerare un'altra differenza. Mentre nello studio effettuato tramite infusione intraduodenale di acido oleico è stato misurato il picco postprandiale in seguito a una situazione di digiuno perdurante da 6 ore, i risultati di Artmann sono opposti a causa del diverso tempo di prelievo. Inoltre poiché sono i prodotti della digestione dei grassi ad essere rilevati dal "nutrient sensing" dell'intestino e non i trigliceridi interi (per una review recente vedere Little e Feinle-Bisset, 2010) nell'esaminare gli studi dietetici riportati in letteratura occorrerebbe valutare il possibile differente effetto fra la somministrazione di un trigliceride mediante gavage, che evitando il trattamento delle lipasi linguali arriva nel digiuno non completamente emulsionato e la somministrazione di acido grasso libero complessato con un sale (e quindi già pronto ad essere assorbito). Pochi sono gli studi in letteratura che siano direttamente confrontabili per modalità e tempi di somministrazione, rendendo i dati riportati apparentemente contrastanti e di difficile

interpretazione. Risulta evidente che nel determinare queste risposte molecolari, entrino in gioco molte variabili, non solo le fasi oscillanti di espressione dovute al ciclo di digiuno e alimentazione di cui manca uno studio esaustivo. A cominciare dal tipo di somministrazione che potrebbe dare risultati ben diversi se si discosta da quella naturale che consente l'inizio della digestione mediante le lipasi linguali (Roy et al., 1979; Armand et al., 1997) e l'invio di segnali all'apparato intestinale (Laugerette et al., 2005; Greenberg et al., 1988), e quindi dalla differenza fra la somministrazione di trigliceridi o acidi grassi complessati (Greenberg et al., 1988), dal livello di emulsificazione e dalla taglia delle gocce di grasso (Borel et al., 1994; Armand et al., 1999), dalla stabilità nell'acido ambiente gastrico (Little et al., 2007; Marciani et al., 2007, 2009) dal tipo di olio (Artmann et al., 2008), dal livello lipidico e dalla durata della dieta (Diep et al., 2010).

Occorre poi valutare il punto il segmento monitorato del tratto intestinale e gli effetti postprandiali. Inoltre occorre considerare che l'intestino produce oltre 20 tipi di differenti ormoni (si vedano le review Capasso and Izzo 2008; Hameed et al., 2009; Neary and Batterham 2009), e che quindi probabilmente il subentro di altri meccanismi in risposta al tipo di dieta e somministrazione potrebbe ulteriormente influenzare il tipo di risposta.

Inoltre era già stato riportato in ratto che una high fat diet condotta per 2 settimane riduce sia l'inibizione del "gastric emptying" che l'effetto di saziazione indotti dall'infusione intraduodenale di oleato (Covasa and Ritter, 1999; 2000), o dalla somministrazione intraperitoneale di CCK (Covasa and Ritter, 1998; 2001) attraverso una selettiva riduzione nella risposta neuronale alla stimolazione intestinale con acidi grassi (Covasa et al., 2000). Questo effetto di perdita di sensibilità interessanti non avviene in varietà non inducibili all'obesità mediante high fat diet (Donovan et al., 2009), aprendo la questione sul differente modo di rispondere dei soggetti umani all'aumento di peso (Blundell et al., 2005) e alla perdita di sensibilità intestinale agli acidi grassi (Boyd et al., 2003) in seguito a una dieta grassa. (anche se sembra che gli individui magri siano percettibili di un calo di sensibilità verso CCK esogeno (Little et al., 2008).

### *Oli d'oliva e salute*

Questo lavoro essendo basato su una dieta prolungata per 2 mesi ha inteso monitorare cambiamenti cronici a livelli basale nell'intestino, piuttosto che downregulation legate al ciclo del digiuno per cui sono necessari degli approfondimenti.

Abbiamo rilevato una differenza consistente fra oli e sicuramente l'effetto diverso è dovuto alla componente di FA per due motivi. La grande quantità di MCFA (in particolare l'acido laurico che è presente per il 47%) e la varietà di LCFA saturi presenti nell'olio di cocco non agisce direttamente su CD36 (Nassir et al., 2007; Laugerette et al., 2005), né sembra indurre un effetto sui NAEs (infatti

è riportato che l'acido palmitico non agisce su PEA (Schwartz et al., 2008) probabilmente è dannosa non solo su tutto l'organismo, ma anche localmente sull'intestino, perché i corti e i medi FA vengono assimilati per via diffusiva (Kamp and Hamilton, 2006; Niot et al. 2009) senza apparenti meccanismi di membrana per controllarne e monitorarne l'assorbimento, e inoltre come sopra citato inducono un accumulo di linfociti. Inoltre vi è un ulteriore danno, poiché mancando di un effetto "saziante", i pasti sono (come è stato notato durante le ore di somministrazione della dieta implementata) più prolungati e vicini tra loro. Alcuni studi in animali riportano, infatti, che diete sbilanciate verso un'alta quantità di grasso spingono ad un consumo eccessivo di Kcal e desensibilizzando progressivamente i meccanismi di saziazione (Covasa et al., 1999; Diep et al., 2010), e anche nell'uomo la risposta del tratto gastrointestinale attraverso altri meccanismi di soppressione del food intake risulta attenuata da una dieta high fat (Boyd et al., 2003).

## **Fegato**

Il fegato è un organo chiave nel metabolismo dei lipidi e nella detossificazione, ed è colpito da disagi dovuti a diete ad alto apporto calorico e ricche in grasso. È già stato riportato che una dieta inducente obesità (60% Kcal da lardo) incrementa l'espressione di CD36 nel fegato di (Koonen et al., 2007).

Sebbene le diete con olio extravergine di oliva siano ricche in FA quanto quella con olio di cocco, sorprendentemente non abbiamo riscontrato alcuna differenza di espressione nei confronti della dieta povera in grassi. Invece i dati di real time PCR rivelano che la dieta con olio di cocco, benché i soggetti dopo due mesi di dieta non presentassero ancora un'anormale struttura del fegato, aumenta di ben quattro volte i livelli di CD36. Alte espressioni di CD36 nel fegato sono associate con la steatosi (Zhou et al., 2008; Guillén et al., 2009) e la steatoepatite (Larter et al. 2009) e generalmente viene suggerito che siano causate da alti livelli di trigliceridi nel sangue, i quali generano infine un accumulo di grasso nel fegato.

Poiché i livelli epatici di CD36 nelle diete con olio di oliva sono normali, i nostri dati indicano che l'innalzamento dell'espressione di CD36 nel fegato potrebbe essere dovuta soltanto all'effetto degli acidi grassi saturi. Questa osservazione suggerisce che un consistente livello di lipidi insaturi nella dieta non sembra pericolosamente coinvolto nell'insorgere della steatosi.

In ogni caso in tutte le diete testate né le analisi istologiche, né quelle di MRS indicano cambiamenti nell'aspetto citologico o immagazzinamento di grassi saturi. Invece l'aumento del grado di insaturazione del fegato da parte delle diete con olio di oliva potrebbe essere un effetto positivo della dieta mediterranea.

Per quanto riguarda gli altri due geni studiati, abbiamo trovato un decremento nell'espressione rispetto al controllo che indica presumibilmente un effetto negativo su questo organo.

È stato riportato che il livello di OEA è innalzato da una dieta con olio di oliva, ma non da altri (Artmann et al., 2008), e che la somministrazione di OEA induce lipolisi e contrasta la dislipidemia epatica (Guzmán et al., 2004; Fu et al., 2005). In effetti abbiamo trovato che i livelli di espressione di NAPE-PLD non cambiano tra la dieta di controllo e l'olio di oliva di alta qualità ma decresce di approssimativamente 3 volte nelle altre due diete.

Sebbene sia stato riportato che nel topo PPAR-  $\alpha$  induce l'attivazione di CD36 nel fegato (Motojima et al., 1998; Sato et al., 2002) anche PPAR-  $\alpha$  diminuisce in tutte le diete iperlipidiche e non troviamo nessuna correlazione di espressione con i livelli di CD36. Comunque la diminuzione di espressione di PPAR-  $\alpha$  è probabilmente legata ad un minore livello di beta-ossidazione degli acidi grassi (Larter et al., 2009). L'osservazione che in topo una dieta ricca in n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA)(i cosiddetti acidi grassi omega 3), ma non in n-9 PUFA (come è principalmente l'olio di oliva), aumenta l'espressione di PPAR-  $\alpha$  , potrebbe significare che vengono coinvolti diversi PPAR agonisti (Jump 2008; Cho et al., 2008).

## **Tessuto adiposo**

A livello del tessuto adiposo riportiamo un aumento dell'espressione di PPAR-  $\alpha$  da parte della dieta con olio di oliva (ma interessanti è indotto solo dall'olio d'oliva di elevata qualità), senza alcuna correlazione con i livelli espressivi degli altri due marcatori. Questo è in buon accordo con un precedente studio in topo che riporta un lieve aumento espressivo di tutti i PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) a seguito di gavage con olio d'oliva, mentre in animali CD36  $-/-$  i livelli sono fortemente innalzati ma non sembrano influenzati dalla dieta (Drover and Amburad 2005). L'attivazione negli adipociti di PPAR-  $\alpha$  è presumibilmente un effetto positivo, poiché innalza l'espressione degli enzimi coinvolti nella beta ossidazione e nell'attività lipolitica con una diminuzione di trigliceridi nella massa grassa e nel fegato (Guzmán et al., 2004) e recentemente è stato riportato anche negli adipociti umani una selettiva upregulation della beta ossidazione e un minor utilizzo di glucosio (Ribet et al., 2010). Registriamo invece un decremento da parte della dieta con cocco, in accordo con recenti dati riportati in topo (Zhang et al., 2010) che sarebbe quindi da interpretare in chiave negativa.

Nel tessuto adiposo CD36 è un gene correlato alla lipogenesi ma anche alla lipolisi, essendo riportato una CD36 upregulation a seguito di somministrazione esogena di OEA con riduzione del peso corporeo (Yang 2006), e sembra inducibile anche da oli contenenti PUFA (Alexander Aguilera et al., 2006). Noi riportiamo che sia una supplementazione di oli saturi o monoinsaturi inducono un

decremento notevole dei livelli di CD36 e NAPE-PLD rispetto al controllo, suggerendo anche una possibile correlazione tra i due marcatori molecolari. Tali diminuzioni sono da interpretarsi negativamente, comunque l'effetto negativo sull'espressione di CD36 è minore nell'olio di oliva rispetto all'olio di cocco.

## **Conclusioni**

Nel duodeno e nel digiuno la somministrazione di diete iperlipidiche inducono la diminuzione di CD36 accompagnata da un calo di NAPE-PLD e PPAR-  $\alpha$ , geni coinvolti nella induzione della saziazione tramite i NAEs e principalmente l'OEA. In particolare nel duodeno risulta esservi una correlazione positiva fra i tre geni che suggerisce che CD36 funga come sensore degli LCFA e che moduli la produzione dei NAEs. Il calo più marcato è indotto dalla dieta high fat ricca in acidi grassi saturi, che induce anche una evidente alterazione della mucosa, che riducendo l'area villare, e il numero di enterociti in condizione di esprimere questa pathway di uptake e segnalazione, e potrebbe aver influito sulla misurazione dei trascritti. Comunque l'azione infiammatoria di acidi grassi saturi e a catena corta e media introdotti tramite l'alimentazione potrebbe avere un'influenza negativa sull'intero regime alimentare andando a ridurre la capacità dell'intestino di inviare un corretto segnale di saziazione. Il calo di espressione registrato diviene minore nel digiuno indicando una maggior sensibilità dell'intestino prossimale.

Suggeriamo inoltre che i dati contrastanti riportati in letteratura sui mutamenti dei livelli intestinali di OEA e CD36 in seguito a diete possano essere chiariti dalla differenza del metodo di somministrazione anche a parità di sostanza somministrata, e dall'esistenza di un possibile ciclo di espressione legato all'alimentazione.

Anche nel tessuto adiposo le diete iperlipidiche diminuiscono sia livelli di CD36 che NAPE-PLD, mentre l'olio d'oliva di qualità innalza il grado di espressione di PPAR-  $\alpha$ , un effetto che sembra positivo.

A livello del fegato non risultano relazioni fra le espressioni dei tre marcatori molecolari, comunque risulta molto evidente l'impatto negativo di una dieta ricca in acidi grassi saturi che indica una tendenza alla steatosi, mentre la dieta con olio e non sembra comportare effetti indesiderati.

## BIBLIOGRAFIA

Ablimit A, Matsuzaki T, Tajika Y, Aoki T, Hagiwara H, Takata K. Immunolocalization of water channel aquaporins in the nasal olfactory mucosa. 2006. *Arch Histol Cytol* 69:1-12.

Adler E., Hoon M.A., Mueller K.L., Chandrashekar J., Ryba N.J. and Zuker C.S., A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):693-702.

Adriaensen D, Brouns I, Pintelon I, De Proost I and Timmermans JP. Evidence for a role of neuroepithelial bodies as complex airway sensors: comparison with smooth muscle-associated airway receptors, *J. Appl. Physiol. Sep.* 101 (2006), pp. 960–970.

Aitman TJ. CD36, insulin resistance, and coronary heart disease. *Lancet*. 2001 Mar; 357(9257):651-2.

Alexander Aguilera A, Hernández Díaz G, Lara Barcelata M, Angulo Guerrero O, Oliart Ros RM. Induction of Cd36 expression elicited by fish oil PUFA in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 2006 Nov;17(11):760-5. Epub 2006 Feb 3.

Allan EM, The ultrastructure of the brush cell in bovine lung, *Res. Vet. Sci.* 25 (1978), pp. 314–317.

Alpers DH, Bass NM, Engle MJ, DeSchryver-Kecsckemeti K. Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jan 31;1483(3):352-62.

Astarita G, Di Giacomo B, Gaetani S, Oveisi F, Compton TR, Rivara S, Tarzia G, Mor M, Piomelli D. Pharmacological characterization of hydrolysis-resistant analogs of oleoylethanolamide with potent anorexiatic properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Aug;318(2):563-70. Epub 2006 May 15.

Awasthi G, Dash AP, Das A. Characterization & evolutionary analysis of human CD36 gene. *Indian J Med Res*. 2009 May;129(5):534-41.

Azzali G, Bucci G, Gatti R, Orlandini G, Ferrari G. Fine structure of the excretory system of the deep posterior (Ebner's) salivary glands of the human tongue. 1989 *Acta Anat* 136:257–268

Bachmanov AA, Li X, Reed DR, Ohmen JD, Li S, Chen Z, Tordoff MG, de Jong PJ, Wu C, West DB, Chatterjee A, Ross DA, Beauchamp GK. Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus. *Chem Senses*. 2001 Sep;26(7):925-33.

Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol*. 1996 Sep;153(1):75-81.

Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol*. 1996 Sep;153(1):75-81.

Baraniuk JN and Kim D, Nasonasal reflexes, the nasal cycle, and sneeze, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 7 (2007), pp. 105–111.

Basavarajappa BS. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*. 2007;14(3):237-46.

- Baum BJ, Neurotransmitter control of secretion, *J. Dent. Res.* 66 (1987), pp. 628–632.
- Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen T, Ramjeesingh M, Riordan JR. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell.* 1992 Feb 21;68(4):809-18.
- Behrens M, Brockhoff A, Kuhn C, Bufe B, Winnig M, Meyerhof W. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jun 25;319(2):479-85.
- Behrens M, Meyerhof W, Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors *Physiol Behav.* 2011 Feb 12. [Epub ahead of print]
- Belda-Iniesta C., de Castro Carpeño J, Carrasco JA, Moreno V, Casado Sáenz E, Feliu J, Sereno M, García Ríó F, Barriuso J and González Barón M, New screening method for lung cancer by detecting volatile organic compounds in breath, *Clin. Transl. Oncol.* 9 (2007), pp. 364–368.
- Bezençon C, Fürholz A, Raymond F, Mansourian R, Métairon S, Le Coutre J, Damak S. Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *J Comp Neurol.* 2008 Aug 10;509(5):514-25.
- Bezençon C, le Coutre J and Damak S, Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells, *Chem. Sens.* 32 (2007), pp. 41–49.
- Blundell J. E., Stubbs R. J., Golding C., Croden F., Alam R., Whybrow S., Le Noury J., Lawton C. L., Resistance and susceptibility to weight gain: individual variability in response to a high-fat diet. *2005 Physiol. Behav.* 86, 614–622.
- Bonen A, Dyck DJ, Ibrahimi A, Abumrad NA. Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am J Physiol.* 1999 Apr;276(4 Pt 1):E642-9.
- Bonnefoi M, Monticello TM and Morgan KT, Toxic and neoplastic responses in the nasal passages: future research needs, *Exp. Lung Res.* 17 (1991), pp. 853–868.
- Borrelli F, Izzo AA. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009 Feb;23(1):33-49.
- Boschi F, Nicolato E, Marzola P and Sbarbati A, Drug targeting of airway surface liquid: a pharmacological MRI approach, *Biomed. Pharmacother.* 62 (2008), pp. 410–419.
- Boughter J.D., Pumplin D.W., Yu C., Christy R.C. and Smith D.V., Differential expression of  $\alpha$ -gustducin in taste bud populations of the rat and hamster, *J. Neurosci.* 17 (1997), pp. 2852–2858.
- Boyd K. A., O'Donovan D. G., Doran S., Wishart J., Chapman I. M., Horowitz M., Feinle C. High-fat diet effects on gut motility, hormone, and appetite responses to duodenal lipid in healthy men. *2003 Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G188–G196.
- Bradley RM. Sensory receptors of the larynx. *Am J Med.* 2000 Mar 6;108 Suppl 4a:47S-50S. Review.

- Breza J.M., Nikonov A.A., Contreras R.J. 2010. Response latency to lingual taste stimulation distinguishes neuron types within the geniculate ganglion. *J. Neurophysiol.* 103:1771–1784.
- Brockhoff A, Behrens M, Massarotti A, Appendino G and Meyerhof W, Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007), pp. 6236–6243.
- Bufe B, Breslin PA, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, Slack JP, Kim UK, Drayna D, Meyerhof W. The Molecular Basis of Individual Differences in Phenylthiocarbamide and Propylthiouracil Bitterness Perception. *Curr Biol.* 2005 February 22; 15(4): 322-327.
- Bufe B, Hofmann T, Krautwurst D, Raguse JD, Meyerhof W. The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat Genet.* 2002 Nov;32(3):397-401. Epub 2002 Oct 15.
- Bünger M, van den Bosch HM, van der Meijde J, Kersten S, Hooiveld GJ, Müller M. Genome-wide analysis of PPARalpha activation in murine small intestine. *Physiol Genomics.* 2007 Jul 18;30(2):192-204. Epub 2007 Apr 10.
- Buts JP, Vijverman V, Barudi C, De Keyser N, Maldague P, Dive C. Refeeding after starvation in the rat: comparative effects of lipids, proteins and carbohydrates on jejunal and ileal mucosal adaptation. *Eur J Clin Invest.* 1990 Aug;20(4):441-52.
- Caicedo A, Kim KN, Roper SD. Individual mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. *J Physiol.* 2002 Oct 15;544(Pt 2):501-9.
- Calvo D, Dopazo J, Vega MA. The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics.* 1995 Jan 1;25(1):100-6.
- Canbay A, Bechmann L, Gerken G. Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol.* 2007 Jan;45(1):35-41.
- Capasso R, Izzo AA. Gastrointestinal regulation of food intake: general aspects and focus on anandamide and oleoylethanolamide. *J Neuroendocrinol.* 2008 May;20 Suppl 1:39-46. Review.
- Cartea ME and Velasco P. Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem. Rev* 2008; 7:213-229.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature.* 2006 Nov 16;444(7117):288-94. Review.
- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E and Ryba NJ et al., The cells and peripheral representation of sodium taste in mice, *Nature* 464 (2010), pp. 297–301
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell.* 2000 Mar 17;100(6):703-11.
- Chang LY, Mercer RR and Crapo JD, Differential distribution of brush cells in the rat lung, *Anat. Rec.* 216 (1986), pp. 49–54.

- Chang RB, Waters H, Liman ER. A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 21;107(51):22320-5. Epub 2010 Nov 23.
- Chaudhari N, Landin AM and Roper SD, A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor, *Nat Neurosci* 3 (2000), pp. 113–119.
- Chen M, Yang Y, Braunstein E, Georgeson KE, Harmon CM. Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E916–E923, 2001.
- Chen MC, Wu SV, Reeve JR Jr. and Rozengurt E, Bitter stimuli induce Ca<sup>2+</sup> signaling and CCK release in enteroendocrine STC-1 cells: role of L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291 (2006), pp. C726–739.
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1980;63:827-834.
- Cho MC, Lee K, Paik SG, Yoon DY. Peroxisome Proliferators-Activated Receptor (PPAR) Modulators and Metabolic Disorders. *PPAR Res.* 2008;2008:679137.
- Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J and Greenberg EP, Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004), pp. 3587–3590.
- Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RS. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2009 Mar;49(3):218-36.
- Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci.* 2010 Feb 2;11(2):458-79.
- Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2007 Aug 1;75(3):468-77. Epub 2007 Mar 14. Review.
- Connelly MA, Klein SM, Azhar S, Abumrad NA, Williams DL. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem.* 1999 Jan 1;274(1):41-7.
- Conte C, Guarin E, Marcuz A, Andres-Barquin PJ. Functional expression of mammalian bitter taste receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Biochimie*, Volume 88, Issue 7, July 2006, Pages 801-806.
- Covasa M., Grahn J., Ritter R. C. Reduced hindbrain and enteric neuronal response to intestinal oleate in rats maintained on high-fat diet. 2000 *Auton. Neurosci.* 84, 8–18.
- Covasa M., Marcuson J. K., Ritter R. C. Diminished satiation in rats exposed to elevated levels of endogenous or exogenous cholecystokinin. 2001 *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R331– R337.
- Covasa M., Ritter R. C. Adaptation to high-fat diet reduces inhibition of gastric emptying by CCK and intestinal oleate. 2000 *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R166– R170

Covasa M., Ritter R. C. Rats maintained on high-fat diets exhibit reduced satiety in response to CCK and bombesin. 1998 *Peptides* 19, 1407–1415.

Covasa M., Ritter R. C. Reduced sensitivity to the satiation effect of intestinal oleate in rats adapted to high-fat diet. 1999 *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277, R279– R285.

Cummings TA, Kinnamon SC. Apical K<sup>+</sup> channels in *Necturus* taste cells. Modulation by intracellular factors and taste stimuli. *J Gen Physiol.* 1992 Apr;99(4):591-613.

Dando R, Roper SD. Cell-to-cell communication in intact taste buds through ATP signalling from pannexin 1 gap junction hemichannels. *J Physiol.* 2009 Dec 15;587(Pt 24):5899-906.

Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the *In vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol.* 1997 Aug 11;138(3):707-17.

de Araujo IE, Oliveira-Maia AJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicolelis MA and Simon SA, Food reward in the absence of taste receptor signaling, *Neuron* 57 (2008), pp. 930–941.

de Vogel-van den Bosch HM, Bünger M, de Groot PJ, Bosch-Vermeulen H, Hooiveld GJ, Müller M. PPAR $\alpha$ -mediated effects of dietary lipids on intestinal barrier gene expression. *BMC Genomics.* 2008 May 19;9:231.

Deshpande DA, Wang WC, McIlmoyle EL, Robinett KS, Schillinger RM, An SS, Sham JS, Liggett SB. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med.* 2010.

Diep TA, Madsen AN, Holst B, Kristiansen MM, Wellner N, Hansen SH, Hansen HS. Dietary fat decreases intestinal levels of the anorectic lipids through a fat sensor. *FASEB J.* 2011 Feb;25(2):765-74. Epub 2010 Oct 19.

Donovan M. J., Paulino G., Raybould H. E., Activation of hindbrain neurons in response to gastrointestinal lipid is attenuated by high fat, high energy diets in mice prone to diet-induced obesity. 2009 *Brain Res.* 1248, 136–140.

Dotson CD, Roper SD, Spector AC. PLC $\beta$ 2-independent behavioral avoidance of prototypical bitter-tasting ligands. *Chem Senses.* 2005 Sep;30(7):593-600. Epub 2005 Aug 31.

Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, Tso P, Abumrad NA. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1290-7. Epub 2005 Apr 7.

Dunel-Erb S, Chevalier C, Laurent P, Bach A, Decrock F, Le Maho Y. Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001 Jul;129(4):933-47.

Dvoryanchikov G, Tomchik SM, Chaudhari N. Biogenic amine synthesis and uptake in rodent taste buds. *J Comp Neurol.* 2007 Nov 20;505(3):302-13.

- Dyer J, Daly K, Salmon KS, Arora DK, Kokrashvili Z, Margolskee RF, Shirazi-Beechey SP. Intestinal glucose sensing and regulation of intestinal glucose absorption. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1191-4.
- Eehalt R, Sparla R, Kulaksiz H, Herrmann T, Füllekrug J, Stremmel W. Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts). *BMC Cell Biol.* 2008 Aug 13;9:45.
- El-Yassimi A, Hichami A, Besnard P, Khan NA. Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem.* 2008 May 9;283(19):12949-59. Epub 2008 Mar 5.
- Estruch R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *Proc Nutr Soc.* 2010 Aug;69(3):333-40. Epub 2010 Jun 2.
- Fahey JW, Stephenson, KK, and Talalay P(1997). Glucosinolates, myrosinase, and isothiocyanates: Three reasons for eating Brassica vegetables. In *Functional Foods for Disease Prevention I: Fruits, Vegetables, and Teas.* 1997 Volume ACS Symposium Series 701, T Shibamoto, J Terao, and T Osawa, eds (Washington, DC: American Chemical Society), pp 16-22.
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, Silverstein RL. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem.* 1999 Jul 2;274(27):19055-62.
- Field RB, Spielman AI, Hand AR, Purification of lingual amylase from serous glands of rat tongue and characterization of rat lingual amylase and lingual lipase. 1989 *J Dent Res* 68:139–145
- Filippenko LN, Light and electron microscopic study of rat lung brush alveolocytes, *Biull. Eksp. Biol. Med.* 86 (1978), pp. 592–596.
- Finger TE, Bottger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi H and Silver WL, Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003), pp. 8981–8986.
- Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G and Kinnamon SC, ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves, *Science* 310 (2005), pp. 1495–1499.
- Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, Chen JW, Feinstein SI. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1999;274:21326-21334.
- Foliguet B and Grignon G, Type III pneumocyte. The alveolar brush-border cell in rat lung. Study by transmission electron microscopy, *Poumon. Coeur.* 36 (1980), pp. 149–153.
- Foster WM, Mucociliary transport and cough in humans, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 15 (2002), pp. 277–282.
- Frank ME, Lundy RF Jr, Contreras RJ. Cracking taste codes by tapping into sensory neuron impulse traffic. *Prog Neurobiol.* 2008 Nov;86(3):245-63. Epub 2008 Sep 7.

Frings S. The sour taste of a proton current. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 21;107(51):21955-6. Epub 2010 Dec 13.

Fu J, Astarita G, Gaetani S, Kim J, Cravatt BF, Mackie K, Piomelli D. Food intake regulates oleoylethanolamide formation and degradation in the proximal small intestine. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):1518-28. Epub 2006 Nov 22.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. Oleoylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature*. 2003 Sep 4;425(6953):90-3.

Fu J, Kim J, Oveisi F, Astarita G, Piomelli D. Targeted enhancement of oleoylethanolamide production in proximal small intestine induces across-meal satiety in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Jul;295(1):R45-50. Epub 2008 Apr 23.

Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR- $\alpha$  agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*. 2005 Jun;48(8):1147-53. Epub 2005 Apr 21.

Fujiyama Y, Hokari R, Miura S, Watanabe C, Komoto S, Oyama T, Kurihara C, Nagata H, Hibi T. Butter feeding enhances TNF- $\alpha$  production from macrophages and lymphocyte adherence in murine small intestinal microvessels. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Nov;22(11):1838-45.

Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, Sugimoto E, Fushiki T. Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett*. 1997 Sep 8;414(2):461-4.

Fuqua WC, Winans SC and Greenberg EP, Quorum sensing in bacteria: the LuxR–LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, *J. Bacteriol*. 176 (1994), pp. 269–275.

Gaetani S, Fu J, Cassano T, Dipasquale P, Romano A, Righetti L, Cianci S, Laconca L, Giannini E, Scaccianoce S, Mairesse J, Cuomo V, Piomelli D. The fat-induced satiety factor oleoylethanolamide suppresses feeding through central release of oxytocin. *J Neurosci*. 2010 Jun 16;30(24):8096-101.

Gaillard D, Laugurette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, Khan NA, Montmayeur JP, Besnard P. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J*. 2008 May;22(5):1458-68. Epub 2007 Dec 27.

Garrett JR, The proper role of nerves in salivary secretion: a review, *J. Dent. Res*. 66 (1987), pp. 387–397.

Gebhard A, Gebert A. Brush cells of the mouse intestine possess a specialized glycocalyx as revealed by quantitative lectin histochemistry. Further evidence for a sensory function. *J. Histochem. Cytochem*. 1999;47:799–808.

Gershon MD, The enteric nervous system: a second brain, *Hosp. Pract. (Minneap)* 34 (1999), pp. 31–42.

Gilbertson TA, Boughter JD Jr, Zhang H, Smith DV. Distribution of gustatory sensitivities in rat taste cells: whole-cell responses to apical chemical stimulation. *J Neurosci*. 2001 Jul 1;21(13):4931-41.

Glatzle J, Wang Y, Adelson DW, Kalogeris TJ, Zittel TT, Tso P, Wei JY, Raybould HE. Chylomicron components activate duodenal vagal afferents via a cholecystokinin A receptor-mediated pathway to inhibit gastric motor function in the rat. *J Physiol* 550: 657–664, 2003.

Glendinning JI, Yiin YM, Ackroff K, Sclafani A. Intra-gastric infusion of denatonium conditions flavor aversions and delays gastric emptying in rodents. *Physiol Behav*. 2008 Mar 18;93(4-5):757-65. Epub 2007 Nov 28.

Gniuli D, Calcagno A, Dalla Libera L, Calvani R, Leccesi L, Caristo ME, Vettor R, Castagneto M, Ghirlanda G, Mingrone G. High-fat feeding stimulates endocrine, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)-expressing cell hyperplasia in the duodenum of Wistar rats. *Diabetologia*. 2010 Oct;53(10):2233-40. Epub 2010 Jun 30.

Gniuli D, Dalla Libera L, Caristo ME, Calvani R, Castagneto M, Mingrone G. High saturated-fat diet induces apoptosis in rat enterocytes and blunts GIP and insulin-secretive response to oral glucose load. *Int J Obes (Lond)*. 2008 May;32(5):871-4. Epub 2008 Feb 19.

Goudriaan JR, Dahlmans VE, Febbraio M, Teusink B, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. Intestinal lipid absorption is not affected in CD36 deficient mice. *Mol Cell Biochem*. 2002 Oct;239(1-2):199-202.

Greenberg D, Smith GP, Gibbs J. Oleic acid inhibits sham feeding when duodenally infused while triolein does not. *Soc Neurosci Abstr* 14:1196, 1988

Greenberg D, Smith GP. The controls of fat intake. *Psychosom Med*. 1996 Nov-Dec;58(6):559-69. "Grubb BR, Rogers TD, Kulaga HM, Burns KA, Wonsetler RL, Reed RR, Ostrowski LE. Olfactory epithelia exhibit progressive functional and morphological defects in CF mice. 2007. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C574-83. "

Guijarro A, Fu J, Astarita G, Piomelli D. CD36 gene deletion decreases oleoylethanolamide levels in small intestine of free-feeding mice. *Pharmacol Res*. 2010 Jan;61(1):27-33. Epub 2009 Sep 22.

Guillén N, Navarro MA, Arnal C, Noone E, Arbonés-Mainar JM, Acín S, Surra JC, Muniesa P, Roche HM, Osada J. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. *Physiol Genomics*. 2009 May 13;37(3):187-98. Epub 2009 Mar 3.

Gulbransen BD, Clapp TR, Finger TE and Kinnamon SC, Nasal solitary chemoreceptor cell responses to bitter and trigeminal stimulants in vitro, *J. Neurophysiol*. 99 (2008), pp. 2929–2937. Gulbransen BD, Silver W, Finger TE. Solitary chemoreceptor cell survival is independent of intact trigeminal innervation. *J Comp Neurol*. 2008;508(1):62–71.

Guzmán M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):27849-54. Epub 2004 Apr 26.

Hameed S, Dhillon WS, Bloom SR. Gut hormones and appetite control. *Oral Dis*. 2009 Jan;15(1):18-26. Epub 2008 Oct 17. Review.

Hansen A, Olfactory and solitary chemosensory cells: two different chemosensory systems in the nasal cavity of the American alligator, *Alligator mississippiensis*, *BMC Neurosci.* 8 (2007), p. 64.

Hansen HS, Diep TA. N-acylethanolamines, anandamide and food intake. *Biochem Pharmacol.* 2009 Sep 15;78(6):553-60. Epub 2009 May 4.

Harmon CM, Luce P, Abumrad NA. Labelling of an 88 kDa adipocyte membrane protein by sulpho-N-succinimidyl long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *Biochem Soc Trans.* 1992 Nov;20(4):811-3.

Hass N, Schwarzenbacher K and Breer H, A cluster of gustducin-expressing cells in the mouse stomach associated with two distinct populations of enteroendocrine cells, *Histochem. Cell Biol.* 128 (2007), pp. 457–471.

Hayes JE, Bartoshuk LM, Kidd JR, Duffy VB. Supertasting and PROP bitterness depends on more than the TAS2R38 gene. *Chem Senses.* 2008 Mar;33(3):255-65. Epub 2008 Jan 21.

Hellekant G, Ninomiya Y, Danilova V. Taste in chimpanzees II: single chorda tympani fibers. *Physiol Behav.* 1997 Jun;61(6):829-41.

Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:646-678.

Herness MS, Sun XD. Characterization of chloride currents and their noradrenergic modulation in rat taste receptor cells. *J Neurophysiol* 1999;82:260-271.

Hettinger TP, Formaker BK, Frank ME. Cycloheximide: no ordinary bitter stimulus. *Behav Brain Res.* 2007 Jun 4;180(1):4-17. Epub 2007 Feb 23.

Hijiya K, Electron microscope study of the alveolar brush cell, *J. Electron. Microsc.* 27 (1978), pp. 223–227.

Hijiya K, Okada Y and Tankawa H, Ultrastructural study of the alveolar brush cell, *J. Electron. Microsc.* 26 (1977), pp. 321–329.

Hirano K, Kuwasako T, Nakagawa-Toyama Y, Janabi M, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency. *Trends Cardiovasc Med.* 2003 May;13(4):136-41. Review.

Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U, Beutler B. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature.* 2005 Feb 3;433(7025):523-7.

Höfer D, Asan E, Drenckhahn D. Chemosensory Perception in the Gut. *News Physiol Sci.* 1999 Feb;14:18-23.

Höfer D, Drenckhahn D. Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry.* 1992 Nov;98(4):237-42.

Hofer D, Drenckhahn D. Identification of the taste cell G-protein, alpha-gustducin, in brush cells of the rat pancreatic duct system. *Histochem. Cell Biol.* 1998;110:303–309.

Hofer D, Puschel B, Drenckhan D. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of  $\alpha$ -gustducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93:6631–6634.

Hofer D, Shin DW, Drenckhahn D. Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *J. Neurocytol.* 2000;29:147–156.

Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 2002;383:347-364.

Hoon M.A., Adler E., Lindemeier J., Battey J.F., Ryba N.J. and Zuker C.S., Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity, *Cell* 96 (1999), pp. 541–551.

Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJ, Zuker CS. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature.* 2006 Aug 24;442(7105):934-8.

Huang L, Cao J, Wang H, Vo LA, Brand JG. Identification and functional characterization of a voltage-gated chloride channel and its novel splice variant in taste bud cells. *J Biol Chem* 2005;280.

Huang L, Shanker YG, Dubauskaite J, Zheng JZ, Yan W, Rosenzweig S, Spielman AI, Max M, Margolskee RF. Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci.* 1999 Dec;2(12):1055-62.

Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Sep 1;88(17):7844-8.

Huang YA, Dando R, Roper SD. Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *J Neurosci.* 2009 Nov 4;29(44):13909-18.

Huang YA, Maruyama Y, Roper SD. Norepinephrine is coreleased with serotonin in mouse taste buds. *J Neurosci.* 2008 Dec 3;28(49):13088-93.

Huang YA, Maruyama Y, Stimac R, Roper SD. Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J Physiol.* 2008 Jun 15;586(Pt 12):2903-12. Epub 2008 Apr 17.

Huang YA, Roper SD. Intracellular Ca(2+) and TRPM5-mediated membrane depolarization produce ATP secretion from taste receptor cells. *J Physiol.* 2010 Jul 1;588(Pt 13):2343-50. Epub 2010 May 24.

Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 10;104(15):6436-41. Epub 2007 Mar 26.

Ide N, Sato E, Ohta K, Masuda T and Kitabatake N, Interactions of the sweet-tasting proteins thaumatin and lysozyme with the human sweet-taste receptor, *J Agric Food Chem* 57 (2009), pp. 5884–5890.

Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 15;103(33):12569-74. Epub 2006 Aug 4.

Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhaszova M, Bernier M, Mosinger B, Margolskee RF and Egan JM, Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007), pp. 15069–15074.

Jiang P, Ji Q, Liu Z, Snyder LA, Benard LM and Margolskee RF et al., The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins, *J Biol Chem* 279 (2004), pp. 45068–45075  
Jump DB. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol.* 2008 Jun;19(3):242-7.

Kamp F, Hamilton JA. How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006 Sep;75(3):149-59. Epub 2006 Jul 7.

Kampf JP, Cupp D, Kleinfeld AM. Different mechanisms of free fatty acid flip-flop and dissociation revealed by temperature and molecular species dependence of transport across lipid vesicles. Kampf JP, Cupp D, Kleinfeld AM.

Kaske S, Krasteva G, Konig P, Kummer W, Hofmann T, Gudermann T, Chubanov V. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci.* 2007.

Kasper M, Hofer D, Woodcock-Mitchell J., et al Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. *Histochemistry.* 1994;101:57–62.

Kataoka S, Yang R, Ishimaru Y, Matsunami H, Sévigny J, Kinnamon JC, Finger TE. The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem Senses.* 2008 Mar;33(3):243-54. Epub 2007 Dec 21.

Kawai T, Fushiki T. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Aug;285(2):R447-54. Epub 2003 Apr 17.

Kellenberger S and Schild L, Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure, *Physiol Rev* 82 (2002), pp. 735–767.

Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ and Leturque A, Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2, *Annu. Rev. Nutr.* 28 (2008), pp. 35–54.

Khan NA, Besnard P. Oro-sensory perception of dietary lipids: New insights into the fat taste transduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* Volume 1791, Issue 3, March 2009, Pages 149-155.

Kitagawa M., Kusakabe Y., Miura H., Ninomiya Y. and Hino A., Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste, *Biochem Biophys Res Commun* 283 (2001), pp. 236–242.

Koethe D, Schreiber D, Giuffrida A, Mauss C, Faulhaber J, Heydenreich B, Hellmich M, Graf R, Klosterkötter J, Piomelli D, Leweke FM. Sleep deprivation increases oleoylethanolamide in human cerebrospinal fluid. *J Neural Transm.* 2009 Mar;116(3):301-5. Epub 2009 Jan 10.

Kolter R, Surfacing views of biofilm biology, *Trends Microbiol.* 13 (2005), pp. 1–2.

Konstantinidou V, Covas MI, Muñoz-Aguayo D, Khymenets O, de la Torre R, Saez G, Del Carmen Tormos M, Toledo E, Marti A, Ruiz-Gutiérrez V, Ruiz Mendez MV, Fito M. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *FASEB J.* 2010 Feb 23.

Konstantinidou V, Khymenets O, Covas MI, de la Torre R, Muñoz-Aguayo D, Anglada R, Farré M, Fito M. Time course of changes in the expression of insulin sensitivity-related genes after an acute load of virgin olive oil. *OMICS.* 2009 Oct;13(5):431-8.

Koonen DP, Glatz JF, Bonen A, Luiken JJ. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Oct 1;1736(3):163-80.

Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, Vance DE, Dyck JR. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes.* 2007 Dec;56(12):2863-71. Epub 2007 Aug 29.

Kotrschal K. Solitary chemosensory cells: why do primary aquatic vertebrates need another taste system? *Trends Ecol. Evol.* 1996;11:110–113.

Kotrschal K. Solitary chemosensory cells-taste, common chemical sense or what? *Rev. Fish. Biol. Fish.* 1991;1:3–22.

Kugler P, Hofer D, Mayer B, Drenckhahn D. Nitric oxide synthase and NADP-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase are co-localized in brush cells of rat stomach and pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* 1994;42:1317–1321.

Kuhn C, Bufe B, Winnig M, Hofmann T, Frank O and Behrens M et al., Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K, *J Neurosci* 24 (2004), pp. 10260–10265.

Kusakabe, Y., Miura, H., Hashimoto, R., Sugiyama, C., Ninomiya, Y. and Hino, A. (2002) The neural differentiation gene Mash-1 has a distinct pattern of expression from the taste reception-related genes gustducin and T1R2 in the taste buds. *Chem. Senses*, 27, 445–451.

Larter CZ, Yeh MM, Van Rooyen DM, Teoh NC, Brooling J, Hou JY, Williams J, Clyne M, Nolan CJ, Farrell GC. Roles of adipose restriction and metabolic factors in progression of steatosis to steatohepatitis in obese, diabetic mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Oct;24(10):1658-68.

Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, Besnard P. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest.* 2005 Nov;115(11):3177-84.

Le Gall M, Tobin V, Stolarczyk E, Dalet V, A. Leturque and E. Brot-Laroche, Sugar sensing by enterocytes combines polarity, membrane bound detectors and sugar metabolism, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007), pp. 834–843.

Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):571-80.

Li X, Li W, Wang H, Cao J, Maehashi K and Huang L et al., Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar, *PLoS Genet* 1 (2005), pp. 27–35.

Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M and Adler E, Human receptors for sweet and umami taste, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002), pp. 4692–4696.

Ligresti A, Cascio MG, Di Marzo V. Endocannabinoid metabolic pathways and enzymes. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005 Dec;4(6):615-23.

Lin W, Burks CA, Hansen DR, Kinnamon SC, Gilbertson TA. Taste receptor cells express pH-sensitive leak K<sup>+</sup> channels. *J Neurophysiol.* 2004 Nov;92(5):2909-19. Epub 2004 Jul 7.

Lin W, Ezekwe EA Jr., Zhao Z, Liman ER and Restrepo D, TRPM5-expressing microvillous cells in the main olfactory epithelium, *BMC Neurosci.* 9 (2008), p. 114.

Lin W, Ogura T, Margolskee RF, Finger TE, Restrepo D. TRPM5-expressing solitary chemosensory cells respond to odorous irritants. *J Neurophysiol.* 2008;99(3):1451–1460.

Lindberg S, Dolata J and Mercke U, Stimulation of C fibers by ammonia vapor triggers a mucociliary defense reflex, *Am. Rev. Respir. Dis.* 135 (1987), pp. 1093–1098.

Lindemann B. Receptors and transduction in taste. *Nature.* 2001 Sep 13;413(6852):219-25. Review. Little T. J., Feltrin K. L., Horowitz M., Meyer J. H., Wishart J., Chapman I. M., Feinle-Bisset C. A high-fat diet raises fasting plasma CCK but does not affect upper gut motility, PYY, and ghrelin, or energy intake during CCK-8 infusion in lean men. 2008 *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R45–R51.

Little TJ, Feinle-Bisset C. Oral and gastrointestinal sensing of dietary fat and appetite regulation in humans: modification by diet and obesity. *Front Neurosci.* 2010 Oct 19;4:178.

Little TJ, Russo A, Meyer JH, Horowitz M, Smyth DR, Bellon M, Wishart JM, Jones KL, Feinle-Bisset C. Free fatty acids have more potent effects on gastric emptying, gut hormones, and appetite than triacylglycerides. *Gastroenterology.* 2007 Oct;133(4):1124-31. Epub 2007 Jul 3.

Liu D, Liman ER. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and the phospholipid PIP<sub>2</sub> regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 9;100(25):15160-5. Epub 2003 Dec 1.

LopezJimenez ND, Cavenagh MM, Sainz E, Cruz-Ithier MA, Battey JF, Sullivan SL. Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd113 and Pkd211, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *J Neurochem.* 2006 Jul;98(1):68-77.

LoVerme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci.* 2005 Aug 19;77(14):1685-98.

Luciano L, Castellucci M, Reale E. The brush cells of the common bile duct of the rat. This section, freeze-fracture and scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 1981;218:403–420.

Luciano L, Reale E and Ruska H, Brush cells in the alveolar epithelium of the rat lung, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 95 (1969), pp. 198–201.

Luciano L, Reale E, Ruska H. On a "chemoreceptive" sensory cell in the tachea of the rat, article in german, *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1968;85(3):350-75.

Luciano L, Reale E. A new cell type ('brush cell') in the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Submicrosc. Cytol.* 1969;1:43–52.

Luciano L, Reale E. Presence of brush cells in the mouse gallbladder. *Microsc. Res. Techn.* 1997;38:598–608.

Luciano L, Reale E. The 'limiting ridge' of the rat stomach. *Arch. Histol. Cytol.* 1992;55:131–138.

Lyll V, Alam RI, Malik SA, Phan TH, Vinnikova AK, Heck GL, DeSimone JA. Basolateral Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-1 in rat taste receptor cells is involved in neural adaptation to acidic stimuli. *J Physiol.* 2004 Apr 1;556(Pt 1):159-73. Epub 2004 Jan 14.

Lyll V, Alam RI, Phan DQ, Ereso GL, Phan TH, Malik SA, Montrose MH, Chu S, Heck GL, Feldman GM, DeSimone JA. Decrease in rat taste receptor cell intracellular pH is the proximate stimulus in sour taste transduction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Sep;281(3):C1005-13.

Mace OJ, Affleck J, Patel N and Kellett GL, Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2, *J. Physiol.* 582 (2007), pp. 379–392.

Mace OJ, Lister N, Morgan EL, West EJ, Affleck J, Helliwell PA, Bronk JR, Kellett GL, Meredith D, Boyd CA, Myrtani P, Bailey PD, Pettecrew R and Foley D, An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine, *J. Physiol.* 587 (2009), pp. 195–210.

Macht M, Mueller J. Increased negative emotional responses in PROP supertasters. *Physiol Behav.* 2007 Feb 28;90(2-3):466-72. Epub 2006 Dec 4.

Mansén A, Guardiola-Diaz H, Rafter J, Branting C, Gustafsson JA. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 May 24;222(3):844-51.

Marciani L, Faulks R, Wickham MS, Bush D, Pick B, Wright J, Cox EF, Fillery-Travis A, Gowland PA, Spiller RC. Effect of intragastric acid stability of fat emulsions on gastric emptying, plasma lipid profile and postprandial satiety. *Br J Nutr.* 2009 Mar;101(6):919-28. Epub 2008 Aug 5.

Marciani L, Wickham M, Singh G, Bush D, Pick B, Cox E, Fillery-Travis A, Faulks R, Marsden C, Gowland PA, Spiller RC. Enhancement of intragastric acid stability of a fat emulsion meal delays gastric emptying and increases cholecystokinin release and gallbladder contraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Jun;292(6):G1607-13. Epub 2007 Mar 1.

Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B and Shirazi-Beechey SP, T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007), pp. 15075–15080.

Matias I, Gonthier MP, Petrosino S, Docimo L, Capasso R, Hoareau L, Monteleone P, Roche R, Izzo AA, Di Marzo V. Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells. *Br J Pharmacol.* 2007 Nov;152(5):676-90. Epub 2007 Aug 20.

Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404:601–604

Matsuo R, Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11 (2000), pp. 216–229.

Max M, Shanker YG, Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, Weinstein H, Damak S, Margolskee RF (2001) *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nat Genet* 28:58–63

McCormack DN, Clyburn VL, Pittman DW. Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats. *Physiol Behav.* 2006 Mar 30;87(3):582-94. Epub 2006 Jan 30.

McLaughlin S.K, McKinnon P.J. And Margolskee R.F., *Gustducin* is a taste-cell-specific G protein close related to the transducins, *Nature* 357 (1992), pp. 563–569.

Means TK, Mylonakis E, Tampakakis E, Colvin RA, Seung E, Puckett L, Tai MF, Stewart CR, Pukkila-Worley R, Hickman SE, Moore KJ, Calderwood SB, Hacohen N, Luster AD, El Khoury J. Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors *SCARF1* and *CD36*. *J Exp Med.* 2009 Mar 16;206(3):637-53. Epub 2009 Feb 23.

Merigo F, Benati D, Di Chio M, Osculati F and Sbarbati A, Secretory cells of the airway express molecules of the chemoreceptive signaling cascade, *Cell Tissue Res.* 327 (2007), pp. 231–247.

Merigo F, Benati D, Galiè M, Crescimanno C, Osculati F and Sbarbati A, Immunohistochemical localization of cystic fibrosis transmembrane regulator and clara cell secretory protein in taste receptor cells of rat circumvallate papillae, *Chem. Sens.* 33 (2008), pp. 231–241.

Merigo F, Benati D, Tizzano M, Osculati F and Sbarbati A, Alpha-gustducin immunoreactivity in the airways, *Cell Tissue Res.* 319 (2005), pp. 211–219.

Merigo F, Mucignat-Caretta C, Zancanaro C. Timing of neuronal intermediate filament proteins expression in the mouse vomeronasal organ during pre- and postnatal development. An immunohistochemical study. 2005. *Chem Senses* 30:707-17.

Mese H, Matsuo R, Salivary secretion, taste and hyposalivation. 2007 *J Oral Rehabil* 34:711–723.

Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E and Bufe B et al., The molecular receptive ranges of human *TAS2R* bitter taste receptors, *Chem Senses* 35 (2010), pp. 157–170.

Meyrick B and Reid L, The alveolar brush cell in rat lung—a third pneumonocyte, *J. Ultrastruct. Res.* 23 (1968), pp. 71–80.

Meyrick B, Reid L. The alveolar brush cell in rat lung--a third pneumonocyte. *J Ultrastruct Res.* 1968 Apr;23(1):71-80.

Miyamoto T, Miyazaki T, Fujiyama R, Okada Y, Sato T. Differential transduction mechanisms underlying NaCl- and KCl-induced responses in mouse taste cells. *Chem Senses* 2001;26:67-77.

Montmayeur JP, Liberles SD, Matsunami H, Buck LB (2001) A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat Neurosci* 4:492–498.

Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*. 1998 Jul 3;273(27):16710-4.

Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJ. The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):225-9.

Murillo-Rodriguez E, Désarnaud F, Prospéro-García O. Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci*. 2006 May 30;79(1):30-7. Epub 2006 Jan 23.

Nakajima K, Morita Y, Koizumi A, Asakura T, Terada T, Ito K, Shimizu-Ibuka A, Maruyama J, Kitamoto K, Misaka T, Abe K. Acid-induced sweetness of neoculin is ascribed to its pH-dependent agonistic-antagonistic interaction with human sweet taste receptor. *FASEB J*. 2008 Jul;22(7):2323-30. Epub 2008 Feb 8.

Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* 282: 19493–19501, 2007.

Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee D, Jandacek RJ, Abumrad NA, Tso P. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology*. 2006 Oct;131(4):1197-207. Epub 2006 Aug 16.

Neary MT, Batterham RL. Gut hormones: implications for the treatment of obesity. *Pharmacol Ther*. 2009 Oct;124(1):44-56. Epub 2009 Jun 26. Review.

Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS. An amino-acid taste receptor. *Nature*. 2002 Mar 14;416(6877):199-202. Epub 2002 Feb 24.

Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. Mammalian sweet taste receptors. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):381-90.

Nelson T, LopezJimenez ND, Tessarollo L, Inoue M, Bachmanov A, Sullivan SL. Taste function in mice with a targeted mutation of the Pkd113 gene. *Chem Senses*. 2010 Sep;35(7):565-77. Epub 2010 Jul 6.

Nguyen DV, Drover VA, Knopfel M, Dhanasekaran P, Hauser H, Phillips MC. Influence of class B scavenger receptors on cholesterol flux across the brush border membrane and intestinal absorption. *J Lipid Res*. 2009 Nov;50(11):2235-44. Epub 2009 May 19.

Nicholas B, Skipp P, Mould R, et al. Shotgun proteomic analysis of human-induced sputum. 2006 *Proteomics* 6, 4390–4401.

Nielsen MJ, Petersen G, Astrup A, Hansen HS. Food intake is inhibited by oral oleoylethanolamide. *J Lipid Res*. 2004 Jun;45(6):1027-9. Epub 2004 Apr 1.

Niot I, Poirier H, Tran TT, Besnard P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res*. 2009 Mar;48(2):101-15.

Nishijima K and Atoji Y, Taste buds and nerve fibers in the rat larynx: an ultrastructural and immunohistochemical study, *Arch. Histol. Cytol.* 67 (2004), pp. 195–209.

Novoselov SV, Peshenko IV, Popov VL, Novoselov VI, Bystrova MF, Evdokimov VJ, Kamzalov SS, Merkulova MI, Shuvaeva TM, Lipkin VM, et al. Localization of 28-kDa peroxiredoxin in rat epithelial tissue and its antioxidant properties. *Cell Tissue Res* 1999;298:471-480.

Ohmoto M, Matsumoto I, Yasuoka A, Yoshihara Y, Abe K. Genetic tracing of the gustatory and trigeminal neural pathways originating from T1R3-expressing taste receptor cells and solitary chemoreceptor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2008;38(4):505–517.

Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem.* 2004 Feb 13;279(7):5298-305. Epub 2003 Nov 21.

Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell.* 1989 Jul 14;58(1):95-101.

Pérez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, Max M, Margolskee RF. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci.* 2002 Nov;5(11):1169-76.

Petit V, Arnould L, Martin P, Monnot MC, Pineau T, Besnard P, Niot I. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J Lipid Res.* 2007 Feb;48(2):278-87. Epub 2006 Nov 18.

Poirier H, Degrace P, Niot I, Bernard A, Besnard P. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem.* 1996 Jun 1;238(2):368-73.

Pravenec M, Churchill PC, Churchill MC, Viklicky O, Kazdova L, Aitman TJ, Petretto E, Hubner N, Wallace CA, Zimdahl H, Zidek V, Landa V, Dunbar J, Bidani A, Griffin K, Qi N, Maxova M, Kren V, Mlejnek P, Wang J, Kurtz TW. Identification of renal Cd36 as a determinant of blood pressure and risk for hypertension. *Nat Genet.* 2008 Aug;40(8):952-4. Epub 2008 Jun 29.

Rač ME, Safranow K, Poncyljusz W. Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med.* 2007 May-Jun;13(5-6):288-96.

Rakhshandehroo M, Hooiveld G, Müller M, Kersten S. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human. *PLoS One.* 2009 Aug 27;4(8):e6796.

Ramirez I. Chemoreception for an insoluble nonvolatile substance: starch taste? *Am J Physiol.* 1991 Jan;260(1 Pt 2):R192-9.

Reynolds SD, Reynolds PR, Snyder JC, Whyte F, Paavola KJ and Stripp BR, CCSP regulates cross talk between secretory cells and both ciliated cells and macrophages of the conducting airway, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293 (2007), pp. L114–123.

Rhodin J and Dalhamn T. Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1956;44(4):345-412.

- Rhodin J. Ultrastructure of the tracheal ciliated mucosa in rat and man. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1959;68:964–974.
- Rhodin JA. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am. Rev. Respir Dis.* 1966;93(Suppl.):1-15.
- Ribet C, Montastier E, Valle C, Bezaire V, Mazzucotelli A, Mairal A and Viguerie N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-a control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. *Endocrinology* 2010, 151: 123–133.
- Richter TA, Dvoryanchikov GA, Chaudhari N, Roper SD. Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds. *J Neurophysiol.* 2004 Sep;92(3):1928-36. Epub 2004 May 12.
- Riva A, Loffredo F, Puxeddu R, Testa Riva F. A scanning and transmission electron microscope study of the human minor salivary glands. 1999 *Arch Oral Biol* 44:S27–S31.
- Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* 2001 Nov 8;414(6860):209-12.
- Romanov RA, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Jiang P, Margolskee RF, Kolesnikov SS. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* 2007 Feb 7;26(3):657-67. Epub 2007 Jan 18.
- Roper SD. Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Arch.* 2007 Aug;454(5):759-76. Epub 2007 Apr 28.
- Rosen ED. Energy balance: a new role for PPARalpha. *Curr Biol.* 2003 Dec 16;13(24):R961-3.
- Roy CC, Roulet M, Lefebvre D, Chartrand L, Lepage G, Fournier LA. The role of gastric lipolysis on fat absorption and bile acid metabolism in the rat. *Lipids.* 1979 Sep;14(9):811-5.
- Rozengurt E and Sternini C. Taste receptor signaling in the mammalian gut, *Curr. Opin. Pharmacol.* 7 (2007), pp. 557–562.
- Rozengurt E, Taste receptors in the gastrointestinal tract. I. Bitter taste receptors and alpha-gustducin in the mammalian gut, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291 (2006), pp. G171–177.
- Rozengurt N, Wu SV, Chen MC, Huang C, Sternini C, Rozengurt E. Colocalization of the alpha-subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Nov;291(5):G792-802. Epub 2006 May 25.
- Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care.* 2002 Jul;47(7):761-8.
- Ruiz-Avila L, McLaughlin SK, Wildman D, McKinnon PJ, Robichon A, Spickofsky N, Margolskee RF. Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells. *Nature.* 1995 Jul 6;376(6535):80-5.

Rumchev K, Brown H and Spickett J, Volatile organic compounds: do they present a risk to our health?, *Rev. Environ. Health* 22 (2007), pp. 39–55.

Sainz E, Korley JN, Battey JF and Sullivan SL, Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors, *J Neurochem* 77 (2001), pp. 896–903.

Salmon KS, Arora DK, Kokrashvili Z, Margolskee RF and Shirazi-Beechey SP, Intestinal glucose sensing and regulation of intestinal glucose absorption, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007), pp. 1191–1194.

Sato A, Miyoshi S. Tuft cells in the main excretory duct epithelia of the three major rat salivary glands. *Eur. J. Morphol.* 1996;34:225–228.

Sato O, Kuriki C, Fukui Y, Motojima K. Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J Biol Chem.* 2002 May 3;277(18):15703-11. Epub 2002 Feb 26.

Sbarbati A and Osculati F, Allelochemical communication in vertebrates: kairomones, allomones and synomones, *Cells Tissues Organs* 183 (2006), pp. 206–219.

Sbarbati A and Osculati F, Solitary chemosensory cells in mammals?, *Cells Tissues Organs* 175 (2003), pp. 51–55.

Sbarbati A and Osculati F, The taste cell-related diffuse chemosensory system, *Prog. Neurobiol.* 75 (2005), pp. 295–307.

Sbarbati A, Bramanti P, Benati D, Merigo F. The diffuse chemosensory system: exploring the iceberg toward the definition of functional roles. *Prog Neurobiol.* 2010 May;91(1):77-89. Epub 2010 Feb 4. Review.

Sbarbati A, Crescimanno C and Osculati F, The anatomy and functional role of the circumvallate papilla/von Ebner gland complex, *Med. Hypotheses* 53 (1999), pp. 40–44 a.

Sbarbati A, Crescimanno C, Benati D, Osculati F. Solitary chemosensory cells in the developing chemoreceptorial epithelium of the vallate papilla. *J. Neurocytol.* 1998;27:631–635.

Sbarbati A, Crescimanno C, Bernardi P, Benati D, Merigo F and Osculati F, Postnatal development of the intrinsic nervous system in the circumvallate papilla–von Ebner gland complex, *Histochem. J.* 32 (2000), pp. 483–488.

Sbarbati A, Crescimanno C, Bernardi P, Osculati F. alfa-gustducin-immunoreactive solitary chemosensory cells in the developing chemoreceptorial epithelium of the rat vallate papilla. *Chem. Senses.* 1999;24:469–472.

Sbarbati A, Crescimanno C, De Rossi V, Bernardi P and Osculati F, NADPH-diaphorase and NOS-1 positive ganglion cells are found in the rat vallate papilla/von Ebner gland complex, *Histochem. J.* 31 (1999), pp. 417–424 b.

Sbarbati A, Merigo F, Benati D, Tizzano M, Bernardi P, Crescimanno C and Osculati F, Identification and characterization of a specific sensory epithelium in the rat larynx, *J. Comp. Neurol.* 475 (2004), pp. 188–201.

Sbarbati A, Merigo F, Benati D, Tizzano M, Bernardi P, Osculati F. Laryngeal chemosensory clusters. *Chem Senses.* 2004 Oct;29(8):683-92.

Sbarbati A, Merigo F, Bernardi P, Crescimanno C, Benati D and Osculati F, Ganglion cells and topographically related nerves in the vallate papilla–von Ebner gland complex, *J. Histochem. Cytochem.* 50 (2002), pp. 709–718.

Sbarbati A, Tizzano M, Merigo F, Benati D, Nicolato E, Boschi F, Cecchini MP, Scambi I and Osculati F, Acyl homoserine lactones induce early response in the airway, *Anat. Rec.* 292 (2009), pp. 439–448.

Sbarbati A., Osculati F. A new fate for old cells: brush cells and related elements *J Anat.* 2005 April; 206(4): 349–358.

Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, Cuomo V, Piomelli D. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab.* 2008 Oct;8(4):281-8.

Sclafani A, Ackroff K, Abumrad NA. CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Nov;293(5):R1823-32. Epub 2007 Sep 5.

Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN and Welsh MJ, Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory, *Science* 325 (2009), pp. 1131–1134.

Shirazi-Beechey SP, Moran AW, Bravo D, Al-Rammahi M. Intestinal glucose sensing and regulation of glucose absorption: implications for swine nutrition. *J Anim Sci.* 2011 Jan 28. [Epub ahead of print]

Silverstein RL, Baird M, Lo SK, Yesner LM. Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor. *J Biol Chem.* 1992 Aug 15;267(23):16607-12.

Simon SA, de Araujo IE, Gutierrez R, Nicolelis MA. The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Nov;7(11):890-901.

Singh G, Katyal SL, Gottron SA. Antigenic, molecular and functional heterogeneity of Clara cell secretory proteins in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1985;829:156-163.

Smith J, Su X, El-Maghrabi R, Stahl PD, Abumrad NA. Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J Biol Chem.* 2008 May 16;283(20):13578-85. Epub 2008 Mar 18.

Soranzo N, Bufe B, Sabeti PC, Wilson JF, Weale ME, Marguerie R, Meyerhof W, Goldstein DB. Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16. *Curr Biol.* 2005 Jul 26;15(14):1257-65.

Stearns AT, Balakrishnan A, Rhoads DB, Tavakkolizadeh A. Rapid upregulation of sodium-glucose transporter SGLT1 in response to intestinal sweet taste stimulation. *Ann Surg.* 2010 May;251(5):865-71.

Sternini C, Taste receptors in the gastrointestinal tract. IV. Functional implications of bitter taste receptors in gastrointestinal chemosensing. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292 (2007), pp. G457–461.

Stevens DR, Seifert R, Bufe B, Müller F, Kremmer E, Gauss R, Meyerhof W, Kaupp UB, Lindemann B. Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature.* 2001 Oct 11;413(6856):631-5.

Stone LM, Barrows J, Finger TE, Kinnamon SC. Expression of T1Rs and gustducin in palatal taste buds of mice. *Chem Senses.* 2007 Mar;32(3):255-62. Epub 2007 Jan 17.

Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD. Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest.* 1985 Mar;75(3):1068-76.

Sukhotnik I, Hayari L, Bashenko Y, Chemodanov E, Mogilner J, Shamir R, Bar Yosef F, Shaoul R, Coran AG. Dietary palmitic acid modulates intestinal re-growth after massive small bowel resection in a rat. *Pediatr Surg Int.* 2008 Dec;24(12):1313-21.

Sukhotnik I, Mor-Vaknin N, Drongowski RA, Miselevich I, Coran AG, Harmon CM. Effect of dietary fat on early morphological intestinal adaptation in a rat with short bowel syndrome. *Pediatr Surg Int.* 2004 Jun;20(6):419-24. Epub 2004 Apr 24.

Sukhotnik I, Shany A, Bashenko Y, Hayari L, Chemodanov E, Mogilner J, Coran AG, Shaoul R. Parenteral but not enteral omega-3 fatty acids (Omegaven) modulate intestinal regrowth after massive small bowel resection in rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2010 Sep-Oct;34(5):503-12.

Sukhotnik I, Shiloni E, Krausz MM, Yakirevich E, Sabo E, Mogilner J, Coran AG, Harmon CM. J *Pediatr Surg.* 2003 Aug;38(8):1182-7. Low-fat diet impairs postresection intestinal adaptation in a rat model of short bowel syndrome. *J Pediatr Surg.* 2003 Aug;38(8):1182-7.

Sutherland K, Young RL, Cooper NJ, Horowitz M, Blackshaw LA. Phenotypic characterization of taste cells of the mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 May;292(5):G1420-8. Epub 2007 Feb 8.

Takami S., Getchell T. V., McLaughlin S.K., Margolskee R. F., and Getchell M. L, Human taste cells express the G protein  $\alpha$ -gustducin and neuron-specific enolase, *Mol. Brain Res.* 22 (1994), pp. 193–203

Tizzano M, Cristofolletti M, Sbarbati A, Finger TE. Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med.* 2011 Jan 13;11:3.

Tizzano M, Dvoryanchikov G, Barrows JK, Kim S, Chaudhari N, Finger TE. Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neurosci.* 2008 Nov 13;9:110.

Tizzano M, Gulbransen BD, Vandenbeuch A, Clapp TR, Herman JP, Sibhatu HM, Churchill ME, Silver WL, Kinnamon SC, Finger TE. Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(7):3210–3215.

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 (2006), pp. 333–337.

Tobach E, Bellin JS, Das DK. Differences in bitter taste perception in three strains of rats. *Behav Genet.* 1974 Dec;4(4):405-10.

Tomchik SM, Berg S, Kim JW, Chaudhari N, Roper SD. Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *J Neurosci.* 2007 Oct 3;27(40):10840-8.

Toyono T, Seta Y, Kataoka S and Toyoshima K, CCAAT/Enhancer-binding protein beta regulates expression of human T1R3 taste receptor gene in the bile duct carcinoma cell line, HuCCT1, *Biochim. Biophys. Acta* 1769 (2007), pp. 641–648.

Toyono T, Seta Y, Kataoka S., Kawano S., Shigemoto R and Toyoshima K, Expression of metabotropic glutamate receptor group I in rat gustatory papillae, *Cell Tissue Res* 313 (2003), pp. 29–35.

Tracy AL, Phillips RJ, Chi MM, Powley TL and Davidson TL, The gastrointestinal tract “tastes” nutrients: evidence from the intestinal taste aversion paradigm, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287 (2004), pp. R1086–R1100.

Travers SP, and Nicklas K. Taste bud distribution in the rat pharynx and larynx. *Anat Rec.* 1990 Jul;227(3):373-9.

Tremblay G, Charest J, Modified starch film method for the histochemical localization of amylase activity. 1968 *J Histochem Cytochem* 16:147–148

Tsuzuki Y, Miura S, Kurose I, Suematsu M, Higuchi H, Shigematsu T, Kimura H, Serizawa H, Hokari R, Akiba Y, Yagita H, Okumura K, Tso P, Granger DN, Ishii H. Enhanced lymphocyte interaction in postcapillary venules of Peyer's patches during fat absorption in rats. *Gastroenterology.* 1997 Mar;112(3):813-25.

Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. N-acylethanolamine metabolism with special reference to N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Prog Lipid Res.* 2010 Oct;49(4):299-315. Epub 2010 Feb 10.

Ugawa S, Minami Y, Guo W, Saishin Y, Takatsuji K, Yamamoto T, Tohyama M, Shimada S. Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature.* 1998 Oct 8;395(6702):555-6.

Vandenbeuch A, Clapp TR, Kinnamon SC. Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci.* 2008 Jan 2;9:1.

Wada R, Watanabe T, Nakagawa K, et al. Structure of lamina propria lymphoid follicles and associated epithelium in the gastric mucosa during *Helicobacter pylori* infection in ulcer-bearing Mongolian gerbils. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2000;32:159–167.

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*. 1997 Mar 13;386(6621):173-7.

Wang J, Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2009 Sep;89(3-4):112-9. Epub 2008 Dec 14.

Whitear M. Solitary chemoreceptor cells. In: Hara TJ, editor. *Chemoreception in Fishes*. New York: Chapman & Hall; 1992. pp. 103–125.

Winnig M, Bufe B and Meyerhof W, Valine 738 and lysine 735 in the fifth transmembrane domain of rTas1r3 mediate insensitivity towards lactisole of the rat sweet taste receptor. *BMC Neurosci* 6 (2005), p. 22.

Winnig M, Bufe B, Kratochwil NA, Slack JP and Meyerhof W. The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor, *BMC Struct Biol* 7 (2007), p. 66

Woltman T, Reidelberger R. Effects of duodenal and distal ileal infusions of glucose and oleic acid on meal patterns in rats. *Am J Physiol*. 1995 Jul;269(1 Pt 2):R7-14.

Woods SC. The eating paradox: how we tolerate food. *Psychol Rev*. 1991 Oct;98(4):488-505.

Wu SV, Chen MC, Rozengurt E. Genomic organization, expression, and function of bitter taste receptors (T2R) in mouse and rat. *Physiol Genomics*. 2005 Jul 14;22(2):139-49. Epub 2005 May 10.

Wu SV, Rozengurt N, Yang M, Young SH, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 19;99(4):2392-7.

Xu H, Staszewski L, Tang H, Adler E, Zoller M and Li X, Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors, *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004), pp. 14258–14263.

Yang Y, Chen M, Georgeson KE, Harmon CM. Mechanism of oleoylethanolamide on fatty acid uptake in small intestine after food intake and body weight reduction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Jan;292(1):R235-41. Epub 2006 Aug 10.

Yoshida H, Miura S, Kishikawa H, Hirokawa M, Nakamizo H, Nakatsumi RC, Suzuki H, Saito H, Ishii H. Fatty acids enhance GRO/CINC-1 and interleukin-6 production in rat intestinal epithelial cells. *J Nutr*. 2001 Nov;131(11):2943-50.

Yoshida R, Miyauchi A, Yasuo T, Jyotaki M, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, Yanagawa Y, Obata K, Ueno H, Margolskee RF, Ninomiya Y. Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells. *J Physiol*. 2009 Sep 15;587(Pt 18):4425-39. Epub 2009 Jul 21.

Zancanaro C, Caretta CM, Merigo F, Cavaggioni A, Osculati F. alpha-Gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse. *Eur J Neurosci*. 1999 Dec;11(12):4473-5.

Zancanaro C, Merigo F, Mucignat-Caretta C, Cavaggioni A. Neuronal nitric oxide synthase expression in the mouse vomeronasal organ during prenatal development. . 2002. *Eur J Neurosci* 16:659-64.

Zancanaro C, Mucignat-Caretta C, Merigo F, Osculati F. Neuropeptide expression in the mouse vomeronasal organ during postnatal development. 1999. *Neuroreport* 10:2023-7.

Zeng Y, Tao N, Chung KN, Heuser JE, Lublin DM. Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):45931-6. Epub 2003 Aug 28.

Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*. 2003 Feb 7;112(3):293-301.

Zhang Z, Li Q, Liu F, Sun Y, Zhang J. Prevention of diet-induced obesity by safflower oil: insights at the levels of PPARalpha, orexin, and ghrelin gene expression of adipocytes in mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010 Mar 15;42(3):202-8.

Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I and Ryba NJ et al., The receptors for mammalian sweet and umami taste, *Cell* 115 (2003), pp. 255–266.

Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, Lee JH, Khadem S, Ren S, Li S, Silverstein RL, Xie W. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):556-67. Epub 2007 Nov 28.

Zukerman S, Glendinning JI, Margolskee RF, Sclafani A. T1R3 taste receptor is critical for sucrose but not Polycose taste. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Apr;296(4):R866-76. Epub 2008 Dec 17.

## ***Abbreviazioni***

5-HT, serotonin;

AEA: Arachidonoyl Ethanolamide

AP: Alkaline phosphatase;

BBM, brush border membrane;

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

CC10, Clara cell secretory protein 10 kDa;

CC26, Clara cell secretory protein 26 kDa;

CCK, colecistokinin;

CCSP, Clara cell secretory protein;

CFTR, cystic fibrosis trans-membrane regulator;

CGRP: Calcitonin gene related peptide;

DCS, diffuse chemosensory system;

FA: Fatty Acids

FABPpm, plasma membrane-associated fatty acid-binding protein;

FAT, fatty acid transporter;

FATP4, fatty transport protein 4;

FFA, free fatty acids;

GFP, green fluorescent protein;

GFP: green fluorescent protein;

GI, gastrointestinal;

GLP-1, glucagon-like peptide-1;

GLUT2, glucose/hexose transporter isoform 2;

GLUT5, glucose/hexose transporter isoform 5;

GPCRs: G protein coupled receptors;

HEK: Human Embryonic Kidney

ISH: in situ hybridization;

LCFA: long-chain fatty acids;

LEA: linoleoylethanolamide;

LSCM: confocal laser scanning microscope;

MCFA: medium-chain fatty acids;

MRI: Magnetic Resonance Imaging

MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy

NAEs: N-acylethanolamines;

NAPE-PLD: N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D

NBT: nitro blue tetrazolium;

NMR: Nuclear Magnetic Resonance;

NO, nitric oxide;

OCT: Tissue-Tek embedding medium;

OEA: oleoylethanolamide;

PB: phosphate buffer;

PBS: phosphate-buffered saline;

PCR: Polymerase Chain Reaction

PEA: palmitoiletanolamide;

PFA: Paraformaldehyde;

PGP9.5: Protein gene product 9.5 of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase;

PLC, phospholipase C;

Plc $\beta$ 2: phospholipase C beta2;

PPAR-  $\alpha$  : peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$ ;

RT: room temperature;

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction;

SCCs: solitary chemosensory cells;

SGLT1, sodium-dependent transporter isoform 1;

SSC: saline-sodium citrate;

SubP: Substance P peptide;

T1R, taste receptor (type 1);

T2R, taste receptor (type 2);

Tas1R: taste receptor family 1;

Tas2R: taste receptor family 2;

TNF-  $\alpha$ : tumor necrosis factor;

TRCs, taste receptor cells;

TrpM5: transient receptor potential channel M5

## ***Ringraziamenti***

Desidero ringraziare innanzitutto il professor Andrea Sbarbati per i preziosi insegnamenti e per la fiducia dimostratami.

Un ringraziamento alle persone con cui ho collaborato e che hanno contribuito a questo studio: la dott.sa Donatella Benati, la dott.sa Giamaica Conti, la dott.sa Flavia Merigo, il dott. Degli Innocenti, il dott. Vanni Rizzati e il dott. Marco Tizzano.

Sono inoltre grato a Paolo Bernardi, Serena Becchi e Valeria Colavito per la disponibilità e i suggerimenti datimi.

-Tecniche di biologia molecolare nello studio dei sistemi chemosensoriali -