



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata**

**RUOLO DEL CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR
NELLA REGOLAZIONE DEL METABOLISMO
LIPIDICO E GLUCIDICO SU ADIPOCITI UMANI IN
COLTURA**

**ROLE OF CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR IN
THE REGULATION OF LIPID AND GLUCOSE
METABOLISM ON CULTURED HUMAN ADIPOCYTES**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Giovanni Lai

Relatore:
Chiar.mo Prof. Antonio Giordano

Correlatore:
Dr.ssa Jessica Perugini

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. Introduzione | 3 |
| 1.1. Il Fattore Neurotrofico Ciliare (CNTF) | 3 |
| 1.2. Effetti del CNTF sul bilancio energetico | 9 |
| 1.2.1. Effetti Centrali | 9 |
| 1.2.2. Effetti Periferici | 17 |
| 1.2.3. Effetti del CNTF sul Tessuto Adiposo | 20 |
| 1.2.4. Le hMADS come modello di cellula adiposa umana per studi in vitro sul metabolismo del tessuto adiposo | 24 |
| 1.2.5. Espressione di CNTFR α e di pSTAT3 nelle hMADS | 27 |
| 2. Scopo della Tesi | 30 |
| 2.1. Obiettivi dello studio | 30 |
| 3. Materiali e Metodi | 33 |
| 3.1. Colture cellulari e Trattamenti | 33 |
| 3.2. Western Blotting | 35 |
| 3.3. qRT-PCR | 36 |
| 3.4. Quantizzazione dei lipidi intracitoplasmatici mediante colorazione Oil Red O | 38 |
| 3.5. Saggio di Lipolisi | 39 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.6. | Saggio di uptake di glucosio | 40 |
| 3.7. | Analisi Statistica | 40 |
| 4. | Risultati | 41 |
| 4.1. | Effetti del CNTF sul metabolismo lipidico delle hMADS | 41 |
| 4.2. | Effetti del CNTF sul metabolismo glucidico | 45 |
| 5. | Discussione e Prospettive Future | 50 |
| 5.1. | Discussione | 50 |
| 6. | Bibliografia | 55 |

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1. *Il Fattore Neurotrofico Ciliare (CNTF)*

Il Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) è un ormone peptidico di 200 amminoacidi, per un peso molecolare di circa 22 kDa (**Figura 1**).

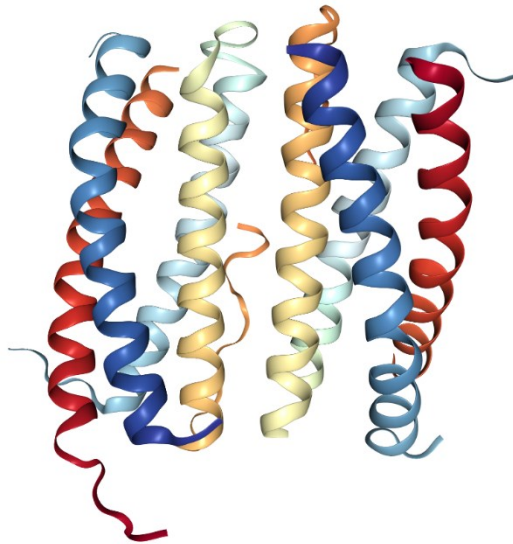


Figura 1 | Rappresentazione “a nastri” della struttura tridimensionale di un dimero di CNTF, ottenuta mediante cristallografia a raggi X. Ogni monomero di CNTF è formato da 4 α-eliche con topologia up-up-down-down.

Il CNTF venne scoperto durante studi in vitro sui neuroni del ganglio ciliare di pollo. Mostrò fin da subito un’azione neurotrofica altamente specifica,

grazie alla sua capacità di promuovere la sopravvivenza in vitro dei neuroni del ganglio ciliare di pollo (Adler et al., 1979). Il CNTF stimola il differenziamento e la sopravvivenza delle cellule del sistema nervoso, sia centrale che periferico. Gli effetti più importanti vengono esercitati soprattutto durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico, mentre subito dopo la nascita risulta essere fondamentale per la sopravvivenza ed il mantenimento dei neuroni sensitivi, dei motoneuroni e dei neuroni del sistema nervoso simpatico (Sendtner et al., 1994). La sintesi del CNTF comincia nel sistema nervoso dopo la nascita, mentre durante l'embriogenesi non è facilmente rilevabile. È stato dimostrato che topi *knockout* per il CNTF riescono a svilupparsi sia durante la fase embrionale che durante le prime settimane di vita, ma durante la fase adulta gli animali iniziano a subire una progressiva perdita di motoneuroni (Masu et al., 1993). La sintesi del CNTF è affidata agli astrociti nel SNC e alle cellule di Schwann nel SNP (Sleeman et al., 2000). Il CNTF non viene secreto secondo il metodo classico, perché la molecola è sprovvista di una sequenza segnale, tipica delle molecole secretorie (Schuster et al., 2003). Effettivamente, l'espressione di CNTF è stata vista aumentare nella sostanza grigia in condizioni di lesione meccanica o ischemica, mentre in condizioni normali la sua espressione è estremamente bassa (Lee et al., 1997; Dallner et al.,

2002), suggerendo che la citochina venga rilasciata soprattutto in seguito a stress o traumi a livello cerebrale (Schuster et al., 2003).

La famiglia di appartenenza del CNTF è quella dell'Interleuchina 6 (IL-6), detta anche la famiglia delle citochine gp130 (il nome deriva dal recettore che viene riconosciuto da tutti i membri di questa famiglia, ossia la glicoproteina-130). Ne fanno parte, oltre a CNTF ed IL-6, l'Interleuchina 11 (IL-11), l'oncostatina M (OsM), il Leukemia inhibitory factor (LIF), la Cardiotrofina-1 (CT-1) e la Cardiotrophin-like cytokine (Bauer et al., 2007). Tutte queste citochine sono capaci di riconoscere il gp130 come β recettore, e di attivarlo (Groetzinger J. et al., 1999; Heinrich et al., 2003). Un'altra caratteristica che le accomuna è la struttura tridimensionale. Tutte quante presentano, infatti, un motivo a 4 α -eliche secondo la topologia up-up-down-down, che si mantiene tale indipendentemente dalla sequenza amminoacidica. Infatti, nel caso del CNTF e dell'IL-6, le due citochine presentano un'identità di sequenza pari a soltanto il 6%, ed una similarità di sequenza del 24% (Bazan et al., 1991), quindi abbastanza diverse tra loro dal punto di vista chimico-fisico, ma pressoché identiche se consideriamo la struttura tridimensionale (Cron L. et al., 2016). Il recettore è formato nella maggior parte dei casi da 3 subunità distinte: nel caso del CNTF, il recettore in forma attiva presenta 2 recettori specifici per il CNTF (CNTFR α), che si

legano a due molecole di CNTF e sono generalmente ancorati alla membrana plasmatica tramite il glicolipide glicosil-fosfatidilinositolo (GPI). Le subunità alfa legate al proprio ligando specifico successivamente si uniscono alle subunità beta del recettore, che sono proteine di membrana responsabili in maniera diretta della trasduzione del segnale.

Il complesso CNTF-CNTFR α recluta una subunità gp130R β ed una subunità LIFR β (ovvero il *Leukemia Inhibitory Factor-Receptor β*). Alcune di queste citochine, come LIF, possono indurre l'attivazione del pathway in maniera diretta, senza l'ausilio di un recettore alfa. Il CNTF necessita di un mediatore alfa, che può essere sia il CNTFR α , sia il recettore di IL-6 (IL-6R α), pur riconoscendo quest'ultimo con un'affinità 50 volte minore rispetto a IL-6 (Schuster et al., 2003). L'avvicinamento dei due recettori beta (per dimerizzazione) attiva le Janus chinasi JAK1 e JAK2, proteine che si attivano per autofosforilazione. Queste, una volta attive favoriscono il reclutamento, la fosforilazione e la dimerizzazione delle proteine STAT (STAT1,2,3,4,5,6), una famiglia di fattori di trascrizione che riconoscono regioni specifiche di DNA, attivando la trascrizione di geni a valle (**Figura 2**). In particolare, STAT3 entra nel nucleo in forma dimerica e fosforilata (attiva). Nel citosol STAT3 si trova in forma latente, non in grado di svolgere alcuna funzione, ma nel nucleo promuove la trascrizione di geni STAT-

specifici, tra cui il gene SOCS3 (Rezende et al., 2009). SOCS3 codifica per un'omonima proteina, capace di svolgere un'attività di feedback negativo nei confronti della via di signaling.

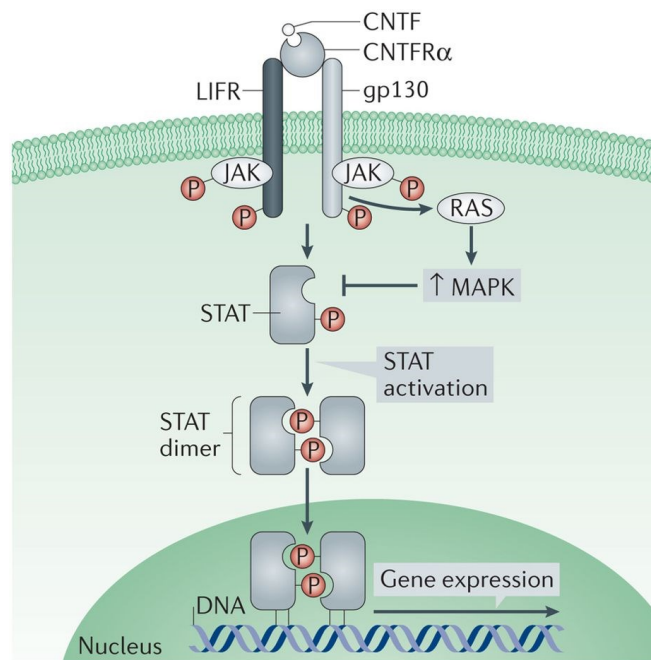


Figura 2 | Illustrazione schematica del signaling del CNTF mediante STAT3.

È stato dimostrato che il CNTF somministrato per via intravenosa od intraperitoneale (in modelli murini) è in grado di raggiungere il parenchima cerebrale, diffondendo attraverso gli organi circumventricolari, dove l'azione di filtraggio della barriera emato-encefalica è assente. Per tale motivo, la rilevazione (mediante immunostochimica) dell'immunoreattività per il pSTAT3 (fattore di trascrizione nucleare che si attiva grazie alla formazione del complesso CNTF-CNTFR α -gp130 β) è stata proposta come

strategia affidabile per la caratterizzazione di cellule sensibili al CNTF, ossia provviste di CNTFR α (MacLennan et al., 2002).

È stata dimostrata la presenza sia di CNTF che del proprio recettore alfa, in cellule nervose specializzate, i taniciti, distribuiti a livello del terzo ventricolo, a stretto contatto con le cellule ependimali, anch'esse provviste di recettore CNTFR α e CNTF, dimostrando che tali cellule sono produttrici di CNTF ma al tempo stesso responsive al ligando (Severi et al., 2012). La morfologia dei taniciti (soma provvisto di un unico lungo assone che si proietta verso i centri limitrofi), e la loro ubicazione a ridosso del canale ependimale del terzo ventricolo, suggeriscono che essi siano coinvolti nella captazione di segnali, come la concentrazione di glucosio, della leptina o altre biomolecole nel liquido cerebro-spinale, e successivamente nella trasmissione dei segnali ricevuti ai neuroni limitrofi, soprattutto dell'eminenza mediana e del nucleo arcuato, che sono centri specializzati nel controllo e nella regolazione dell'omeostasi energetica.

1.2. Effetti del CNTF sul bilancio energetico

1.2.1. Effetti Centrali

La scoperta del CNTF nei neuroni dei gangli ciliari di pollo e la successiva determinazione della sua funzione neurotrofica, capace di stimolare la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule nervose, ha riscosso notevole interesse in campo medico, soprattutto per il trattamento di malattie neurodegenerative. In particolare, venne evidenziata la capacità del CNTF di promuovere la sopravvivenza dei motoneuroni, e si pensò di poterlo utilizzare come farmaco per il trattamento della Sclerosi Amiotrofica Laterale (ALS), una malattia neurodegenerativa che comporta la progressiva perdita della facoltà locomotoria per la scomparsa dei motoneuroni. Nel 1996, Miller et al. per la prima volta testarono il CNTF in pazienti affetti da ALS, senza ottenere però il risultato desiderato, ovvero la riduzione degli effetti deleteri della malattia. Non venne osservata alcuna correlazione tra dose somministrata e miglioramenti della condizione neurodegenerativa. Inaspettatamente, si osservò invece una correlazione molto forte tra la dose di CNTF esogeno somministrata e la perdita di peso che i pazienti subivano durante il trattamento. Tali sorprendenti risultati spinsero ricercatori e

industrie farmaceutiche da tutto il mondo a studiarne gli effetti sul bilancio energetico, con lo scopo di migliorare o guarire tutti quei disturbi, come la steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e il diabete di tipo 2 (T2D), che sono spesso dovuti all'obesità, una condizione che di recente ha assunto le caratteristiche tipiche delle malattie epidemiche. Venne prontamente sintetizzata una molecola di CNTF ricombinante modificata, l'*Axokine*, per testare gli effetti di CNTF esogeno prima in numerosi esperimenti in vitro ed in vivo con modelli animali e, in seguito all'ottenimento di risultati incoraggianti, in pazienti obesi. Rispetto al CNTF endogeno umano, l'*Axokine* presenta due sostituzioni amminoacidiche ed il troncamento di 12 amminoacidi C-terminali che la rendono, nel complesso, una molecola più potente e più solubile rispetto alla versione endogena naturale. La molecola si rivelò molto efficace nel contrastare l'obesità, riducendo il peso corporeo dei pazienti trattati per riduzione del senso di appetito. In più, si scoprirono anche effetti positivi sui principali disturbi legati all'obesità, come l'iperinsulinemia, la dislipidemia e l'iperglicemia, che subivano una riduzione correlata alla somministrazione del farmaco (Watt et al., 2006). La molecola mostrò tuttavia anche un effetto indesiderato potenzialmente molto pericoloso, ossia l'aumento di anticorpi neutralizzanti nei confronti del CNTF (sia esogeno che endogeno). Temendo che gli anticorpi potessero

andare ad interferire con il naturale ruolo che il CNTF endogeno ricopre a livello del sistema nervoso (centrale e periferico), il farmaco venne prontamente dismesso e le terapie in corso interrotte (Ettinger et al., 2003). Tuttavia, i buoni risultati ottenuti nel contrastare l'obesità indussero i ricercatori ad approfondire lo studio sugli effetti del CNTF nel bilancio energetico, focalizzandosi dapprima sul sistema nervoso centrale, dove era chiaro che la molecola avesse delle funzioni ancora da determinare. Si scoprì che la citochina influenzava l'equilibrio tra gli stimoli di fame e sazietà a livello del Nucleo Arcuato (ARC) nell'ipotalamo (Anderson et al., 2003), in maniera molto simile alla leptina, un ormone sintetizzato e secreto nel torrente circolatorio dalle cellule adipose. La leptina, in effetti, riconosce un recettore (LRb) che, pur essendo sostanzialmente differente, mostra notevoli somiglianze sia strutturali che di trasduzione del segnale, con il recettore con cui il CNTF interagisce. Inoltre, anche la leptina espleta la propria funzione sul bilancio energetico tramite i neuroni ipotalamici, in particolare i neuroni che esprimono la propiomelanocortina (POMC), che svolgono una funzione di controllo sul *food intake* andando a diminuire lo stimolo della fame, ed i neuroni che esprimono la *Agouti Related Protein* (AgRP) e quelli produttori del Neuropeptide Y (NPY), che insieme modulano il senso di appetito. Sia la leptina che il CNTF vanno ad inibire i neuroni NPY e AgRP, mentre i

neuroni POMC vengono stimolati a ridurre il senso di appetito. Successivi studi hanno rivelato che la via di signaling principale attraverso la quale il CNTF esplica la propria funzione è il *pathway* JAK1-2/STAT3, a livello dei neuroni del nucleo arcuato, esattamente come la leptina (Lambert et al., 2001). Gli studi si sono concentrati su modelli animali, soprattutto murini, dove è stato osservato un effetto anoressigenico molto potente e, cosa interessante, duraturo nel tempo, anche dopo interruzione del trattamento. Topi obesi erano quindi in grado di perdere efficacemente peso corporeo, soprattutto massa grassa, e di mantenere il peso ideale a lungo, cosa che invece non accade in terapie che prevedono l'utilizzo di altri farmaci. A partire dal 2012 sono stati condotti ulteriori studi sul CNTF ma a livello endogeno, al fine di valutare se anche il CNTF endogeno avesse un ruolo determinante nella regolazione del bilancio energetico. Per cominciare si è indagato sulla distribuzione a livello ipotalamico della citochina in questione. Sono stati effettuati dei saggi di immunistochemica sull'ipotalamo di modelli murini, tramite anticorpi specifici immunoreattivi per il CNTF. L'analisi di immunistochemica ha evidenziato la presenza endocellulare del CNTF in cellule della glia dell'ipotalamo tuberale, soprattutto in corrispondenza delle cellule ependimali situate lungo tutta l'estensione rostro-caudale del terzo ventricolo, dove sono situate anche

particolari cellule nervose, i taniciti, che hanno mostrato una reazione positiva al saggio immunohistochimico. Anche gli astrociti della eminenza mediana e dell'ipotalamo anteriore hanno mostrato staining specifico per il CNTF. Inoltre, nello stesso studio, gli animali sono stati trattati con CNTF esogeno ricombinante al fine di individuare un'eventuale attivazione del pathway JAK/STAT3, andando a focalizzarsi sull'espressione nucleare dello STAT3 fosforilato (pSTAT3). La positività per il pSTAT3 (**Figura 3**) è stata osservata all'interno dei nuclei di cellule limitrofe alle cellule produttrici di CNTF (taniciti e cellule ependimali) precedentemente evidenziate, dimostrando che, in topi adulti, l'ependima del terzo ventricolo è un distretto sia produttore che sensibile al CNTF (Severi et al., 2012).

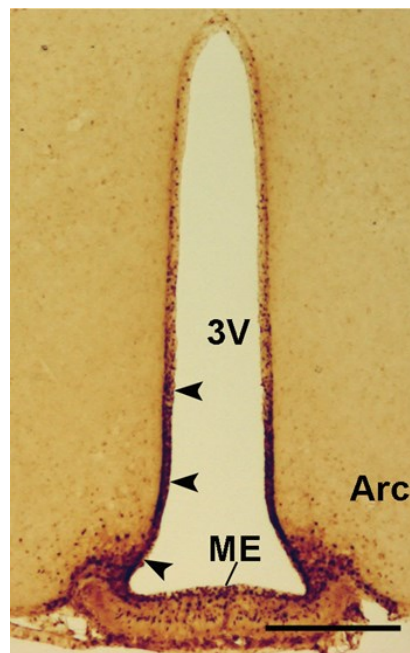


Figura 3 | Immunoreattività per il pSTAT3 dopo iniezione con CNTF in topi C57BL/6J. Le frecce indicano positività per pSTAT3 nell'ipotalamo tuberale, in corrispondenza dei nuclei delle cellule ependimali affacciate sul terzo ventricolo, nei taniciti e nelle cellule gliari dell'eminenza mediana (ME). Arc: Nucleo Arcuato. Barra=200µm.

In un lavoro successivo, il gruppo di ricerca diretto dal prof. Giordano dell'Università Politecnica delle Marche ha studiato il coinvolgimento del CNTF endogeno, così come quello esogeno, nella regolazione del *food intake* e del bilancio energetico, in modelli murini sottoposti a condizioni di dieta differenti. L'obiettivo è stato quello di valutare l'espressione sia di CNTF che della propria subunità recettoriale alfa (CNTFR α) in topi sottoposti ad una dieta ad alto contenuto lipidico (*High Fat Diet, HFD*), e in topi sottoposti a restrizione calorica (*Calorie Restriction*), rispetto ad un gruppo di topi alimentati con la dieta di controllo. L'espressione genica di CNTF e CNTFR α aumenta in modo significativo in topi HFD, rispetto alla dieta di controllo, mentre nei topi sottoposti a restrizione calorica l'espressione di citochina e recettore diminuisce in maniera significativa. Perciò, in condizioni di obesità indotta da dieta iperlipidica (*Diet Induced Obesity, DIO*) si osserva un aumento della sintesi di CNTF con conseguente aumento anche dell'espressione di geni STAT3-specifici nelle cellule limitrofe, dal momento che pSTAT3 aumenta significativamente nel nucleo delle cellule bersaglio, evidenziabile tramite *immunostaining* per pSTAT3 nei medesimi animali in seguito ad iniezione di CNTF ricombinante. Per quanto riguarda la condizione di restrizione calorica, si osserva un netto calo nell'espressione sia di CNTF che di CNTFR α (Severi et al., 2013).

Interessante è stata l'osservazione dell'espressione del CNTF in topi *ob/ob*, ossia selettivamente mutati nel gene codificante per la leptina, che mostrano un fenotipo obeso anche in condizioni di dieta normale. In questi topi la leptina è totalmente assente, perché il gene è difettivo, ma l'espressione di CNTF non viene alterata dalla condizione di obesità, e nemmeno il proprio recettore alfa ha subito delle modifiche. Tali osservazioni dimostrano, anche se non in maniera esaustiva, che la modalità con cui agisce il CNTF è totalmente indipendente dalla presenza o meno della leptina (Severi et al., 2013). In topi resi obesi da una dieta *HFD* si instaura il fenomeno, ancora non del tutto chiaro nelle modalità con cui si manifesta, della leptino-resistenza, rendendo il fenotipo di questi topi identico ai fenotipi mutanti *ob/ob* (delezione del gene codificante la leptina) e *db/db* (soppressione del gene codificante per il recettore LRb). In tali condizioni di obesità, indotta da dieta ipercalorica, la leptina si presenta ad elevatissimi livelli ematici (rispetto alla condizione normale), ma non è in grado di attivare il proprio *pathway* specifico. Al contrario, il CNTF esogeno riesce comunque a svolgere la propria funzione (molto simile se non identica a quella svolta dalla leptina), bypassando quindi la condizione di leptino-resistenza (Severi et al., 2013). In ulteriori studi è stato dimostrato per la prima volta che somministrando il CNTF viene indotta non soltanto l'attivazione di STAT3,

ma anche di STAT1 e STAT5, nell'ipotalamo tuberale, in corrispondenza dei nuclei delle cellule ependimali affacciate sul terzo ventricolo, nei taniciti e nelle cellule gliari dell'eminenza mediana (Severi et al., 2015). Oltre all'ipotalamo, esistono altri centri anatomici coinvolti nella regolazione del comportamento alimentare e di conseguenza del bilancio energetico, ovvero il complesso del dorso vagale, i centri truncali e l'area postrema del nucleo del tratto solitario. La conferma del fatto che il CNTF operasse effettivamente anche a livello di questi distretti è arrivata dopo la verifica che, in vivo, CNTF esogeno attiva sia STAT3 che STAT1 e STAT5, tramite determinazione del loro stato di fosforilazione e migrazione entro il nucleo cellulare (Senzacqua et al., 2016).

Tuttavia, sembra che il CNTF non sia in grado di venire secreto secondo le modalità classiche delle altre citochine della stessa famiglia, che prevedono il riconoscimento e successivamente il taglio della sequenza segnale per la secrezione. Il CNTF ne è sprovvisto, quindi non può essere secreto in modo convenzionale. Secondo delle ipotesi, esso verrebbe ad accumularsi in determinate cellule, come le cellule astrocitarie nella glia del sistema nervoso centrale (SNC) e nelle cellule di Schwann del sistema nervoso periferico (SNP).

In conclusione, il CNTF rappresenta un nuovo fattore di sazietà coinvolto nella regolazione del bilancio energetico svolgendo un'azione sia a livello ipotalamico che del tronco encefalico. Il CNTF si è rivelato essere una citochina molto interessante per due fondamentali ragioni: perché svolge le stesse funzioni della leptina e (soprattutto) perché l'obesità non influisce in alcun modo nell'espressione e nell'attività del CNTF stesso, mentre per quanto riguarda la leptina, considerata fino a poco tempo fa un ottimo candidato per il trattamento dei disturbi alimentari, l'obesità provoca una quasi completa insensibilità alla leptina stessa.

1.2.2. Effetti Periferici

Il SNC e il SNP non sono gli unici siti bersaglio del CNTF. Esso è stato dimostrato capace di indurre degli effetti anche in numerosi distretti anatomici periferici. Tra questi, i più importanti e i più studiati effetti del CNTF riguardano il muscolo scheletrico, il fegato, il pancreas, il tessuto adiposo sia bianco (WAT) che bruno (BAT) (**Figura 4**).

Nel muscolo striato scheletrico, l'espressione del recettore CNTFR α non è molto elevata, ma il CNTF riesce comunque a svolgere importanti funzioni, come la de-differenziazione di mioblasti umani in cellule progenitrici

multipotenti (Chen X. et al., 2005) e lo sviluppo di forza muscolare (Guillet C. et al., 1999). Per verificare l'effetto del CNTF sul muscolo scheletrico, sono stati condotti esperimenti in vivo su topi ai quali sono state somministrate dosi di CNTF esogeno in alcuni casi per via intra-peritoneale (IP), in altri casi per via intra-cerebro-ventricolare (ICV). Dopodiché, i topi sono stati sacrificati ed il muscolo scheletrico analizzato. CNTF per via ICV è stato dimostrato non avere alcuna funzione rilevabile o significativa, mentre il CNTF somministrato per via IP ha dato una risposta significativa positiva ovvero, aumentando i livelli di pSTAT3 e di pAMPK (Watt et al., 2006). Questi risultati sono stati i primi a confermare che il CNTF possiede la capacità di agire perifericamente in maniera diretta e indipendente. Oltre all'aumento di pAMPK e pSTAT3, è stato osservato un aumento di espressione anche dei marker tipici degli enzimi responsabili dell'ossidazione e del metabolismo degli acidi grassi. L'ossidazione degli acidi grassi nel tessuto muscolare scheletrico avviene tramite attivazione del pathway AMPK. Infatti, cellule muscolari scheletriche infettate con un vettore adenovirale AMPK negativo dominante (necessario per l'eliminazione dell'attività AMPK-dipendente) non mostrano un aumento di ossidazione degli acidi grassi. Inoltre, animali trattati con CNTF esogeno (per 7 giorni consecutivi) e sottoposti a dieta iperlipidica hanno mostrato nel

tessuto muscolare scheletrico un aumento della fosforilazione di STAT3, AMPK e ACC, e dell'attività ossidativa degli acidi grassi (Watt et al., 2006). Nel fegato il CNTF è in grado di ridurre la steatosi epatica, e di migliorare la sensibilità all'insulina, in condizioni di diabete di tipo 2 (Sleeman MW et al., 2003).

Effetti del CNTF a livello Periferico

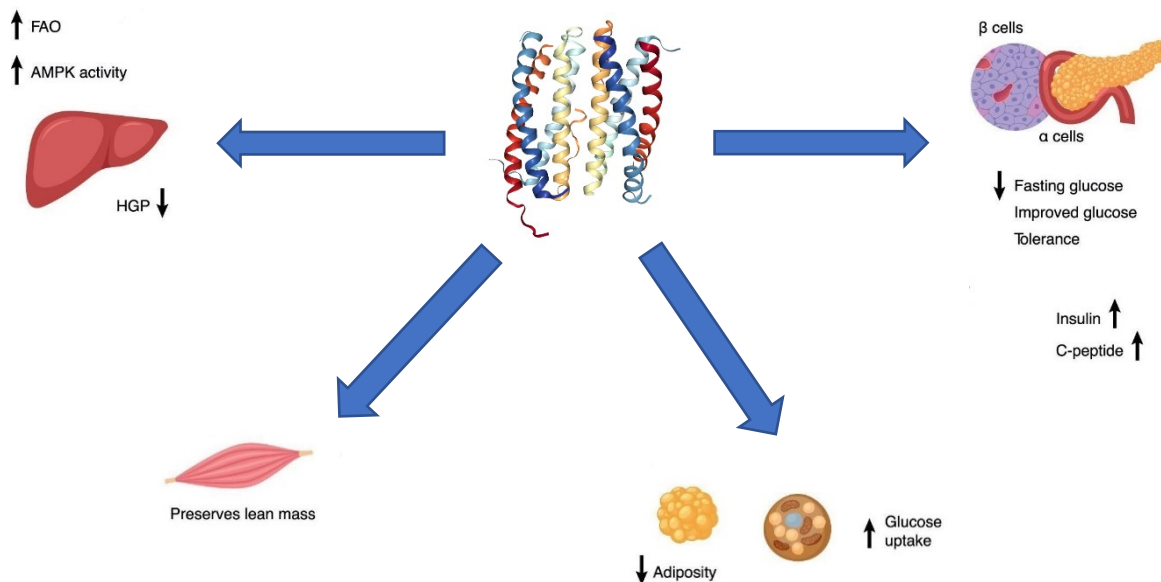


Figura 4 | Rappresentazione schematica di alcune delle principali azioni che il CNTF svolge nella periferia dell'organismo, in maniera indipendente dal Sistema Nervoso Centrale. **FAO: Fatty Acid Synthesis, HGP: Hepatic Glucose Production.**

Nel pancreas endocrino il CNTF promuove la sopravvivenza delle β -cellule, proteggendole dall'apoptosi indotta dalle citochine liberate durante l'infiammazione. È, inoltre, in grado di stimolare l'espressione della proteina

SOCS-3, che sembra giocare un importante ruolo nel ridurre la secrezione di insulina mediata dai livelli di glucosio nel sangue (Rezende LF et al., 2009).

1.2.3. Effetti del CNTF sul Tessuto Adiposo

Il CNTF esercita importanti effetti anche nel Tessuto Adiposo. Il trattamento con CNTF ricombinante murino, in vivo, ha provocato un'aumentata fosforilazione dello STAT3 nel tessuto adiposo epididimale, un tessuto paragonabile a quello viscerale adiposo dell'uomo (Zvonic et al., 2003). La principale via di signaling attivata da CNTF nel tessuto adiposo è quella del JAK/STAT. Più nel dettaglio, il CNTF si lega al proprio recettore CNTFR α , inducendo attivazione del recettore β che forma una struttura eterotrimerica (CNTFR α /LIFR- β /gp130R- β). Tale recettore trasduce il segnale mediante JAK/STAT3, dove avviene prima la fosforilazione di JAK a ridosso del recettore sul versante citosolico, poi il reclutamento (tramite fosforilazione di un residuo tirosinico (Tyr700) sulla coda C-terminale del recettore) dello STAT3, che si trova in forma latente nel citosol. Lo STAT3 viene reclutato grazie alla presenza nella sua sequenza amminoacidica di un dominio definito SH-2 (*Src Homology-2 domain*) che favorisce il legame della proteina con i residui tirosinici fosforilati del gp130R. L'effetto immediato

è la fosforilazione dello STAT3, che in questa forma riconosce e si lega ad un'altra molecola di pSTAT3, dando vita ad un omodimero attivato, che entra nel nucleo dove va a stimolare la trascrizione di specifici geni a valle. Gli effetti principali osservati nel tessuto adiposo bianco (WAT) sono l'incremento dell'attività lipolitica e l'inibizione dell'adipogenesi. Tali effetti sono stati determinati andando a sopprimere il gene codificante per lo STAT3 in modelli murini tramite tecnologia Cre-ricombinasi (Cernkovich et al., 2008).

Nel tessuto adiposo bruno (BAT), organo deputato al consumo energetico per regolare la termogenesi, l'obesità (indotta da HFD) provoca un decremento significativo dell'espressione di JAK Tyk2. Viene perciò a mancare la fosforilazione dello STAT3 (Derecka et al., 2012). Inoltre, la soppressione genica della proteina JAK2 nel BAT interferisce con l'espressione di UCP-1, e quindi con la termogenesi *non-shivering* (Shi et al., 2016).

Studi in vitro hanno anche evidenziato un importante ruolo del CNTF in cellule pre-adipocitiche e adipociti maturi, valutando l'espressione di pSTAT3 (Zvonic et al., 2003). Dal momento che il CNTF è in grado di svolgere un'attività insulino-sensibilizzante, si è ipotizzato che esso sia coinvolto in un meccanismo di compensazione nel tessuto adiposo di roditori

obesi insulino-resistenti, al fine di rendere il tessuto sensibile all'insulina (Matthews et al., 2008), aumentando l'espressione di CNTFR α a livello locale.

Inoltre, è stato visto che topi alimentati con una dieta normale e sottoposti a trattamento con CNTF esogeno mostrano un incremento significativo dei livelli di pSTAT3, secondo una modalità dose-dipendente, sia nel tessuto muscolare scheletrico che nel tessuto adiposo. Tale osservazione suggerisce che il CNTF abbia un ruolo diretto a livello periferico, e che tale attività sia indipendente dal sistema nervoso centrale (Matthews et al., 2008). Numerosi esperimenti in vitro hanno confermato la capacità del peptide di intervenire in maniera totalmente indipendente e diretta nella regolazione delle vie di *signaling* del metabolismo e della crescita delle cellule adipose.

Negli adipociti bruni il CNTF è in grado di potenziare l'espressione del gene UCP-1, suggerendo quindi un ruolo fondamentale e diretto a livello periferico nella regolazione dell'omeostasi energetica. Inoltre, il peptide provoca un aumento considerevole di pSTAT3, in modo proporzionale alla dose ed al tempo di trattamento, aumentando di circa 7 volte in presenza di CNTF 10 nM per 10 minuti. Esso è responsabile diretto anche dell'incremento dell'attività delle MAPK, attivandole per fosforilazione. Infine, il CNTF è capace di attivare la via di *signaling* di AKT, un elemento

chiave nella regolazione del trasporto di glucosio all'interno della cellula. La risposta all'aumento di p-AKT è ridotta in presenza di inibitori di PI3K e di PKC, ma non di mTOR, suggerendo quindi un ruolo importante delle vie PI3K e PKC nell'effetto a cascata del CNTF (V. Ott, et al., 2002).

I risultati dimostrano che tali effetti sono diretti e non necessitano di stimolazioni dal sistema nervoso centrale.

Il CNTF esercita anche una funzione diretta sugli adipociti bianchi. Esperimenti su cellule 3T3-L1 (una linea cellulare immortalizzata di adipocita bianco di roditore) hanno dimostrato che il peptide stimola la fosforilazione di STAT3, mentre AKT viene fosforilata solamente nei pre-adipociti (cellule adipose indifferenziate), mentre negli adipociti maturi non si rileva un aumento significativo. Sorprendentemente, le cellule 3T3-L1, durante il differenziamento, non esprimono il CNTFR α né LIFR (gp130 rimane invariato), ma nonostante ciò, trattamenti cronici con CNTF hanno comunque stimolato l'attivazione di STAT3, provocando la riduzione sia dell'attività sia della *Fatty Acid Synthase* che di SREBP-1, un fattore di trascrizione che attiva la trascrizione di geni codificanti per proteine coinvolte nell'aumento dell'attività lipogenica (Zvonic et al., 2003).

1.2.4. Le hMADS come modello di cellula adiposa umana per studi in vitro sul metabolismo del tessuto adiposo

Per molto tempo il modello di cellula adiposa più utilizzata per studi in vitro è stata la linea Swiss 3T3-L1, una linea cellulare murina immortalizzata di origine mesenchimale staminale ottenibile da embrioni di circa 19 giorni di vita, e capace di differenziarsi in cellula adiposa matura se opportunamente coltivata con un cocktail ormonale appropriato. Essa presenta una morfologia fibroblastica (fusiforme allungata) durante lo stato indifferenziato, e gradualmente acquisisce il fenotipo dell'adipocita maturo. Le principali ragioni dell'utilizzo di questa linea sono il minor costo e la maggiore semplicità con cui possono essere coltivate, rispetto a cellule adipose mature appena isolate. Inoltre, sono capaci di sopportare un elevato numero di passaggi di amplificazione, conservando tutto il loro potenziale di cellula indifferenziata e proliferativo. Possono altresì differenziare in molti tipi cellulari diversi, dipendono esclusivamente dal tipo di terreno colturale scelto. Resta tuttavia lo svantaggio dell'origine animale: studi in vitro su cellule animali sono in generale molto meno attendibili rispetto a studi condotti su cellule umane (o al massimo di primati). Per tale motivo è nata l'esigenza di sviluppare modelli cellulari di origine umana, isolabili dalla

frazione stromale vascolare (SVF) del tessuto adiposo. La frazione SV, tuttavia, contiene una miscela eterogenea di cellule di origine adiposa e non, come per esempio le cellule staminali, i pre-adipociti, i macrofagi, le cellule endoteliali, i neutrofili e i linfociti. Tra queste, notevole interesse scientifico hanno riscosso le cellule staminali adipose, ovvero le hMADS (*human Multipotent Adipose Derived Stem cells*). Le hMADS sono cellule isolate dal tessuto adiposo sovrapubico di individui di età infantile (Rodriguez et al., 2009). Sono cellule *fibroblast-like* multipotenti: possono differenziarsi in vari tipi cellulari tra cui mioblasti, osteoblasti, condroblasti, adipociti bianchi e bruni. Presentano un normale cariotipo diploide (non sono tumorigeniche), pur conservando però ottime capacità di proliferazione, e sono capaci di sopportare un elevato numero di passaggi (Zuck et al., 2002). Rispetto alle cellule 3T3-L1, presentano l'ovvio vantaggio di essere di origine umana, e di fornire, di conseguenza, risultati più attendibili. Una volta differenziate in cellule adipose, esse presentano la consueta morfologia multiloculare, dovuta all'accumulo di lipidi di riserva sotto forma di vacuoli lipidici multipli, che occupano la maggior parte del volume cellulare. Richiedono in media 14 giorni per il differenziamento completo, come le 3T3-L1. Una volta differenziate in adipociti bianchi maturi mostrano tutti i marcatori molecolari tipici delle cellule adipose normali, come il *peroxisome*

proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ), fatty acid binding protein 4 (FABP4), perilipina, adiponectina e leptina, la quale viene regolarmente secreta da queste cellule (Figura 5). In particolare, l'espressione del gene PPAR- γ e l'attivazione delle lipasi e degli enzimi esterificanti sono state dimostrate aumentare durante il processo differenziativo, rimarcando, quindi, che i geni coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi vengono sovra-espressi durante la trasformazione della cellula indifferenziata in cellula adiposa.

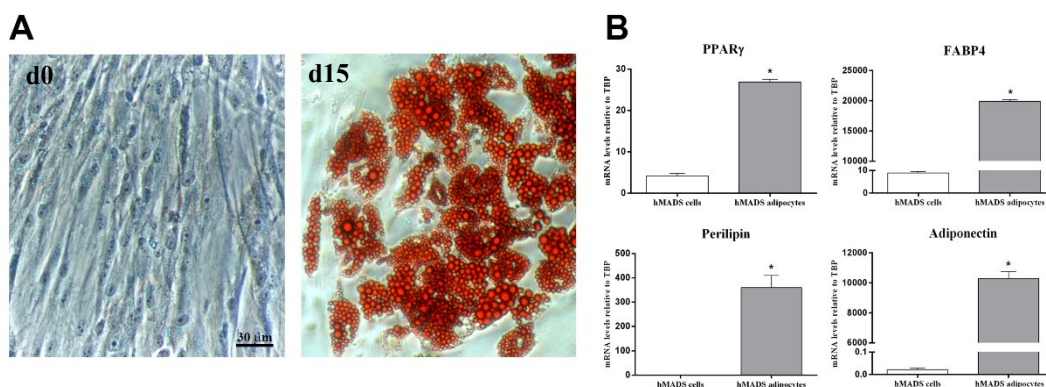


Figura 5 | Immagini di microscopia ottica delle hMADS al giorno 0 (d0), che mostrano una morfologia *fibroblast-like*, e al giorno 15 (d15) di differenziamento mantenute in terreno di coltura adipogenico, che mostrano una morfologia multiloculare. Le cellule sono state fissate e colorate con lo staining Oil Red O, che marca i vacuoli lipidici (A). Le hMADS differenziate esprimono tutti i marcatori molecolari tipici delle cellule adipose: PPAR- γ , FABP4, Perilipina e Adiponectina (B).

Inoltre, al quattordicesimo giorno del periodo di differenziamento, ossia il giorno più idoneo per iniziare i trattamenti, le hMADS mostrano dei picchi di espressione di PPAR- γ , di HSL (*Hormone Sensitive Lipase*) e di ATGL (*Adipose Triglyceride Lipase*), che raggiungono livelli comparabili con quelli dell'adipocita umano (Bezaire et al., 2009). Per tutte queste ragioni, le

hMADS vengono ritenute un valido modello per lo studio in vitro del metabolismo della cellula adiposa umana.

1.2.5. Espressione di CNTFR α e di pSTAT3 nelle hMADS

Le hMADS esprimono il recettore CNTFR α , il cui ruolo è fortemente correlato all'attivazione di JAK/STAT3. Recenti studi volti alla caratterizzazione del profilo di espressione delle hMADS non differenziate e differenziate hanno fornito risultati contrastanti: le hMADS non differenziate presentano un quantitativo di mRNA del CNTFR α esiguo, ma esperimenti di Western blotting hanno dimostrato che il CNTFR α è presente in quantità notevoli. Al contrario, le hMADS differenziate in adipociti presentano alti livelli di mRNA di CNTFR α ma le corrispondenti proteine sono presenti a concentrazioni minime (Perugini et al., 2019). Chiaramente durante il processo differenziativo il CNTFR α subisce un netto calo di sintesi proteica, ma è interessante notare come i livelli di mRNA restino invece molto abbondanti, suggerendo un possibile meccanismo di fornitura di CNTFR α proteico “a richiesta”, tramite stimoli ancora non del tutto caratterizzati (Perugini et al., 2019). I dati di biologia molecolare (real-time PCR e Western blotting) sono stati confermati da esperimenti di microscopia

confocale che evidenziano, sia sulle hMADS indifferenziate che differenziate in adipocit bianchi, la presenza del recettore α per il CNTF (**Figura 6**). Le hMADS, inoltre, esprimono significativi livelli di pSTAT3 in seguito al trattamento con CNTF. In particolare, è stato dimostrato un aumento di attività (dose e tempo-dipendente) del complesso JAK/STAT3 in seguito a trattamento acuto col CNTF ricombinante (Perugini et al., 2019). L'attivazione del complesso JAK/STAT3 è molto importante perché interviene nella regolazione di numerose funzioni chiave dell'adipocita bianco (Richard AJ. et al., 2014), ed il malfunzionamento di questa via, che si verifica in condizioni di elevata adiposità, è nettamente correlato con fenomeni patologici gravi, tra i quali si annoverano la resistenza all'insulina ed anche alla leptina (Wunderlich et al., 2013). Inoltre, il pathway JAK/STAT3 è fortemente correlato con il CNTFR α durante la trasduzione del segnale (Heinrich PC et al., 2003; Simi A et al., 2010). Concludendo, le hMADS possono quindi essere utilizzate come modello per lo studio in vitro degli effetti del CNTF sulle cellule adipose umane. La stessa cosa non avviene per quanto riguarda le cellule 3T3-L1, che in fase differenziata non esprimono il recettore CNTFR α .

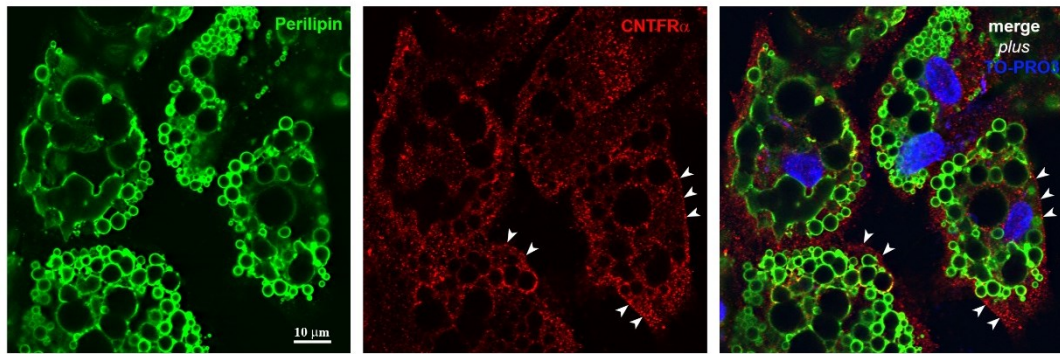


Figura 6 | Immagini di adipociti hMADS ottenute al microscopio confocale, che mostrano la positività degli adipociti per la perilipina (in verde) e per il recettore α del CNTF (in rosso). In blu (TO-PRO3) sono evidenziati i nuclei cellulari.

Capitolo secondo

SCOPO DELLA TESI

2.1. Obiettivi dello studio

Il CNTF, fin dall'inizio, quando per la prima volta è stato scoperto da Adler et al. nel 1979 come fattore neurotrofico, si è dimostrato un peptide di grande interesse. Questo interesse si è accresciuto ulteriormente quando è stato, casualmente, scoperto avere un effetto positivo sull'equilibrio tra senso di fame e di sazietà, permettendo ai pazienti di perdere peso a seguito della somministrazione del peptide. Tali promettenti dati hanno aperto la strada a numerosi studi successivi volti allo studio degli effetti del CNTF nella regolazione del bilancio energetico che risultano, ad oggi, ancora poco chiari. Da tempo sono ormai noti gli effetti a livello del sistema nervoso centrale, ovvero la capacità di stimolare importanti centri nervosi, sia ipotalamici che del tronco encefalico, e dell'omeostasi energetica. Tuttavia, restano da chiarire gli effetti che il peptide ha mostrato possedere a livello della periferia dell'organismo, che sono totalmente indipendenti da quelli sul sistema nervoso centrale. Recenti studi hanno confermato effetti diretti su vari organi, come il muscolo scheletrico, il fegato ed il pancreas, ove il CNTF

svolge un ruolo importante nel metabolismo glucidico, rendendo gli organi più sensibili all'insulina e favorendo la gluconeogenesi a livello epatico, ed un ruolo altrettanto importante nel metabolismo lipidico, in particolare nel ridurre la steatosi epatica ed il contenuto lipidico di riserva nei muscoli, in pazienti che soffrono di obesità.

Tuttavia, ancora poco si sa riguardo gli effetti diretti sull'organo adiposo, che comprende sia il tessuto adiposo bianco, di riserva, che bruno, responsabile della regolazione della termogenesi *non-shivering*.

Il presente studio ha come obiettivo quello di approfondire, tramite tecniche di biologia molecolare e di biochimica, gli effetti del CNTF sul tessuto adiposo, in particolare sul metabolismo glucidico e lipidico, mediante esperimenti in vitro su cellule adipose umane in coltura ovvero le hMADS, considerato un modello cellulare appropriato per studiare il metabolismo degli adipociti umani.

Studiare il ruolo metabolico del CNTF sulle cellule adipose e cercare di capirne i meccanismi attraverso cui agisce, potrebbe rilevare nuove molecole potenzialmente candidate ad un nuovo approccio terapeutico alla terapia dell'obesità.

Al fine di raggiungere ali obiettivi, il presente studio si propone di caratterizzare il metabolismo glucidico e lipidico delle cellule adipose

hMADS, trattate con il CNTF per contestualizzare l'effetto metabolico del CNTF endogeno nel tessuto adiposo. Un'ipotetica azione positiva del CNTF potrebbe tradursi, pertanto, in un auspicabile effetto anti-obesità. Presupponendo che una disregolazione del bilancio energetico, e quindi un'alterazione del metabolismo glucidico e/o lipidico, sia responsabile dell'obesità, i dati ottenuti da questo studio potrebbero rilevare nuovi meccanismi patogenetici dell'obesità e nuovi potenziali targets molecolari distintivi per trattamenti farmacologici efficaci per la terapia dell'obesità umana.

Capitolo terzo

MATERIALI E METODI

3.1. *Colture cellulari e Trattamenti*

Nel presente studio sono state utilizzate le hMADS, isolate dal tessuto adiposo sovrapubico di donatori di 5 anni di età (A.M. Rodriguez et al., 2009). Le cellule sono state crio-preservede in azoto liquido in differenti batch, scongelati secondo necessità. Le cellule appena scongelate sono state coltivate in *Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (DMEM)*, al quale è stato aggiunto siero fetale bovino al 10%. Ad un giorno dallo scongelamento, è stato aggiunto il fattore di crescita umano hFGF2, ad una concentrazione di 2,5 ng/mL. Le cellule sono state quindi lasciate proliferare in incubatore (37°C, 5% CO₂ e 75% umidità), avendo cura di rinnovare il terreno di coltura ogni 3 giorni, fino ad ottenere confluenza. Raggiunta la confluenza del 70%, le colture sono state sottoposte a splitting in rapporto 1:3 (3 fiasche di coltura da ogni fiasca confluyente). Per gli esperimenti di biologia molecolare e di biochimica, le cellule sono state piastrate in piastre *multi-well* ad una concentrazione pari a 4500 cellule/cm² e il fattore di crescita hFGF2 è stato rimosso quando le cellule hanno raggiunto

confluenza. Il giorno successivo alla rimozione del hFGF2 (designato come giorno 0) le hMADS sono state indotte a differenziare in adipociti secondo il protocollo standard (V. Bezaire et al., 2009). Brevemente, le cellule sono state incubate in terreno adipogenico (terreno di proliferazione privo di siero e *Ham's F-12 medium*) contenente 10µg/ml di transferrina, 5µg/ml, 0.2 nM di Triiodotironina, 100µM di 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 1µM dexametasone e 100 nM Rosiglitazone. Dexametasone e IBMX sono stati omessi dal giorno 3 ed il rosiglitazone dal giorno 9. L'avvenuto differenziamento in cellule adipose è stato valutato dopo il dodicesimo giorno di differenziamento osservando al microscopio ottico la formazione delle goccioline lipidiche (fenotipo multiloculare). Tramite colorazione con Oil Red O è stata valutata anche la concentrazione lipidica all'interno dei vacuoli. I trattamenti e i saggi biologici sono stati svolti su adipociti hMADS differenziati dal giorno 12 al 15. La durata del trattamento e le concentrazioni di CNTF sono riportate nel capitolo quarto.

3.2. *Western blotting*

Le cellule sono state lisate con il tampone di lisi, contenente Tris-HCl (pH 7,4) 50 mM, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM Sodio ortovanadato, 0,5% Sodio deossicolato, 0,1% SDS, 2 mM Fenilmetilsolfonilfluoruro ed infine 50 mg/mL di aprotinina, per preservare l'integrità dell'estratto proteico totale. Il lisato proteico totale è stato quantificato tramite *Bradford Protein Assay* (BioRad, USA) allo spettrofotometro. Tramite retta di taratura precedentemente costruita mediante diluizioni seriali di albumina sierica bovina (BSA), è stato possibile convertire i valori di assorbanza ottenuti in concentrazioni [$\mu\text{g/mL}$]. Successivamente, i campioni sono stati diluiti affinché fossero della stessa concentrazione finale, e sottoposti ad *SDS-PAGE* (BioRad, USA), su gel di poliacrilamide. Le proteine totali così separate sono state infine trasferite su membrana di nitrocellulosa utilizzando il sistema semi dry ossia il *Trans-Blot Turbo* (BioRad, USA). Successivamente le membrane sono state bloccate per 1 ora a temperatura ambiente in soluzione TBS-Tween-20 [Tris-HCl 50 mM, (pH 7,6), 200 mM NaCl e 0,1% Tween-20] con latte in polvere al 5%. Al termine, sono state incubate con anticorpi primari specifici (**Tabella 1A**) overnight a 4°C. Il giorno successivo, dopo opportuni

lavaggi con TBS-Tween-20 le membrane sono state incubate per 1h a temperatura ambiente in presenza di TBS-T e anticorpi secondari specifici, coniugati con *Horseradish Peroxidase* (**Tabella 1B**). Le bande specifiche sono state visualizzate al *Chemidoc* (BioRad, USA) utilizzando un substrato chemiluminescente ossia il *Clarity Western ECL* (BioRad, USA). Le bande immunoreattive verso uno specifico anticorpo sono state quantificate mediante utilizzo di un software ossia *Image Lab* (BioRad, USA). Ove appropriato, è stato effettuato *stripping* sulle membrane, che sono poi state lavate e nuovamente incubate con anticorpo per normalizzare i risultati ottenuti confrontandoli con il contenuto proteico totale.

TABELLA 1A | Anticorpi Primari

| Anticorpi | Origine | Diluizione | Provenienza |
|----------------------|----------------|-------------------|------------------------------------|
| AKT | Rabbit | 1:1000 | Cell Signaling Technology/9272 |
| ATGL | Mouse | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology/sc-365278 |
| β-Actin | Mouse | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology/sc-477778 |
| β-Tubulin | Mouse | 1:800 | Santa Cruz Biotechnology/sc-5274 |
| FAS | Mouse | 1:500 | Santa Cruz Biotechnology/sc-48357 |
| pAKT (Ser473) | Rabbit | 1:2000 | Cell Signaling Technology/4060 |

TABELLA 1B | Anticorpi Secondari

| Enzima Coniugato | Target | Diluizione | Provenienza | ID |
|-----------------------------|---------------|-------------------|------------------------|-------------|
| Perossidasi | Rabbit | 1:1000 | Vector Laboratories | PI-1000 |
| Perossidasi | Mouse | 1:5000 | Jackson ImmunoResearch | 715-036-150 |

3.3. *qRT-PCR*

Le hMADS sono state lisate con il *Trizol* (Invitrogen, Milano, ITA) per l'estrazione dell'RNA totale. Il lisato è stato poi digerito con desossiribonucleasi (*RNase-free*), purificato e concentrato utilizzando un kit a colonnine ossia l'*RNeasy Micro Kit* (Qiagen, Milano, ITA) seguendo le istruzioni del protocollo allegato. L'RNA estratto è stato quantificato allo spettrofotometro e sintetizzato il cDNA tramite trascrizione inversa di 1 µg di campione di RNA totale in 20 µl di volume finale, seguendo il protocollo del kit *High-capacity cDNA RT Kit* con inibitore dell'RNasi (Applied BioSystems, CA, USA). La qRT-PCR è stata eseguita con sonde *TaqMan Gene Expression Assays* (**Tabella 1C**) e *Master Mix TaqMan* (Applied BioSystems, CA, USA). Le reazioni di qPCR sono state effettuate in un termociclatore ossia lo *Step One Plus Real Time PCR System* (Applied BioSystems, CA, USA) caricando per ciascuna reazione 50 ng di RNA in un volume finale reazione di 10 µl. Il programma scelto per l'amplificazione è stato il seguente: 95°C incubazione iniziale per denaturazione, per 10', poi, per 40 cicli: 95°C per 15'' seguiti da 60°C per 20''. Come controllo endogeno per normalizzare è stato utilizzato il *Tata Box Binding Protein* (TBP), che viene costitutivamente espresso da tutte le cellule eucarioti. I

campioni sono stati caricati in doppio. Sono stati inclusi in ogni corsa di PCR i controlli negativi ossia i campioni senza *template* (*No Template Control*) e i campioni i quali nella RT-PCR è stato omesso l'enzima trascrittasi inversa, per escludere qualsiasi contaminazione di DNA genomico. L'analisi di espressione genica è stata eseguita attraverso metodo ΔCt ($2^{-\Delta\text{Ct}}$).

TABELLA 1C | Sonde Taqman da *Applied Biosystems* #4453320

| Target Gene | Assay ID |
|---------------------------------|-----------------|
| ATGL | Hs00386101_m1 |
| CNTFRα | Hs00181798_m1 |
| FAS | Hs01005622_m1 |
| HSL | Hs00943410_m1 |
| SREBP-1 | Hs04984975_m1 |
| TBP | Hs00427620_m1 |

3.4. *Quantizzazione dei lipidi intra-citoplasmatici mediante colorazione Oil Red O*

Il contenuto lipidico delle cellule è stato determinato tramite il saggio colorimetrico ORO. Brevemente, gli adipociti hMADS sono stati trattati con CNTF (1 nM) e IBMX (0.5 mM) usato come controllo positivo per la determinazione della lipolisi. Dopo opportuni lavaggi con PBS 0.1M (pH 7.4), le cellule in coltura sono state fissate per 30 minuti in paraformaldeide al 10% a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state lavate nuovamente in PBS, e poi incubate in presenza di *Oil Red O stain* per 1h, e

lavate per l'ultima volta. Le cellule sono state poi osservate al microscopio ottico. Dopo averle visualizzate, le cellule sono state lasciate ad asciugare. Lo staining dei lipidi è stato risospeso aggiungendo alcol isopropilico, e quantificato leggendo i valori di assorbanza ad una lunghezza d'onda pari a 490 nm, utilizzando un lettore di micro-piastre (*Infinite F200 PRO plate reader*).

3.5. Saggio di lipolisi

La lipolisi è stata valutata tramite la quantificazione degli acidi grassi liberi (*Free fatty acid, FFA*) rilasciati nel mezzo di coltura, utilizzando il *Free Fatty Acid Quantification Assay Kit* (# ab65341, Abcam, Cambridge, UK), che è in grado di rilevare gli acidi grassi a lunga catena tramite un metodo enzimatico. L'assorbanza è stata misurata usando uno spettrofotometro a micropiastro (*Infinite F200 PRO plate reader*), a 570 nm. Come controllo positivo, in alcune cellule la lipolisi è stata indotta mediante trattamento con IBMX, che è un noto inibitore non selettivo della fosfodiesterasi in grado di innalzare i livelli di cAMP citosolico e di stimolare la lipolisi dell'adipocita.

3.6. Saggio di uptake di glucosio

Le hMADS sono state seminate e differenziate in cellule adipose in piastre a fondo nero di 96 pozzetti (Corning, Sigma-Aldrich Chemie, Milano, Italy) ed incubate in *DMEM low glucose* con CNTF 1 nM per differenti periodi di tempo. Successivamente, le cellule sono state incubate con o senza 100 nM di Insulina in tampone fosfato *Krebs-Ringer* (pH 7.4) a 37°C per 10 minuti. Infine, sono state trattate con *2-nitrobenzodeossiglucosio (2-NBDG)* 50 µM per 1h. L'intensità di fluorescenza è stata rilevata a 550/590 nm usando il lettore di piastre *Infinite F200 PRO* (Tecan, Mannedorf, Switzerland).

3.7. Analisi Statistica

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato. I dati vengono riportati come \pm errore standard della media (*SEM*). I confronti sono stati effettuati tra i gruppi e all'interno dei gruppi stessi, tramite, rispettivamente, t-test di Student e *one-way analysis of variance* (ANOVA). Soltanto i dati che presentavano un $p < 0.05$ sono stati considerati come significativi. Tutte le analisi statistiche sono state condotte tramite il software *GraphPad Prism 6*.

Capitolo quarto

RISULTATI

4.1. Effetti del CNTF sul metabolismo lipidico delle hMADS

Negli adipociti bianchi gran parte dell'energia viene stoccata sotto forma di trigliceridi, i quali derivano dall'esterificazione di una molecola di glicerolo 3-fosfato con gli acidi grassi, che sono o prelevati dal torrente circolatorio (dalle lipoproteine circolanti), oppure sintetizzati de novo grazie all'enzima FAS (*Fatty Acid Synthase*) che converte substrati non lipidici (come per esempio il glucosio) in acidi grassi. Normalmente, nelle cellule adipose mature, l'espressione di FAS (e quindi la sua attività) viene finemente regolata da un fattore di trascrizione, SREBP-1 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-1*), il quale, di conseguenza, favorisce la conversione di carboidrati in lipidi, sia nel tessuto adiposo (Rosen E.D. et al., 2000) che nel fegato (Wang Y. et al., 2015). Al contrario, due altri enzimi, *Hormone-Sensitive-Lipase* (HSL) e *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL) promuovono l'idrolisi e quindi il consumo dei trigliceridi, convertendoli in acidi grassi e glicerolo, al fine di renderli utilizzabili da altri tessuti per la produzione di energia sotto forma di ATP. Per osservare se il CNTF fosse in grado di

regolare l'espressione di questi marcatori del metabolismo lipidico, le hMADS sono state fatte differenziare in cellule adipose bianche e trattate con CNTF 1nM per 24h e 48h. Al termine del periodo di trattamento le cellule sono state lisate ed il contenuto proteico e di RNA messaggero è stato analizzato. I trattamenti hanno determinato una significativa riduzione dell'espressione sia di FAS che di SREBP-1. Al contrario, i livelli di mRNA di HSL sono aumentati in maniera significativa dopo il trattamento per 24h, mentre ATGL è aumentato dopo 48h di trattamento (**Figura 7A-B**).

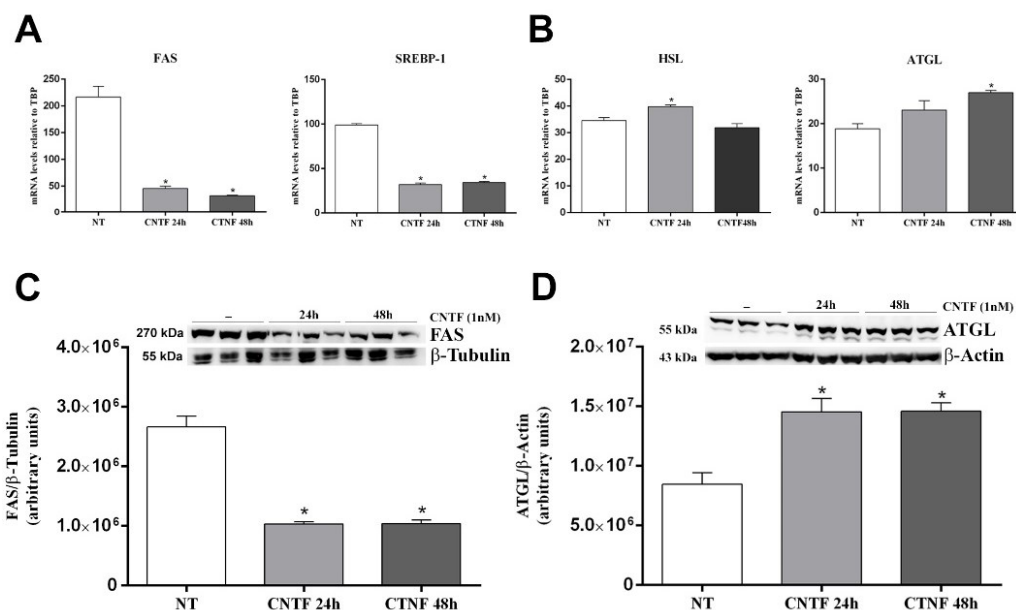


Figura 7 | Differenze a livello trascrizionale indotte da trattamento cronico con CNTF in adipociti hMADS. Sono riportati i livelli di mRNA dei marcatori di lipogenesi SREBP-1 e FAS (**A**) e degli enzimi lipolitici ATGL e HSL (**B**), in adipociti hMADS trattati con CNTF 1nM per 24 o 48h. Immagini rappresentative degli immunoblots e analisi quantitativa dell'espressione proteica di FAS (**C**) e ATGL (**D**), riportati in unità arbitrarie e confrontati con lisati proteici di cellule non trattate (NT). Gli adipociti hMADS sono stati trattati con CNTF 1nM per 24 o 48h.

Analisi di Western blotting sono state svolte per chiarire se le variazioni di espressione di questi geni si riflettono anche a livello proteomico. I risultati hanno dimostrato che a variazioni nel contenuto di RNA messaggero corrispondono variazioni proporzionali anche nel contenuto proteico. In particolare, risulta evidente come il CNTF inibisca l'espressione e la sintesi dell'enzima lipogenico FAS e, al contrario, promuova l'espressione del marker lipolitico ATGL, indirizzando il metabolismo lipidico verso il consumo delle riserve energetiche stesse (**Figura 7C-D**).

Inoltre, è stato quantificato, mediante colorazione *Oil Red O*, l'accumulo dei lipidi negli adipociti. Sono stati valutati gli effetti del CNTF sul contenuto lipidico nelle hMADS differenziate. Le cellule sono state trattate con CNTF 1 nM per 24h e 48h e, successivamente, colorate con *Oil Red O staining* (**Figura 8A**). Dopo risospensione dello stain con isopropanolo, è stata misurata la densità ottica (OD490) delle cellule trattate con il CNTF comparata con la OD delle cellule di controllo (NT). Il trattamento con IBMX rappresenta il controllo positivo della lipolisi. Il contenuto lipidico si riduce in maniera significativa dopo 48h di trattamento con il CNTF (**Figura 8B**).

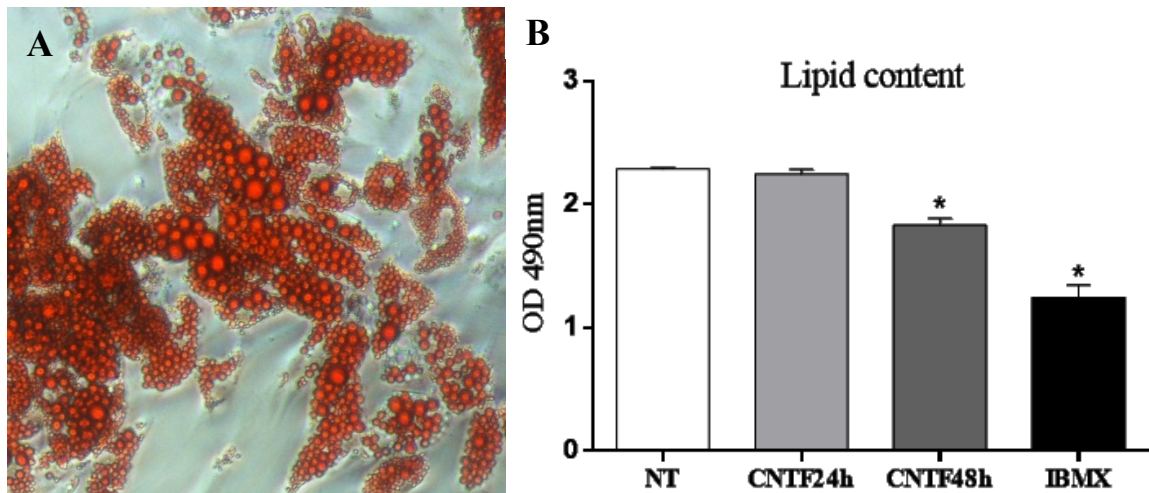


Figura 8 | Effetti del CNTF sul contenuto lipidico delle cellule hMADS differenziate. Le cellule al giorno 13 di differenziamento mantenute in terreno di coltura adipogenico mostrano una morfologia multiloculare. Le cellule sono state fissate e colorate mediante *Oil Red O staining*, che marca i vacuoli lipidici (A). La densità ottica (OD490) delle cellule trattate con il CNTF 1nM sono state confrontate con le OD delle cellule di controllo (NT). I risultati sono espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti (B).

Infine, è stato quantificato il rilascio di acidi grassi liberi nel mezzo di coltura. Questi aumentano in modo significativo in seguito a trattamento con

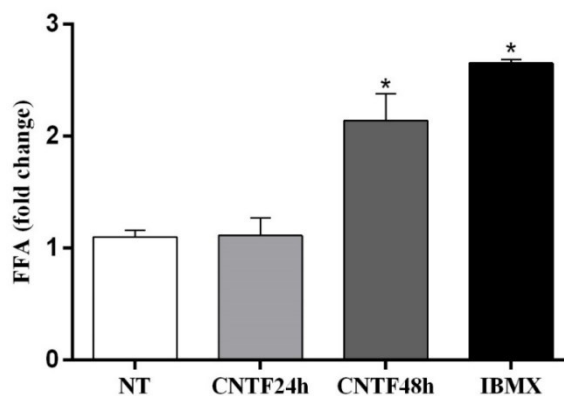


Figura 9 | Variazione del livello di acidi grassi liberi (FFA) secreti nel mezzo di coltura di adipociti, trattati in diverse condizioni (CNTF per 24h, CNTF per 48h). IBMX è un inibitore della fosfodiesterasi che attiva la via PKA stimolando la lipolisi.

CNTF per 48h, dimostrando che il CNTF ha un effetto significativo nel metabolismo dei trigliceridi, spostandone l'equilibrio verso il consumo di lipidi, al fine di produrre energia (**Figura 9**).

Insieme, questi dati confermano che trattamenti a lungo termine con CNTF portano ad un'inibizione dell'espressione dei marcatori di lipogenesi e, contemporaneamente, ad un aumento dell'attività degli enzimi lipolitici, favorendo quindi un ridotto accumulo di riserve energetiche in forma lipidica ed una maggiore spesa energetica nel tessuto adiposo.

4.2. Effetti del CNTF sul metabolismo glucidico

Successivamente, si è cercato di valutare eventuali effetti del CNTF nella regolazione del metabolismo del glucosio e del suo *uptake*. Per farlo, ci si è concentrati sull'attivazione del pathway delle Protein-Kinasi B (AKT), dal momento che la via riveste un ruolo molto importante di regolazione dell'entrata del glucosio all'interno delle cellule adipose, sia basale che dipendente da insulina (Cignarelli et al., 2019). Le cellule sono state trattate con una concentrazione di CNTF pari a 1nM per diversi periodi di tempo, in un range compreso tra i 10 minuti e le 48 ore (trattamenti acuti e a lungo termine). Al termine del trattamento con CNTF si è quantificata, grazie a

esperimenti di Western blotting, la concentrazione di AKT attivata, in particolare andando a ricercare un sito, la Serina 473, che viene fosforilata quando AKT si attiva. In un solo caso il risultato ha mostrato una significativa fosforilazione della serina, ovvero con il trattamento di 20 minuti (acuto), evidenziando la potenzialità del CNTF di attivare in acuto il pAKT basale (**Figura 4.2.1**). In tutti gli altri casi, qui non riportati, l'effetto non era abbastanza elevato da giustificare un coinvolgimento diretto del CNTF. Inoltre, per valutare se il CNTF sia in grado di attivare anche il pathway dell'AKT insulino-dipendente, sono stati condotti ulteriori esperimenti eseguendo un co-trattamento CNTF 1nM e Insulina 100nM per 20 minuti. Al termine dei trattamenti le cellule sono state lisate e le proteine sottoposte a Western blotting. Al termine dei trattamenti le cellule sono state lisate e gli estratti proteici totali sono stati sottoposti all'analisi di Western blotting. I risultati hanno evidenziato l'attivazione del pathway di AKT nel co-trattamento CNTF e Insulina (**Figura 10**).

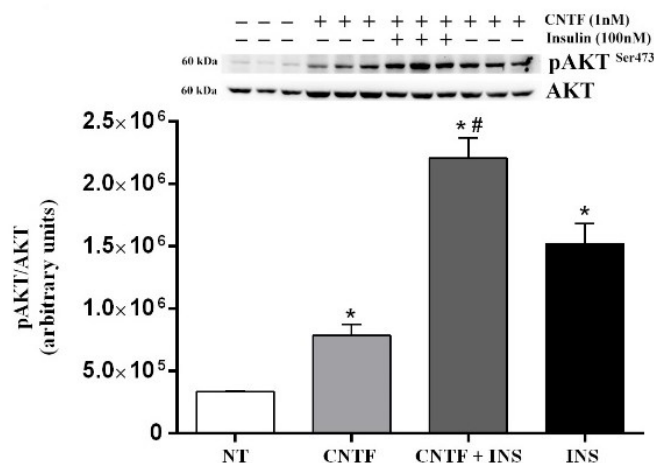


Figura 10 | Variazione della fosforilazione di AKT (Ser473). NT: non trattato, CNTF: CNTF 1 nM, CNTF+INS: CNTF + Insulina (100 nM) e INS: Insulina 100 nM. I trattamenti sono durati 20 minuti. Risultato normalizzato per AKT basale, riportato in unità arbitrarie.

L'attivazione di AKT scaturita dal co-trattamento è risultata significativamente maggiore rispetto agli effetti osservati trattando le cellule con CNTF o con insulina, suggerendo che il CNTF abbia svolto un ruolo di amplificatore dell'effetto mediato da insulina. Il dato ottenuto suggerisce quindi che il CNTF è in grado di rendere le cellule adipose più responsive all'azione dell'insulina, ipotizzando un ruolo per il CNTF come *insulin-sensitizer*.

Per approfondire l'effetto del CNTF sul metabolismo glucidico, le cellule adipose sono state trattate con CNTF (1nM) per 24h e 48h e 20 minuti prima della lisi, le cellule sono state trattate con insulina 100nM. In questo caso, solo il trattamento CNTF 24h seguito da 20 minuti di insulina ha determinato

un aumento significativo della fosforilazione di AKT rispetto alla condizione con insulina soltanto (**Figura 11**).

Vista la capacità del CNTF di influenzare la via di *signaling* di AKT, ed il fatto che la via stessa è coinvolta nella regolazione dell'*uptake* del glucosio, sono stati condotti nuovi esperimenti sugli adipociti, al fine di valutare se il CNTF sia in grado di promuovere l'ingresso di glucosio nelle hMADS. L'esperimento di *uptake* è stato eseguito utilizzando la sonda 2-nitrobenzodeossiglucosio (2-NBDG), ossia un analogo del glucosio fluorescente che fornisce una stima dell'incorporazione del glucosio

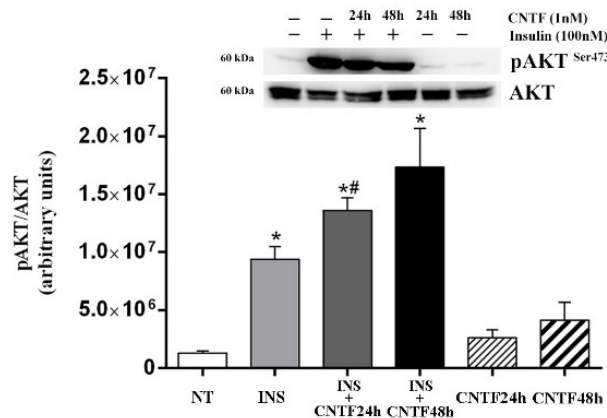


Figura 11 | Variazione nell'attivazione di AKT in seguito a pretrattamenti di durata variabile (24h, 48h) con CNTF. Prima delle lisi, le cellule sono state incubate con insulina per 10 min. CNTF24h e CNTF48h: condizioni di controllo nelle quali non è stata aggiunta insulina per valutare il pAKT basale.

all'interno della cellula mediante misurazione della fluorescenza emessa dal campione. Le cellule hMADS differenziate sono state trattate con CNTF

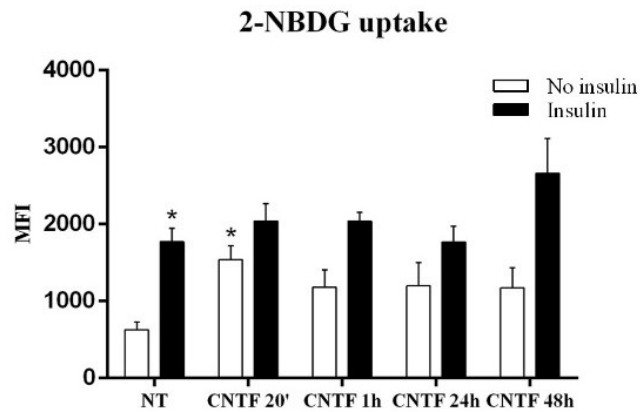


Figura 12 | Variazione dell'uptake di 2-NBDG (2-nitrobenzodeossiglucosio, riportato come intensità media di fluorescenza (MFI). Le hMADS differenziate in adipociti sono state trattate solamente con CNTF 1 nM (barre bianche) oppure anche con insulina 100 nM per 10' (barre nere). I dati derivano dalla media di 3 esperimenti indipendenti e sono stati confrontati con i non trattati (NT).

1nM per tempi diversi (20', 1h, 24h e 48h) in presenza o in assenza di insulina (100nM). Il risultato ha mostrato che il CNTF è in grado di indurre un aumento dell'uptake del glucosio basale (in assenza di insulina), in maniera significativa dopo 20 minuti di trattamento. L'insulina (100 nM), aggiunta al termine del trattamento con CNTF e lasciata ad incubare per 10', prima di aggiungere 2-NBDG, ha indotto aumenti di uptake in tutti i periodi di trattamento, tuttavia non in maniera significativa rispetto alla condizione con solo insulina (**Figura 12**).

Capitolo quinto

Discussione e Prospettive Future

5.1. *Discussione*

Il CNTF appartiene ad una famiglia di citochine che riconoscono un recettore comune, la glicoproteina 130 (gp130). Tra queste, oltre al CNTF, si annoverano l'Interleuchina-6 (IL-6), l'Oncostatina M (OsM), la *Cardiotrophin-1* e il *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF). La caratteristica che le accomuna tutte è il legame ad un recettore intermedio, denominato α , che favorisce l'interazione indiretta del ligando con il recettore gp130 β . Queste citochine, modulando vari pathway cellulari, partecipano alla regolazione di vari processi biologici come l'ematopoiesi, il rimodellamento della matrice ossea, l'infiammazione e il differenziamento di cellule staminali in cellule nervose. Diversi autori hanno inoltre rimarcato l'importante ruolo che queste citochine rivestono anche nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico (Pasquin S. et al., 2016; Lambert PD. et al., 2001). Tra queste, in virtù delle sue documentate proprietà anti-obesogene, il CNTF ha riscosso il maggiore interesse, perché capace di indurre effetti anti-obesità in modelli

animali (Lambert PD. et al., 2001; Anderson et al., 2003; Gloaguen et al., 1997) e in pazienti leptino-resistenti (Ettinger et al., 2003).

Col presente studio, vengono per la prima volta osservati alcuni effetti del CNTF sulla regolazione del metabolismo glucidico e lipidico, in un modello di cellule adipose umane, le hMADS, considerate come modello cellulare appropriato per studiare il metabolismo della cellula adiposa. Inoltre, le hMADS esprimono il recettore CNTFR α (Perugini et al., 2019), a differenza della linea cellulare murina 3T3-L1 utilizzata in studi precedenti (Zvonic et al., 2003), che le rende indistintamente un modello ottimale per studiare in vitro l'azione metabolica del CNTF sulle cellule adipose.

Dai risultati ottenuti è emerso che il trattamento cronico con il CNTF (per 24h e 48h) aumenta l'espressione degli enzimi lipolitici ATGL e HSL, e inibisce l'espressione degli enzimi SREBP-1 e FAS, che sono entrambi coinvolti nella sintesi de novo di acidi grassi a partire da substrati non lipidici. I dati sono in linea con i risultati precedentemente ottenuti da altri autori su cellule 3T3-L1 (Zvonic et al., 2003; Crowe S. et al., 2008). Il potenziale ruolo del CNTF di indurre la lipolisi è stato ulteriormente confermato nelle hMADS differenziate misurando il contenuto lipidico intracitoplasmatico mediante colorazione *Oil Red O* ed infine con il saggio lipolitico quantificando gli acidi grassi liberi (FFA) rilasciati nel terreno di

coltura. Infatti, il trattamento con CNTF per 48h determina un aumento significativo degli acidi grassi liberi nel mezzo di coltura, dimostrando che il CNTF ha un effetto significativo nel metabolismo dei trigliceridi, spostandone l'equilibrio verso il consumo di lipidi, al fine di produrre energia.

Insieme, questi dati confermano che trattamenti a lungo termine con CNTF portano ad un'inibizione dell'espressione dei marcatori di lipogenesi e, contemporaneamente, ad un aumento dell'attività degli enzimi lipolitici, favorendo quindi un ridotto accumulo di riserve energetiche in forma lipidica ed una maggiore spesa energetica nel tessuto adiposo. In accordo con quanto appena affermato, il CNTF potrebbe rivelarsi quindi in grado di migliorare il quadro di disfunzione del metabolismo lipidico dell'adipocita riscontrabile in condizioni di obesità promuovendo di conseguenza un miglioramento del metabolismo basale e un incremento della spesa energetica.

Nel presente studio abbiamo inoltre valutato le azioni del CNTF sul metabolismo glucidico. Il trattamento acuto (20 minuti) con CNTF 1nM decreta nelle hMADS differenziate un aumento significativo dell'attivazione della via di *signaling* AKT, mediante fosforilazione di quest'ultima. Come è noto, tale pathway è strettamente correlato al fenomeno della traslocazione del GLUT4 dal citosol alla membrana plasmatica (Cignarelli A. et al., 2019),

suggerendo che il CNTF stimoli l'*uptake* del glucosio tramite questa via. Infatti, il trattamento acuto con CNTF induce un incremento significativo dell'*uptake* basale del glucosio valutato con la sonda *2-NBDG*, un analogo fluorescente del glucosio. Inoltre, allo stesso *time point* il CNTF è in grado di promuovere la fosforilazione dell'AKT in modo insulino-dipendente. Infine, il trattamento a lungo termine con il CNTF e insulina determina un'attivazione del pAKT insulino-dipendente, anche se non in maniera significativa.

In definitiva, questi dati dimostrano che il CNTF ha effetti sul metabolismo glucidico, in particolare determina l'*uptake* di glucosio (probabilmente tramite l'attivazione della via di *signaling* AKT), sia in condizioni basali che insulino-dipendenti, migliorando la risposta insulinica delle cellule adipose umane. I dati ottenuti sono in linea con la letteratura scientifica, visto che il CNTF svolge il ruolo appena descritto anche negli epatociti (Sleeman et al., 2003) e nelle fibre muscolari (Watt et al., 2006; Steinberg et al., 2009), mentre negli adipociti 3T3-L1 il CNTF aumenta l'espressione del GLUT4 e del recettore dell'*insulin receptor substrate-1*, IRS-1 (Zvonic et al., 2003).

Concludendo, i dati ottenuti da questo studio mostrano la capacità del CNTF di convertire il fenotipo delle cellule adipose umane in un fenotipo più pronò al consumo energetico che non allo stoccaggio delle riserve lipidiche, e ad

un miglioramento della sensibilità delle cellule all'insulina. Con l'approfondimento dei meccanismi molecolari attraverso i quali tali effetti si manifestano sarà possibile in futuro pensare al CNTF come un nuovo target terapeutico nella cura dell'obesità e tutte le comorbidità ad essa associate.

Capitolo sesto

Bibliografia

Adler R, Landa, KB, Manthorpe M, Varon S. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* (1979). 204:1434–1436.

Anderson KD, Lambert PD, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Activation of the hypothalamic arcuate nucleus predicts the anorectic actions of ciliary neurotrophic factor and leptin in intact and gold thioglucose-lesioned mice. *J Neuroendocrinol* (2003). 15: 649-660.

Bauer S, Kerr BJ, Patterson PH. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci* (2007). 8:221-232.

Bazan JF. Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* (1991). 7, 197-208.

Bezaire V, Mairal A, Ribet C. Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lypolysis in hMADS adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2009). 3:284.

Cernkovich ER, Deng J, Bond MC, Combs TP, Harp JB. Adipose-specific disruption of signal transducer and activator of transcription 3 increases body weight and adiposity. *Endocrinology*. (2008) 149:1581–90.

Chen X, Mao Z, Liu S. Dedifferentiation of adult human myoblasts induced by ciliary neurotrophic factor in vitro. *Mol. Biol. Cell*. (2005) 16:3140–3151.

Cignarelli A, Genchi VA, Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Giorgino F. Insulin and insulin receptors in adipose tissue development. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:E759.

Cron L., Allen T., Febbraio M.A. The role of gp130 receptor cytokines in the regulation of metabolic homeostasis. *Journal of Experimental Biology* (2016) 219:265.

Crowe S, Turpin SM, Ke F, Kemp BE, Watt MJ. Metabolic remodeling in adipocytes promotes ciliary neurotrophic factor-mediated fat loss in obesity. *Endocrinology.* (2008) 149:2546–56.

Cui MX, Yang LN, Wang XX, Wang L, Li RL, Han W, et al. Alleviative effect of ciliary neurotrophic factor analogue on high fat-induced hepatic steatosis is partially independent of the central regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* (2017) 44:395–402.

Dallner C, Woods AG, Deller T, Kirsch M, Hofmann HD (2002) “CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. “*Glia* 37: 374-378.

Derecka M, Gornicka A, Koralov SB, Morgan M, Raje V, Sisler J, Zhang Q, Otero D, Cichy J, Rajewsky K, Shimoda K, Poli V, Strobi B, Pellegrini S, Harris TE, Seale P, Russell AP, McAinch AJ, O’Brien PE, Keller SR, Croniger CM, Kordula T, Larner AC. Tyk2 and Stat3 regulate brown adipose tissue differentiation and obesity. *Cell Metab* (2012) 16(6):814-24.

Ettinger MP, Littlejohn TW, Schwartz SL, Weiss SR, McIlwain HH, Heymsfield SB. Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA* (2003) 289:1826-1832.

Gloaguen I, Costa P, Demartis A, Lazzaro D, Di Marco A, Graziani R. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1997) 94:6456–61.

Grötzinger J, Kernebeck T, Kallen KJ. IL-6 Type Cytokine Receptor Complexes: Hexamer, Tetramer or Both? *Biological chemistry* (2005) 380:803-813.

Guilett C, Auguste P, Mayo W. Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J. Neurosci*. (1999) 19:1257-1262.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* (2003) 374:1-20.

Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hjarunguru A. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptinresistant obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98: 4652-4657.

Lee MY, Deller T, Kirsch M, Frotscher M, Hofmann HD. Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *J Neurosci* (1997) 17:113746.

MacLennan AJ, Neitzel KL, Devlin BK, Garcia J, Hauptman GA, Gloaguen I. In vivo localization and characterization of functional ciliary neurotrophic factor receptors which utilize JAK-STAT signaling. *Neuroscience* (2000) 99: 761-772.

Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* (1993) 365:27-32.

Matthews, V.B., Febbraio M.A. CNTF: a target therapeutic for obesity-related metabolic disease? *J. Mol. Med.* (2008) 86, 353- 361.

Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann. Neurology* (1996) 39: 256-260.

Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol.* (1996) 39:256–60.

Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Klein HH, Klein J. Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis. *J Endocrinol* (2002) 173:R1-R8.

Pasquin S, Sharma M, Gauchat JF. Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism. *Cytokine.* (2016) 82:122–24.

Perugini J, Di Mercurio E, Tossetta G, Severi I, Monaco F, Reguzzoni M, Tomasetti M, Dani C, Cinti S, Giordano A. Biological effects of Ciliary Neurotrophic Factor on hMADS adipocytes. *Front. Endocrinol.* (2019) 10:768

Rezende LF, Viera AS, Negro A. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) signals through STAT3-SOCS3 pathway and protects rat pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis. *Cytokine* (2009) 46:65-71.

Richard AJ, Stephens JM. The role of JAK-STAT signaling in adipose tissue function. *Biochim Biophys Acta.* (2014) 1842:431–9.

Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* (2005) 87:125-128.

Rodriguez AM, Elabd C, Dellteil F. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications* (2004) 315:255-263.

Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med.* (2005) 201:1397–405.

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* (2000) 14:1293–307.

Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhard P, Matthews V, Grotzinger J, Rose-John S, Kallen KJ. Signalling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited: the interleukin-6 (IL-6) receptor can serve as an α -receptor for CNTF. *J Biol Chem* (2003) 278:9528–9535.

Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* (1990) 345:440-441.

Senzacqua M, Severi I, Perugini J, Acciarini S, Cinti S, Giordano A. Action of Administered Ciliary Neurotrophic Factor on the Mouse Dorsal Vagal Complex. *Frontiers in Neuroscience* (2016). 10.103389/fnins.2016.00289.

Severi I, Carradori MR, Lorenzi T, Amici A, Cinti S, Giordano A (2012). Constitutive expression of ciliary neurotrophic factor in mouse hypothalamus. *Journal of Anatomy* (2012) Volume 220, Issue 6.

Severi I, Perugini J, Mondini E, Smorlesi A, Frontini A, Cinti S, Giordano A. Opposite effects of a high-fat diet and calorie restriction on ciliary neurotrophic factor signaling in the mouse hypothalamus. *Front Neurosci.* (2013) 7:263.

Severi I, Senzacqua M, Mondini E, Fazioli F, Cinti S, Giordano A. Activation of transcription factors STAT1 and STAT5 in the mouse

median eminence after systemic ciliary neurotrophic factor administration. *Brain Res* (2015) 1622:217-29.

Shi S.Y., Zhang, W., Luk, C.T. JAK2 promotes brown adipose tissue function and is required for diet- and cold-induced thermogenesis in mice. *Diabetologia* (2016) 59: 187.

Simi A, and Ibanez CF. Assembly and activation of neurotrophic factor receptor complexes. *Dev Neurobiol.* (2010) 70, 523–531.

Simi A, Ibanez CF. Assembly and activation of neurotrophic factor receptor complexes. *Dev Neurobiol.* (2010) 70:523–31.

Sleeman MW, D Anderson K, Lambert PD. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFRa. *Pharm. Acta Helvet.* (2000) 74:265–272.

Sleeman MW, Garcia K, Liu R, Murray JD. Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100:14297-14302.

Steinberg GR, Watt MJ, Ernst M, Birnbaum MJ, Kemp BE, Jørgensen SB. Ciliary neurotrophic factor stimulates muscle glucose uptake by a PI3-kinase-dependent pathway that is impaired with obesity. *Diabetes.* (2009) 58:829–39.

Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2015) 16:678–89.

Watt MJ, Dzamko N, Thomas WG, Rose-John S, Ernst M, Carling D. CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med* (2006) 12:541-548.

Wunderlich CM, Hövelmeyer N, Wunderlich FT. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT.* (2013) 2:e23878.

Zuck PA, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 4279–4295.

Zvonic S, Cornelius P, Stewart WC, Mynatt RL, Stephens JM. The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. *J Biol Chem* (2003) 278:2228-2235.