

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XXIII

Relazione 2° anno

TITOLO:

**Meccanismi di protezione dalla steatoepatite: ruolo e meccanismi
citoprotettivi dell'adenosina contro la lipoapoptosi degli epatociti**

Candidato: Imarisio Chiara

***Tutor:* Prof.ssa Carini Rita**

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

INDICE

INTRODUZIONE	3
Il danno da steatosi nel fegato.....	3
Lipoapoptosi, fase ultima e distruttiva della Lipotossicità'	7
c-jun-NH ₂ -terminal Chinasi (JNK)	10
Mitogen-activated protein kinase 4 (MKK4).....	12
Il preconditionamento protegge il fegato steatosico dal danno da ischemia-riperfusione	14
SCOPO DEL LAVORO	16
MATERIALI E METODI	17
Materiali	17
Cellule.....	17
Isolamento degli epatociti.....	17
Trattamento con Acidi grassi liberi	18
Trattamento degli epatociti di ratto e delle HTC.....	19
Valutazione dell'apoptosi.....	20
Analisi dello stato di fosforilazione delle chinasi SAPK/JNK e MKK4/SEK1	20
Analisi dei dati	21
RISULTATI	22
La stimolazione del recettore A _{2a} R dell'adenosina protegge dalla morte apoptotica indotta da acidi grassi liberi	22
Mediatori molecolari implicati nella prevenzione della lipoapoptosi indotta da CGS21680.....	27
Il trattamento con CGS21680 protegge dalla lipoapoptosi indotta da acidi grassi liberi in seguito a conservazione a freddo	30
Studio dei mediatori molecolari coinvolti nella lipoapoptosi indotta da acidi grassi liberi in seguito a conservazione a freddo	35
DISCUSSIONE	37
BIBLIOGRAFIA.....	39
SEMINARI 2008-2009	43
ATTIVITÀ FORMATIVA.....	46
Secondo anno.....	46
CORSI FREQUENTATI:.....	46
Secondo anno.....	46
CONGRESSI FREQUENTATI:.....	46
Secondo anno.....	46
Primo anno.....	47
PUBBLICAZIONI:	47
Articoli:	47
Secondo anno.....	47
Primo anno.....	47
Abstract:	48
Secondo anno.....	48
Primo anno.....	48

INTRODUZIONE

Il danno da steatosi nel fegato

La steatosi epatica (SE) o “fegato grasso” è dovuta ad un accumulo di grasso, in particolare sottoforma di trigliceridi, all’interno delle cellule del tessuto epatico; un paziente è affetto da steatosi epatica quando il grasso del fegato supera del 5% il peso totale dell’organo(1).

Si conoscono due tipi diversi di SE: una macrovescicolare caratterizzata da grosse gocce di grasso che rigonfiano le cellule epatiche spostando il nucleo alla periferia della cellula, come negli adipociti e una microvescicolare dovuta all’accumulo di piccole gocce di grasso nelle cellule, che sembrano così schiumose e con nuclei centrali.

Nei Paesi Occidentali la degenerazione grassa rappresenta la principale alterazione del fegato nella popolazione generale affetta sempre di più da obesità e soggetta allo sviluppo di malattie metaboliche quali il diabete mellito di tipo 2, l’ipertensione e la sindrome metabolica (X-syndrome) correlata ad insulino resistenza (IR).

In particolare, si è visto che steatosi ed IR sono strettamente associate, anche se non è ancora stato definitivamente chiarito quale delle due sia rispetto all’altra il *primum movens* (2). Una delle ipotesi più accreditate spiega che l’IR, agendo a livello periferico sugli adipociti, è in grado di aumentare il rilascio in circolo di acidi grassi liberi (Free Fatty Acids, FFAs) a causa di una mancata opposta azione antilipolitica dell’insulina, portando il fegato ad un incontrollato up-take di FFAs seguito da un esagerato accumulo di TG. In più, un’aumentata *de novo* lipogenesi epatica, dovuta ad iperinsulinemia, fa sì che la capacità del fegato di esportare VLDL e di provvedere al metabolismo degli FFAs tramite β -ossidazione non sia più sufficienti a controbilanciare l’eccessivo accumulo di grassi negli epatociti, causando così non solo steatosi ma creando la condizione *sine qua non* per lo sviluppo dell’epatopatia steatosica non alcolica (NAFLD) (1,3, 4, 5) .

La NAFLD è attualmente la più comune forma di malattia cronica del fegato che affligge indistintamente adulti e bambini negli Stati Uniti ed in molte altre parti del mondo sviluppato (6). La NAFLD descrive un ampio spettro di quadri clinici che vanno dalla steatosi semplice macrovescicolare alla steatoepatite, steatonecrosi fino alla steatoepatite non alcolica (NASH), con grave alterazione o perdita della funzionalità epatica per la comparsa di fibrosi e cirrosi (7).

Ad oggi è certo che i pazienti affetti da NASH sono un sottogruppo di pazienti precedentemente affetti da NAFLD (1,8, 9,10), quello che però non è ancora chiaro è come e cosa comporti l'evoluzione della malattia dal primo stadio al successivo e perché non tutti i pazienti affetti da NAFLD evolvono in NASH.

Nel 1998 Day e James hanno proposto il modello "two hits" per cercare di spiegare lo sviluppo della NAFLD e la sua successiva degenerazione in NASH (11). Il "first hit" è sempre stato identificato con l'accumulo lipidico epatico, mentre il "second hit", allora descritto in maniera generica come fattore responsabile della comparsa di infiammazione (12), oggi è rappresentato da numerosi fattori quali; stress ossidativo, perossidazione lipidica, endotossine batteriche, cattivo funzionamento delle cellule di Kupffer e presenza del ligando Fas, tutti fattori causa di infiammazione, necessaria per lo sviluppo della NASH (13).

Il termine NASH è stato coniato per la prima volta nel 1980 da Ludwig per descrivere le caratteristiche istopatologiche tipiche di un fegato appartenente ad un soggetto alcolizzato, cioè affetto da epatopatia alcolica (ALD), ma al contrario riscontrate in un gruppo di pazienti non soggetti ad abuso di alcohol (14).

Anche un importante studio di Matteoni et al. del 1999 riporta che la NASH e la ALD presentano caratteristiche istologiche molto simili, quali: steatosi macrovescicolare unita ad infiammazione per infiltrazione cellulare dei lobuli, epatociti "ballooning", cioè a palloncino e necrosi, nonché la presenza dei corpi di Mallory, di fibrosi perisinusoidale e cirrosi (7).

A livello molecolare però i meccanismi sottesi al danno epatico in caso di NASH sono diversi da quelli della ALD ed un loro attento studio può permettere di distinguere senza confondere queste due forme di danno epatico.

Innanzitutto, i pazienti affetti da NASH hanno i mitocondri alterati sia dal punto di vista funzionale sia morfologico perché questi organelli sono i principali bersagli dell'IR e dell'eccesso di FFAs.

Un'aumentata ossidazione di FFAs nei mitocondri, perossisomi e microsomi determina un'iperattivazione delle isoforme CYP2E1 e CYP4A10/4A14 dell'enzima CYP450 con un corrispondente aumento della produzione di ROS e disaccoppiamento della catena respiratoria dei mitocondri, con comparsa dei marker plasmatici tipici dello stress ossidativo.

Tra le citochine infiammatorie, il $TNF\alpha$ contribuisce al danno mitocondriale in maniera indiretta facendo incrementare la produzione di reactive nitrogen species (RNS) che inattivano le proteine della catena respiratoria mitocondriale con conseguente danno al DNA.

Infine, la patogenesi della NASH causa una profonda alterazione nel normale profilo dell'espressione genica epatica modificando fattori di trascrizione come l'Sp1 e l'Sp3 responsabili della fibrogenesi e la proteina prodotta del gene C/EBP β che regola la sintesi lipidica. Il fattore di trascrizione Nrf-1 è un nuovo gene preso ultimamente in considerazione per la sua capacità di controllare l'espressione dei geni antiossidanti (1).

Il principale meccanismo molecolare che però più di tutti permette la certa distinzione tra ALD e NASH è l'Apoptosi.

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è una forma di morte cellulare altamente regolata che riveste un ruolo fondamentale nelle malattie epatiche. Brevemente, gli epatociti possono andare incontro ad apoptosi sia attraverso la via estrinseca sia attraverso la via intrinseca. La via estrinseca è attivata nell'ambiente extracellulare dall'interazione tra i ligandi $TNF\alpha$, Fas e TRAIL ed i loro rispettivi recettori di morte, mentre a livello intracellulare dalla formazione del complesso di segnale indotto da morte (DISC) che controlla la caspasi regolatrice 8. La via intrinseca è invece attivata da numerosi tipi di stress intracellulare tra cui fattori termici, ipossici e citotossici come citochine, radicali liberi dell'ossigeno (15).

Una volta innescato il pathway apoptotico, avviene la permeabilizzazione mitocondriale con fuoriscita nel citosol del citocromo c ed attivazione delle caspasi effettrici 3 e 7 fondamentali per conferire alla cellula l'aspetto morfologico tipico della morte apoptotica: addensamento e riduzione della cromatina (pyknosis), frammentazione nucleare (karyorrhexis) e successiva formazione dei "corpi apoptotici" (Councilman bodies) destinati alla fagocitosi dei macrofagi per essere degradati nei loro lisosomi (10, 15).

Come descritto in un importante studio di Feldstein et al. del 2003, analisi TUNEL eseguite su sezioni di fegato prelevate da pazienti con NASH hanno rivelato un incremento dell'apoptosi due volte maggiore rispetto a quanto riscontrato nelle sezioni di fegato prelevate da pazienti affetti da ALD. Lo stesso studio ha inoltre rivelato che maggiore è la presenza di apoptosi tanto più grave è la forma di NASH da cui il soggetto è affetto (9). Questo lavoro ha quindi definito la NASH come una malattia proapoptotica che, proprio

tramite la morte programmata, progredisce nella sua gravità fino alla definitiva perdita di funzione dell'organo.

Dopo questo studio numerose ricerche hanno confermato questo primo risultato. Tali studi non hanno tuttavia sfruttato le nuove informazioni per sviluppare un test non invasivo alternativo alla biopsia epatica, che è rimasta l'unica tecnica invasiva in grado di distinguere la NASH dalla semplice steatosi e di definirne lo stato di gravità (16).

Un passo avanti per lo sviluppo di test non invasivi è stato fatto dopo la messa a punto di un saggio sierologico disegnato per misurare in maniera specifica un nuovo marker epiteliale delle cellule epatiche apoptotiche, il frammento sierico M30 della citocheratina18. Tale saggio si è rivelato in grado di distinguere con esattezza ed in maniera non invasiva i pazienti affetti da NASH da quelli con ALD (16).

L'apoptosi è quindi sempre di più riconosciuta come il "second hit" necessario allo sviluppo e progressione della NASH (16).

Lipoapoptosi, fase ultima e distruttiva della Lipotossicità

In condizioni di obesità si ha un accumulo continuo ed eccessivo di trigliceridi (TG) a livello del tessuto adiposo. Normalmente, i TG possono essere conservati anche nel tessuto non adiposo come muscolo, pancreas cuore e fegato. L'obesità è una condizione in grado di aumentare in maniera eccessiva il contenuto di TG anche in questi organi danneggiando le loro cellule ed alterandone le funzioni fino a farle morire, tale processo è conosciuto con il nome di lipotossicità (3, 5).

Il fegato affetto da NASH risente fortemente del processo lipotossico responsabile in massima parte della morte cellulare apoptotica che colpisce gli epatociti e tale morte è indicata in letteratura con il nome di Lipoapoptosi.

La lipoapoptosi è stata descritta per la prima volta in uno studio che aveva come oggetto di analisi le isole pancreatiche di ratti ZDF (17); da allora, il termine lipoapoptosi è entrato comunemente in uso per definire le forme di apoptosi non familiari causate da un elevatissimo accumulo di FFAs nei tessuti non adiposi (18).

Gli FFAs rappresentano l'esigua frazione libera della famiglia degli acidi grassi presenti nell'organismo che in parte derivano dalla dieta, cioè dalle sostanze grasse, in prevalenza trigliceridi, che introduciamo con gli alimenti (olio, burro, carni, formaggi, ecc.) e in parte sintetizzati dall'organismo. La biosintesi avviene principalmente a livello del tessuto epatico e, in misura minore, in alcuni tessuti extraepatici (sistema nervoso centrale, piastrine, neutrofili, miociti), dove sono incorporati con legame esterico o amidico nelle varie classi lipidiche (principalmente trigliceridi, fosfolipidi, esteri del colesterolo, sfingolipidi, cere, alcoli alifatici, ecc.) che si formano nel metabolismo lipidico.

Chimicamente sono catene acidiche lineari, monocarboniose, di lunghezza variabile; tali catene acicliche contengono generalmente un numero pari di atomi di carbonio, sebbene acidi a catena dispari siano presenti in natura. Gli FFAs Possono essere saturi (nessun doppio legame) o insaturi (con uno o più doppi legami).

La classificazione in base alla lunghezza ed al grado di insaturazione sembra essere la più utile per schematizzare la relativa funzione biologica nell'ambito dell'organismo.

Si distinguono: (a) acidi grassi a corta catena (SCFA) fino a 4 atomi di carbonio di cui il principale è l'acido butirrico (4:0) il cui ruolo trofico e protettivo a livello della mucosa del

colon è di rilevante importanza; (b) acidi grassi a catena media (MCFA) fino a 12 atomi di carbonio con funzione metabolica ed energetica (acido caproico 6:0, acido caprilico 8:0, acido caprico 10:0, acido laurico 12:0); (c) acidi grassi a lunga catena (LCFA) fino a 18 atomi di carbonio con un ruolo energetico, metabolico e strutturale a loro volta classificabili in: (c1) LCFA saturi (acido miristico 14:0, acido palmitico 16:0, acido stearico 18:0) di cui fanno parte sia i trigliceridi di deposito sia i componenti strutturali di membrana; (c2) LCFA monoinsaturi (acido oleico 18:1 ω -9) con funzione ipocolesterolemizzante; (c3) LCFA polinsaturi che sono essenziali (acido linoleico 18:2 ω -6 e acido linolenico 18:3 ω -3); (d) acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA) da 20 atomi di carbonio in poi (ω -3, ω -6, ω -9) e loro derivati prostaglandine, trombossani e leucotrieni.

In letteratura vi è una gran quantità di lavori che dimostrano il ruolo fondamentale degli FFAs nello sviluppo della steatosi epatica (4).

Gli FFAs sono idrofobici e possono diffondere in maniera passiva attraverso la membrana plasmatica degli epatociti oppure essere introdotti dalle proteine trasportatrici di acidi grassi (FATP) o dal trasportatore di acidi grassi CD36. In particolare, gli epatociti esprimono in maniera specifica la proteina integrale di membrana FATP5, preposta all'entrata nella cellula degli FFAs a lunga catena, mentre nel citosol è presente la proteina capace di legare FFAs (FABP), senza la quale è stato dimostrato che gli epatociti sono protetti dall'accumulo eccessivo di TG indotto da grassi saturi (4).

Gli FFAs a lunga catena (16 carboni o più) sono presenti in circolo in quantità elevata in pazienti affetti da NAFLD (5) e tra i più abbondanti e più studiati per la loro capacità di indurre apoptosi epatica troviamo l'acido palmitico e stearico per la classe degli acidi grassi saturi, e l'oleico e il palmitoleico per la classe dei monoinsaturi, mentre gli acidi grassi polinsaturi non vengono presi in considerazione perché non vi è alcuna particolare evidenza che li possa classificare come agenti apoptotici (4, 10). A tale proposito, numerosi dati suggeriscono che gli FFAs saturi sono quelli maggiormente implicati nel danno epatico (4).

Negli epatociti, gli acidi grassi saturi si rivelano citotossici per la loro capacità di attivare la via intrinseca dell'apoptosi che, tramite la proteina proapoptotica Bax, determina il rilascio del citocromo c e l'attivazione delle caspasi 3 e 7. La regolazione di Bax negli epatociti si è visto essere regolata in particolare da una MAP chinasi sensibile allo stress intracellulare, la c-jun-N-terminal Chinasi (JNK) (10).

JNK è noto rivestire un ruolo importante in entrambi gli "hits" causa di NAFLD e NASH(12). Nel "first hit", un aumento dell'attività di JNK può promuovere l'IR correlata alla steatosi epatica, mentre nel "second hit" la sua attivazione contribuisce alla cronicizzazione dell'infiammazione necessaria allo sviluppo della NASH. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che la delezione genetica delle 2 isoforme della JNK presenti nel fegato (JNK 1, 2) attenua la steatosi epatica in modelli animali (12).

Questi dati sottolineano l'importanza di approfondire le conoscenze sul ruolo che la JNK riveste nello sviluppo della NAFLD, affinché diventi a tutti gli effetti un target cellulare per lo sviluppo di farmaci efficaci per una futura terapia (12).

c-jun-NH₂-terminal Chinasi (JNK)

La c-jun-NH₂-terminal Chinasi (JNK), conosciuta anche come chinasi attivata dallo stress (SAPK), appartiene alla famiglia di proteine Serina-Treonina chinasi intracellulari attivate da stimoli mitogeni (MAP) e coinvolte nella regolazione di processi quali proliferazione, differenziamento ed apoptosi cellulare.

Esistono 3 diversi geni codificanti per le tre diverse isoforme di JNK (JNK1,2,3). Le isoforme 1 e 2 sono espresse in maniera ubiquitaria, mentre JNK3 è espressa solo nel cervello, cuore e testicoli (19). Ciascuna delle 3 isoforme può a sua volta essere soggetta a splicing alternativo che ne aumenta la variabilità. Ogni JNK è espressa in una forma corta (46KDa) ed una lunga (54KDa). Ognuna delle 3 isoforme differisce nella sua capacità di legare e fosforilare substrati diversi (19) ed, a seconda della natura dello stimolo ricevuto, regola motilità, metabolismo o riparo del DNA. E' stato inoltre evidenziato che se la JNK è attivata in maniera transiente ha un effetto citoprotettivo mentre se attivata in maniera continua è responsabile di morte cellulare (20).

Informazioni più dettagliate sulle funzioni che la JNK ha all'interno della cellula sono state ottenute in seguito alla determinazione della sua struttura atomica (21).

Nel suo complesso, la JNK ha una struttura tridimensionale simile alle altre MAPK. Tale struttura è costituita dai due domini NH₂ e -COOH terminali che racchiudono all'interno il sito attivo. Una significativa differenza tra JNK e le altre MAPK è data dal fatto che il sito responsabile del legame con l'ATP è finemente regolato a livello strutturale nel passaggio dalla forma attiva a quella inattiva. Quando la JNK è inattiva, il sito attivo contenente specifici residui aminoacidici necessari per il corretto legame dell'ATP è mascherato dall'Activation-Loop (T-Loop), che blocca l'accesso dei substrati al sito attivo stesso (22). Al contrario, quando fattori di crescita, stress o citochine attivano una cascata di segnalamento che inizia con una MAP3K che fosforila ed attiva a sua volta 2 isoforme distinte di una MAP2K, MKK4 e MKK7, si verifica l'attivazione di JNK (22/23).

L'attivazione della SAPK/JNK richiede una doppia fosforilazione nel motivo Thr-Pro-Tyr conservato nell'Activation-Loop da parte di SEK1/MKK4 ed MKK7 a livello dei residui Tyr185 e Thr183 rispettivamente. Si pensa che questa doppia fosforilazione alteri la

struttura del T-Loop permettendo un cambiamento conformazionale della proteina tale da rendere raggiungibile e funzionale il sito attivo (22)

Il principale bersaglio d'azione della JNK è c-jun, una delle due subunità del fattore di trascrizione eterodimerico activator protein-1 (AP-1). JNK fosforila c-jun ai residui NH₂-terminali Ser63 e 73 in risposta ad irradiazioni UV o a stimoli di stress (19, 22). Oltre ad essere in grado di regolare l'espressione genica, JNK è anche in grado di fosforilare e regolare altre proteine coinvolte nel pathway apoptotico (15). Per esempio, JNK media la fosforilazione del fattore antiapoptotico Bcl-2 inattivandolo e promuovendo l'apoptosi. In modelli cellulari epatici trattati con FFAs saturi, JNK media l'attivazione di Bax promuovendo apoptosi (15).

Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)

Come accennato nel paragrafo precedente, affinché la JNK possa essere efficacemente attivata è necessaria una doppia fosforilazione da parte delle chinasi MKK4 e MKK7.

Diversi studi hanno dimostrato che tra le due isoforme quella maggiormente espressa nel fegato è MKK4, già a partire dal 12° embrionic day (E12), in quanto coinvolta nella regolazione dello sviluppo embrionale del fegato, mentre i livelli di MKK7 rimangono sempre molto bassi (24,25).

MKK4, conosciuta anche come JNKK1, è stata per la prima volta clonata nel 1994 in topo e denominata Stress-Activated Protein Kinase (SEK1). Successivamente questo enzima è stato clonato nell'uomo e denominato appunto MKK4 (24,25).

MKK4 è una proteina di 399Aa localizzata sul Chr 17. L'analisi della struttura cristallizzata ha rivelato che le MKK sono formate da un piccolo foglietto β all'N-terminale ed un'ampia α -elica all'estremità C-terminale. Il dominio chinamico (KD) di tutte le 7 isoforme della famiglia delle MKK è formato, come tutte le altre Ser/Thr chinasi, da 11 sottodomini ed il sito di legame dell'ATP è localizzato tra le due estremità -NH₂ -COOH terminali (25).

Nel dominio chinamico (KD) di MKK4 è conservato il motivo S-I-A-K-T localizzato tra i sottodomini VII e VIII, in cui avviene da parte delle chinasi MKKK la doppia fosforilazione nei residui Ser257 e Thr261, che, se mutati, ne aboliscono l'attività(24).

Tra le varie MKKK che regolano l'attività di MKK4 quelle più importanti sono MEKKs, Mixed Linkage Kinases (MLKs), TAK1 e ASK1 (24), che legano MKK4 al dominio DVD al suo C-terminale (25).

In particolare, nel caso di MKK4, è stato studiato che la cascata di attivazione prevede un'interazione fisica tra le chinasi coinvolte. MEKK1 interagisce con MKK4 inattiva formando il complesso MEKK1-MKK4 che permette la fosforilazione di MKK4 e lo scioglimento del complesso stesso. MKK4 ora attiva e libera nel citosol interagisce in maniera specifica con JNK fosforilandola anche qui attraverso la formazione di un complesso reso possibile dal legame tra il D-domain (D) all' N-terminale di MKK4 con JNK che, quando si scioglie, permette a JNK attiva di agire sui suoi substrati più a valle (26).

MKK4 è in grado di attivare direttamente tramite fosforilazione tutte e tre le isoforme di JNK in seguito a numerosi segnali di stress (quali irradiazioni UV, heat shock protein, shock osmotico, citochine pro-infiammatorie, stress genotossico e calore) (25,27).

Uno studio del 2000 di Park et al. (27) volto ad approfondire ed identificare nuovi target cellulari del fattore di sopravvivenza Akt ha dimostrato che la chinasi Akt riveste il ruolo di regolatore negativo di MKK4.

E' infatti emerso che Akt interagisce con MKK4/SEK1 fosforilandola a livello di una specifica Ser, la numero 80, che si trova nel dominio D all'N-terminale. Questa fosforilazione ha un'azione inibitoria sulla cascata di segnale regolata da MKK4/SEK1, perché proprio a livello della Ser80 avviene il legame fisico e quindi la formazione del complesso tra SEK1 e JNK. La fosforilazione compiuta da Akt non permette più tale interazione, annullando la capacità di SEK1 di attivare JNK (27).

Il preconditionamento protegge il fegato steatosico dal danno da ischemia-riperfusion

Il blocco prolungato della perfusione ematica del fegato seguito da riperfusione è causa di danno epatico da ischemia riperfusione (I/R). Tale danno si può dunque produrre durante le procedure di chirurgia epatica maggiore come la resezione ed il trapianto di fegato (28). Nonostante negli ultimi anni vi sia stata una crescente disponibilità di organi destinati al trapianto, le elevate richieste costringono delle volte a ricorrere a compromessi non sempre vantaggiosi per la riuscita dell'intervento. Una scelta molto comune è per esempio l'uso di organi steatosici che risultano essere molto suscettibili al danno da I/R.

Tra le ipotesi formulate per spiegare perché i fegati steatosici siano più sensibili al danno da I/R, quelle più accreditate risultano l'induzione della perossidazione lipidica, l'infiltrazione di neutrofili, le alterazioni del microcircolo e rilascio del TNF α dalle cellule di Kupffer (28,29).

La scoperta che l'esposizione dei tessuti ad una breve I/R protegge dal danno indotto da una successiva I/R prolungata, ha rivelato l'esistenza di sistemi endogeni di citoprotezione in grado di prevenire lo sviluppo del danno cellulare irreversibile. Questo fenomeno, conosciuto con il nome di preconditionamento ischemico (PC ischemico), è stato per la prima volta descritto da Murry nel cuore, e successivamente documentato in altri organi come, il cervello, l'intestino e il fegato (30).

Il preconditionamento epatico, una breve interruzione (5-10 minuti) del flusso ematico al fegato seguita da 10-15 minuti di riperfusione, è stato eseguito per la prima volta su fegati di topi e ratti dimostrando la sua capacità di ridurre il danno epatico indotto da una successiva esposizione ad un periodo prolungato di ischemia seguita da riperfusione (31).

Nel nostro laboratorio, utilizzando come modello cellulare preconditionato epatociti di fegato di ratto preconditionati con una breve ipossia-riossigenazione, in studi precedenti abbiamo iniziato la caratterizzazione dei meccanismi e dei mediatori intracellulari responsabili del preconditionamento epatico (32).

In particolare abbiamo visto che l'adenosina è il principale induttore degli effetti epatoprotettivi del preconditionamento epatico, perché, in seguito al suo rilascio indotto da una breve ipossia non letale (PC ipossico), attiva, successivamente all'interazione con i recettori A_{2a} (A_{2a}R) dell'adenosina, una cascata di mediatori intracellulari che aumentano

la resistenza degli epatociti al danno cellulare. Tali mediatori includono le proteine Gs, l'adenilato ciclasi, la PKA, le proteine Gi, la chinasi Src ed infine la fosfolipasi C e PI3K, che stimolano a loro volta l'attivazione di PKC ϵ/δ e p38 MAPK (33, 34).

Studi "in vivo" hanno dimostrato che l'effetto del preconditionamento epatico è particolarmente evidente nei fegati steatosici, dove la sua applicazione riduce della metà il rilascio di transaminasi e le evidenze istologiche di necrosi epatica (29).

I meccanismi implicati in tale effetto protettivo devono essere in gran parte ancora descritti. E' noto che l'eccessiva disponibilità di lipidi ed una ridotta azione da parte dell'insulina sono capaci di dare lipoapoptosi e favorire la progressione e lo sviluppo della gravità della NASH.

A tale proposito è interessante sottolineare che l'insulina insieme ad altri fattori di crescita è in grado di regolare vie di segnalamento PI3K ed Akt dipendenti che promuovono la sopravvivenza cellulare (35).

Un altro importante fattore di rischio per un fegato steatosico, oltre al danno da I/R, è la preservazione degli organi, passaggio a volte obbligato in caso di trapianto (36).

Per la conservazione e preservazione del fegato, il metodo maggiormente usato è quello della conservazione a freddo (CIT).

Nel 1988 Belzer e collaboratori idearono una soluzione che venne poi ampiamente usata in clinica nel trapianto di fegato, la cosiddetta Soluzione di Belzer o Soluzione dell'Università del Wisconsin (UW Solution).

Ad oggi, la soluzione di preservazione intracellulare UW è ritenuta il *gold standard* tra le varie soluzioni di mantenimento in commercio (HTK, Celsior ecc.) poiché è in grado di prevenire la comparsa di edema e lo sviluppo di acidosi negli epatociti durante il periodo di ischemia fredda. Inoltre essa riduce il danno da I/R impedendo la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (37). Tuttavia i fegati steatosici non beneficiano come i fegati normali di questi effetti citoprotettivi e le cause di ciò sono ancora oggetto di studio.

SCOPO DEL LAVORO

In questo progetto proponiamo di studiare la capacità dell'agonista dei recettori $A_{2a}R$, il CGS21680, di prevenire la lipoapoptosi indotta dal trattamento di epatociti primari di ratto ed HTC con acidi grassi liberi ed i meccanismi molecolari coinvolti.

MATERIALI E METODI

Materiali

Le sostanze chimiche utilizzate sono state ottenute dalle seguenti ditte: Collagenasi (Tipo I), N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-athanesulfonic acid) HEPES, terreno DMEM 5671, DMEM HAM-F12, tripsina, desametasone, propidio ioduro, RNase A, gentamicina, penicillina, streptomina, CGS21680, Wortmanina (Wrt) ed SP600125 sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Il Percoll è stato acquistato dalla GE-HELTCARE (Uppsala, Svizzera). La soluzione di preservazione d'organo utilizzata è la ViaSpan Bristol-Myers Squibb S.L. (Garden City, NY).

Cellule

In questo lavoro sono state usate cellule in linea di epatoma di ratto HTC ottenute dalla Collezione Europea di colture Cellulari, coltivate in terreno DMEM-HAM F12 al 10% di siero fetale bovino, all'1% di penicillina/streptomina ed all'1% di glutammina ed epatociti primari di ratto isolati da fegato e coltivati in terreno DMEM-HAM F12 al 10% di siero fetale bovino, all'1% di penicillina/streptomina ed all'1% di glutammina.

Isolamento degli epatociti

Gli epatociti primari sono stati isolati da fegato di ratti maschi di ceppo Wistar con peso corporeo di 250-300gr (Harlan Italy S.Pietro al Natisone (UD), Italia), utilizzando la tecnica della perfusione "in situ" con collagenasi. L'uso e cura degli animali sono stati approvati dal Ministro Italiano della Salute e dalla Commissione Università per la Cura degli Animali rispettando le direttive del Consiglio Nazionale della Ricerca Italiana.

I ratti sono stati anestetizzati iniettando intraperitonealmente una soluzione di pentotal sodico (50mg/Kg di peso corporeo) alla quale è stata aggiunta eparina (37mg/Kg di peso corporeo). Agli animali è stata aperta la cavità addominale ed è stata incanalata la vena porta. Il fegato è stato perfuso per 10 minuti con il tampone salino T1 (NaCl 143mM, KCl

7mM ed Hepes 10 mM a pH 7.4) mantenuto a 37°C, con un flusso costante di 7.5 unità di pressione grazie all'utilizzo di una pompa peristaltica LKB Bromma 2115.

Dopo questa prima fase di lavaggio del fegato, l'organo è stato perfuso con 200ml di tampone salino T2 (NaCl 100mM, KCl 40mM, CaCl₂ 5 mM, la collagenasi di tipo I 0.05%, tampone Hepes-NaOH 500mM, pH 7.4), anch'esso mantenuto a 37°C, con un flusso costante di 4 unità di pressione

Il fegato così digerito è stato rimosso dall'animale e risospeso in 50ml di terreno DMEM5671 e gli epatociti sono stati purificati attraverso tre centrifugate da 5 minuti l'una a 500rpm, seguite da un'ultima centrifugata a 1050 rpm su gradiente di Percoll.

Dopo questo procedimento è stato effettuato il conteggio delle cellule utilizzando una camera Burker ed è stata valutata la vitalità cellulare attraverso la conta al microscopio degli epatociti sfruttando il test di esclusione del Blu Tripano.

Dopo il conteggio la sospensione cellulare viene portata ad una concentrazione di 1X10⁶ cellule/ml.

Trattamento con Acidi grassi liberi

L'acido Oleico (numero di catalogo O 1008) e l'acido Stearico (numero di catalogo S 4751) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). L'acido Oleico, commercialmente disponibile in forma liquida, è stato diluito in isopropanolo per ottenere aliquote ad una concentrazione di 40mM.

L'acido Stearico è stato sciolto in isopropanolo per ottenere aliquote ad una concentrazione di 40mM.

Sono stati eseguiti due tipi diversi di trattamenti steatosici, uno a caldo ed uno sottoposto a preservazione a freddo:

1. epatociti di ratto ed HTC sono stati trattati rispettivamente alla concentrazione finale di 25 e 200 uM con acido Stearico ed Oleico direttamente in terreno DMEM-HAM F12 privo di siero e lasciati in incubatore a 37°C per 8h;
2. epatociti di ratto ed HTC sono stati trattati rispettivamente alla concentrazione finale di 25 e 200 uM con acido Stearico direttamente in terreno DMEM-HAM F12 privo di siero ad una temperatura di 37°C per 4h. Alla fine dei trattamenti, le cellule sono state sottoposte ad una conservazione a freddo a 4°C per 16h. Al termine delle

16h, epatociti ed HTC sono stati nuovamente posti in terreno DMEM-HAM F12 privo di siero ad una temperatura di 37°C per essere sottoposti a riossigenazione.

Trattamento degli epatociti di ratto e delle HTC

Gli epatociti sono stati piastrati per sviluppare il modello cellulare di lipoapoptosi a caldo, mentre sono stati lasciati in sospensione nel modello cellulare di lipoapoptosi sottoposto ad ischemia a freddo.

Gli epatociti destinati al danno da lipoapoptosi a caldo sono stati inizialmente piastrati su piastre per adesione cellulare precedentemente trattate con collagene e lasciati in incubatore per 48h in terreno DMEM-HAM F12 con l'aggiunta del 10% di siero fetale bovino, dell'1% di penicillina/streptomina e dell'1% di glutammina.

Gli epatociti sono poi stati trattati con acido Stearico ed Oleico (25uM) da adesi in terreno DMEM-HAM F12 privo di siero per 8h al fine di indurre lipotossicità. Là dove richiesto è stato aggiunto CGS21680 (5uM), SP600125 (1uM) e Wortmannina (250nM) contemporaneamente o 1h dopo trattamento con A. Stearico.

Gli epatociti destinati al danno da lipoapoptosi a freddo sono stati lasciati in sospensione, e trattati con acido Stearico (25uM) in terreno DMEM-HAM F12 privo di siero a 37°C in bagnetto termostato. Alla fine del trattamento con acido Stearico, gli epatociti sono stati trattati con CGS21680 per 15minuti, oppure con gli inibitori SP600125 (1uM) e Wortmannina (250nM) sempre per 15 minuti.

A questo punto, gli epatociti sono stati centrifugati a 1000rpm per 1 minuto e risospesi alla concentrazione di 1 milione/ml nella soluzione di mantenimento Soluzione Belzer UW, ottenuta aggiungendo alla soluzione di mantenimento ViaSpan 16 mg/ml di desametasone. Ogni condizione è stata quindi sottoposta a conservazione a freddo per 16h. Successivamente gli epatociti sono stati nuovamente centrifugati 1 minuto a 1000rpm e risospesi in terreno DMEM-HAM F12 senza siero sempre alla concentrazione di 1 milione/ml e mantenuti in bagnetto termostato a 37°C per la riossigenazione.

Al contrario degli epatociti, le HTC sono sempre state trattate da adese alle stesse condizioni di quelle usate per gli epatociti primari, eccezion fatta per la molarità finale a cui sono stati usati l'Acido Stearico ed Oleico, sempre 200uM.

Valutazione dell'apoptosi

Gli epatociti di ratto e le HTC sono stati trattati con A.Stearico ed Oleico per 8h con l'aggiunta di CGS21680 (5 μ M) contemporaneamente o 1h dopo l'aggiunta degli acidi grassi liberi e degli inibitori chimici SP600125 (1 μ M) e Wrt (250nM). Alla fine delle 8h le cellule sono state staccate con tripsina.

Per l'analisi dell'apoptosi è stato usato il Kit Annessina-V-FLUOS (Roche, Basel, Svizzera). Brevemente, 2×10^5 cellule sono state lavate 2 volte con tampone fosfato salino (PBS1X) filtrato ed il pellet cellulare ottenuto è stato risospeso in 100 μ l di Annexin Incubation Buffer con successiva aggiunta di 2 μ l di Annexin-V-FLUOS più 2 μ l di PI 50 μ g/ml e lasciato incubare per 10 minuti a RT per poi essere analizzato al FACScan Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

I dati di ciascun esperimento sono stati analizzati usando il programma WINMDI.

Un altro test utilizzato per l'analisi dell'apoptosi è stata la determinazione della frammentazione del DNA.

Brevemente, 5×10^5 cellule sono state lavate con PBS 1X e poi risospese in una soluzione di etanolo al 70% freddo. Successivamente, le cellule sono state nuovamente lavate con PBS1X ed il pellet di ciascun campione è stato risospeso in 400 μ l di PBS1X con l'aggiunta di 50 μ l di RNase A e 10 μ l di PI (1mg/ml) e lasciati incubare per 1h a RT.

Il DNA cellulare di ogni campione è stato analizzato al FACScan Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

I dati di ciascun esperimento sono stati analizzati usando il programma WINMDI

Questi stessi saggi appena descritti sono stati compiuti anche quando epatociti ed HTC sono stati trattati con A. Stearico e sottoposti a conservazione a freddo.

Analisi dello stato di fosforilazione delle chinasi SAPK/JNK e MKK4/SEK1

Aliquote di 30 μ g di estratti cellulari totali sono state sottoposte a corsa elettroforetica su gel al 10% di SDS-poliacrilamide e trasferite su membrane di nitrocellulosa. Lo stato di fosforilazione di SAPK/JNK è stato valutato con l'anticorpo policlonale Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) usato 1:1000, mentre per valutare la quantità totale della proteina nella cellula è stato usato l'anticorpo policlonale SAPK/JNK (56G8) usato 1:1000.

Per valutare lo stato di fosforilazione di SEK1/MKK4 è stato utilizzato l'anticorpo policlonale Phospho-SEK1/MKK4 (Ser80) usato 1:1000 ed il suo contenuto totale nella cellula è stato rilevato con l'anticorpo SEK1/MKK4 usato 1:1000 (tutti gli anticorpi sono stati acquistati da Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA).

L'avvenuto legame tra anticorpo e proteina è stato rilevato utilizzando il Kit di immunorilevamento (ECL PLUS, Amersham, UK). L'intensità della banda relativa sia allo stato fosforilato sia al basale è stata misurata con videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come rapporto della forma fosforilata rispetto al basale.

Analisi dei dati

I dati sono stati espressi come medie \pm D.S..

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte.

RISULTATI

La stimolazione del recettore A_{2a}R dell'adenosina protegge dalla morte apoptotica indotta da acidi grassi liberi

In un recente studio, Malhi e coll. hanno messo a punto un modello di lipoapoptosi usando 2 linee cellulari di epatoma umano e una di carcinoma epatocellulare di ratto affiancate da una coltura di epatociti primari isolati da topo. Tutte le linee sono state trattate con due acidi grassi saturi, stearico e palmitico, e due monoinsaturi, oleico e palmitoleico.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che ciascun acido grasso utilizzato ha determinato l'insorgere di steatosi e che gli acidi grassi saturi come il palmitico e lo stearico sono più tossici dei monoinsaturi oleico e palmitoleico (10).

Basandomi su questi dati, ho iniziato questo progetto testando un acido grasso saturo, lo Stearico ed uno monoinsaturo, l'Oleico, sulla nostra linea cellulare di epatoma di ratto HTC.

L'acido Oleico è stato subito scartato perché dimostratosi eccessivamente citotossico, mentre l'acido Stearico, tollerato fino ad una concentrazione di 40 mMoli, è stato prescelto come iniziale agente eziologico di lipoapoptosi del nostro modello di studio.

Tramite saggi di citofluometria a flusso, abbiamo quindi verificato se l'acido Stearico fosse in grado di indurre lipoapoptosi nelle nostre HTC.

L'analisi apoptotica è stata eseguita utilizzando il kit dell' Annessina V per discriminare le cellule che espongono in membrana la fosfatidilserina, noto segnale di apoptosi.

Dati ottenuti da studi di Time Course hanno dimostrato che le HTC iniziavano ad andare in apoptosi a partire dalle 6h di incubazione con acido Stearico (200uM), con un aumento costante del segnale apoptotico fino alle 8h. Dalle 9h di trattamento in poi si è visto che il segnale apoptotico andava diminuendo lasciando spazio a quello necrotico, rilevato grazie all'emissione di segnale dovuto all'assunzione del propidio ioduro nel DNA (dati non mostrati).

Per valutare se l'agonista specifico degli A_{2a}R, il CGS21680, fosse in grado di proteggere dalla morte apoptotica indotta da acido Stearico, le HTC sono state trattate con CGS21680

(5 μ M) sia contemporaneamente alla somministrazione dell'acido Stearico sia un'ora dopo dalla sua aggiunta. Come è possibile osservare nella Figura 1, l'aggiunta di CGS21680 contemporaneamente o 1h dopo il trattamento steatosico protegge dalla morte apoptotica indotta da acido Stearico.

Poiché Malhi e coll. hanno mostrato che la lipoapoptosi degli epatociti murini è dipendente dall'attivazione della c-jun-NH₂-terminal kinase (JNK) (10), abbiamo valutato l'effetto del trattamento delle HTC con l'inibitore specifico della JNK, SP600125 (1 μ M). Come si può osservare dalla Figura 1, l'SP600125 risulta proteggere dalla morte apoptotica indotta da acido Stearico.

Come è emerso da nostri studi precedenti, l'attivazione dei recettori A_{2a}R da parte dell'adenosina conduce alla successiva attivazione di numerosi mediatori della sopravvivenza cellulare, tra i quali ha un ruolo centrale la PI3K. Abbiamo quindi voluto studiare se l'inibizione della PI3K fosse in grado di abolire gli effetti antiapoptotici del CGS21680.

Come mostra la Figura 1, il trattamento con Wrt (250nM) annulla la protezione data dal CGS21680 sia contemporaneamente sia dopo 1h dal trattamento con Stearico.

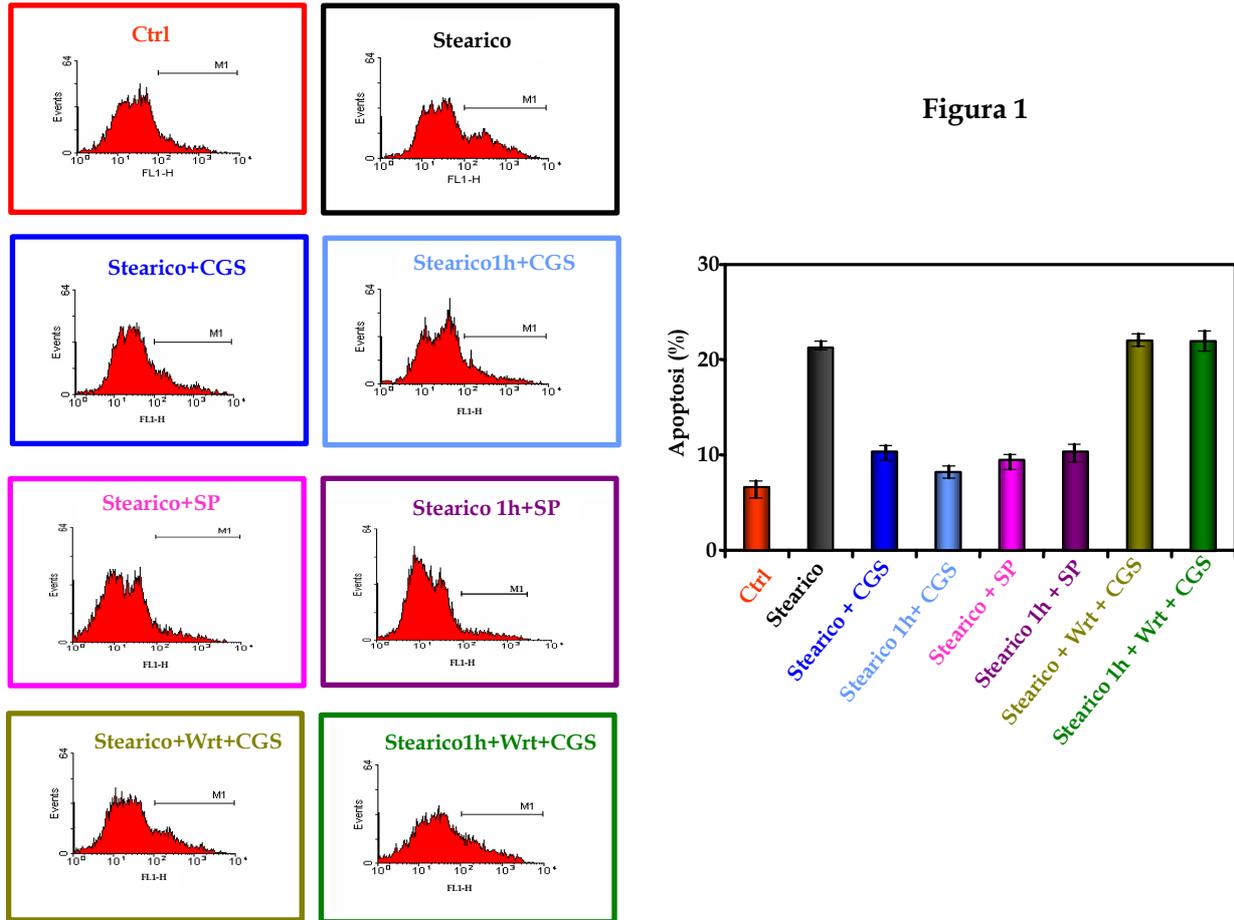


FIGURA 1: Morte apoptotica indotta da Acido Stearico nelle HTC: ruolo dei recettori A_2A dell'adenosina (A_2AR), di JNK e PI3K.

La morte apoptotica è stata indotta esponendo colture di HTC ad 8h di trattamento con Acido Stearico (200uM). Contemporaneamente o 1h dopo il trattamento con Acido Stearico sono stati aggiunti il CGS21680 (5uM) e gli inibitori SP600125 (1uM) e Wrt (250nM). Le cellule apoptotiche sono state rilevate in citofluometria a flusso in seguito ad incubazione con Annessina V-FITC e propidio ioduro. I risultati sono espressi come media \pm D.S. di 4 esperimenti differenti. La Figura 1 è un esperimento rappresentativo di 4.

Parallelamente agli studi con le HTC, abbiamo sviluppato un modello di lipoapoptosi anche impiegando epatociti primari di ratto. Con tale modello abbiamo investigato lo sviluppo di lipoapoptosi indotta da acido Stearico (25uM) valutando la comparsa di frammentazione del DNA.

L'analisi citofluorimetrica, come possiamo vedere in Figura 2, ha dimostrato che l'acido Stearico determina la comparsa del picco del DNA sub-diploide, confermando la morte degli epatociti per apoptosi, mentre il trattamento con CGS21680 (5uM) e SP600125 (1uM) protegge gli epatociti dalla morte apoptotica. In seguito a trattamento con Wrt (250nM) le

cellule diventano nuovamente positive all'analisi della frammentazione del DNA, annullando la protezione data dal CGS21680.

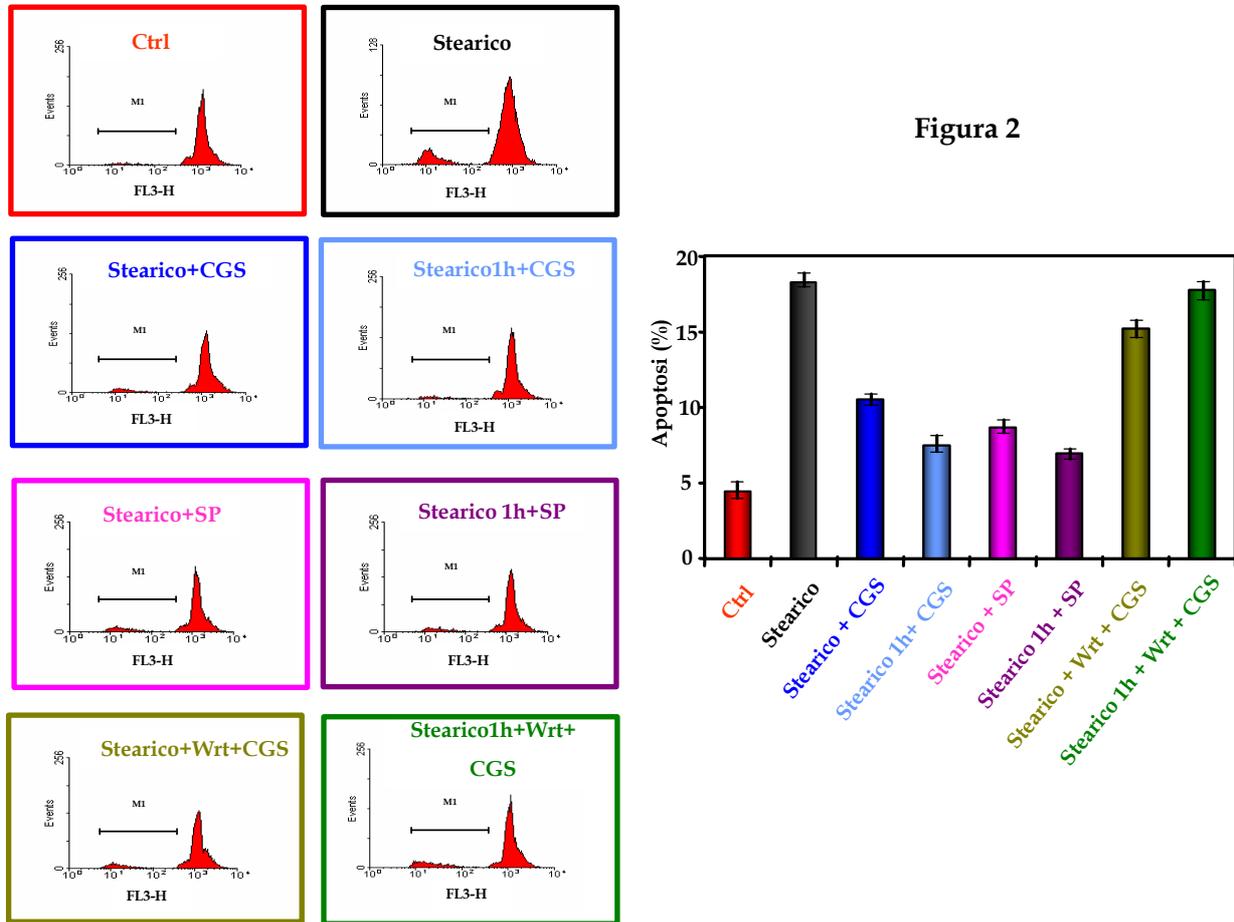


Figura 2

FIGURA 2: Morte apoptotica indotta da Acido Stearico negli epatociti: ruolo dei recettori A_2A dell'adenosina (A_2AR), di JNK e di PI3K.

La morte apoptotica è stata indotta esponendo colture di epatociti ad 8h di trattamento con Acido Stearico (25uM). Contemporaneamente o 1h dopo il trattamento con Acido Stearico sono stati aggiunti il CGS21680 (5uM) e gli inibitori SP600125 (1uM) e Wrt (250nM). Le cellule apoptotiche sono state rilevate in citofluometria a flusso sfruttando il test delle frammentazione del DNA, visibile per la presenza del picco sub-diploide. I risultati sono espressi come la media \pm D.S. di 3 esperimenti differenti. La Figura 2 è un esperimento rappresentativo di 3.

Il saggio di frammentazione del DNA è stato eseguito oltre che sugli epatociti primari anche sulle HTC. Anche in tali cellule in linea, come possiamo vedere in Figura 3, abbiamo confermato un andamento simile a quello riscontrato negli epatociti.

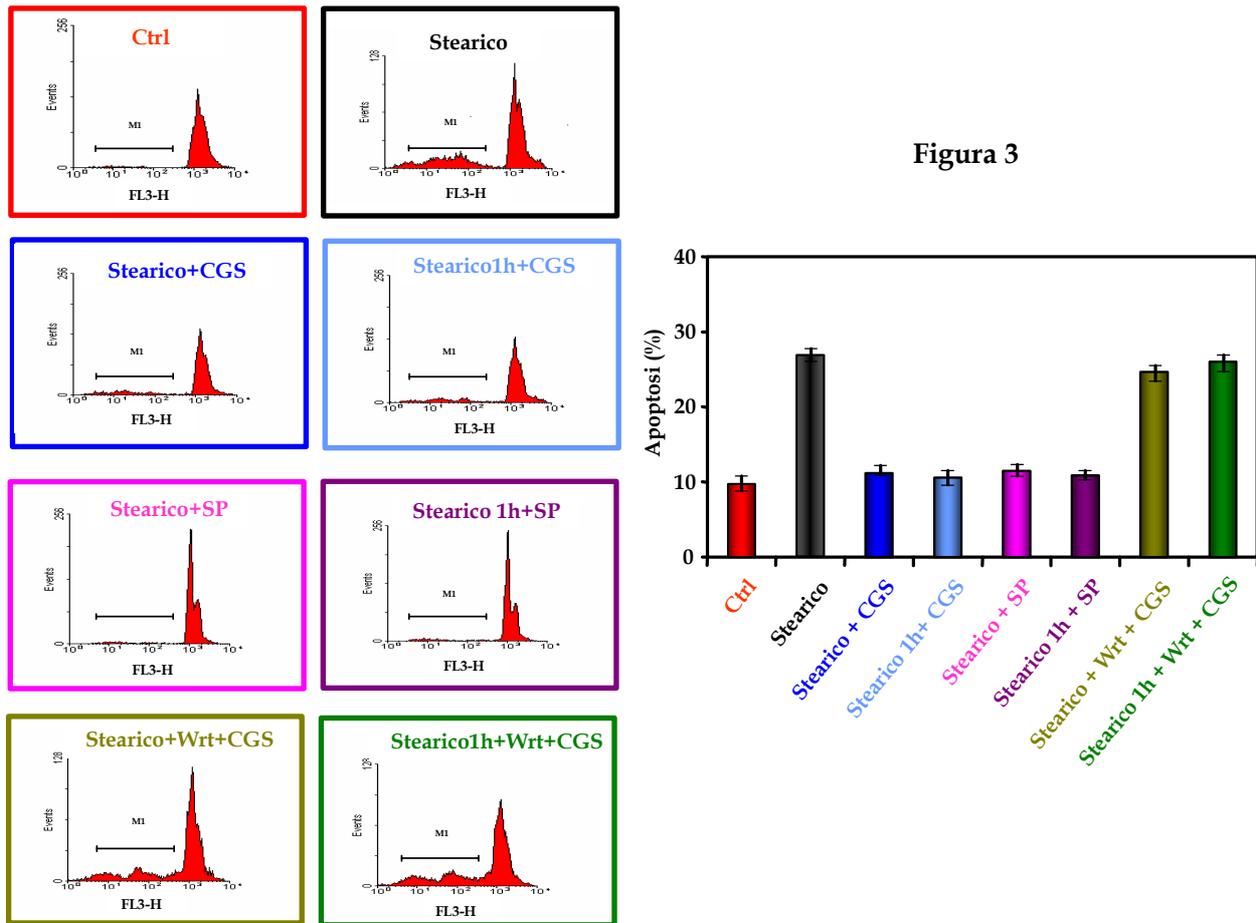


Figura 3

FIGURA 3: Morte apoptotica indotta da Acido Stearico nelle HTC: ruolo dei recettori A_2A dell'adenosina (A_2AR), di JNK e di PI3K.

La morte apoptotica è stata indotta esponendo colture di epatociti ad 8h di trattamento con Acido Stearico (200uM). Contemporaneamente o 1h dopo il trattamento con Acido Stearico sono stati aggiunti il CGS21680 (5uM) e gli inibitori SP600125 (1uM) e Wrt (250nM). Le cellule apoptotiche sono state rilevate sfruttando il test delle frammentazione del DNA, visibile per la presenza del picco sub-diploide. I risultati sono espressi come media \pm D.S. di 4 esperimenti differenti. La Figura 3 è un esperimento rappresentativo di 4.

Mediatori molecolari implicati nella prevenzione della lipoapoptosi indotta da CGS21680

Malhi e coll. hanno mostrato che la lipoapoptosi degli epatociti murini è dipendente dalla attivazione della c-jun-NH₂-terminal kinase (JNK). Come riportato nell'introduzione, è inoltre noto che la mitogen activated protein kinase kinase 4 (MKK4 o SEK1) è coinvolta nell'attivazione di JNK (24). Basandomi su tali osservazioni, ho eseguito analisi di Western Blot su estratti cellulari ottenuti da campioni di epatociti isolati da fegato di ratto ed HTC trattati con acido Stearico alla concentrazione finale di 25 e 200 uM rispettivamente, per valutare lo stato di fosforilazione della JNK e di SEK1.

Abbiamo osservato, come mostrato in Figura 4, che la forma fosforilata e quindi attivata di JNK aumenta in maniera evidente rispetto al controllo sia negli epatociti (Fig.4 A) sia nelle HTC (Fig.4 B) a partire dalle 4h di incubazione con A. Stearico. L'aggiunta del CGS21680 (5uM) contemporanea o dopo 1h di trattamento con Stearico abbassa fortemente la quantità di JNk attivata nella cellula.

Poiché l'attivazione dei recettori A_{2a}R da parte dell'adenosina o del loro agonista specifico CGS21680 conduce alla successiva stimolazione della PI3K e, a sua volta, la PI3K è stato mostrato essere coinvolta nella regolazione negativa della chinasi MKK4/SEK1, chinasi attivatoria di JNK posta a monte di quest'ultima (27), abbiamo voluto valutare se l'inibizione della PI3K fosse in grado di attivare la JNK tramite fosforilazione.

Come mostrato in Figura 4, l'inibitore della PI3K, Wrt (250nM), riporta il livello della fosforilazione di JNK alto, annullando l'effetto protettivo del CGS21680.

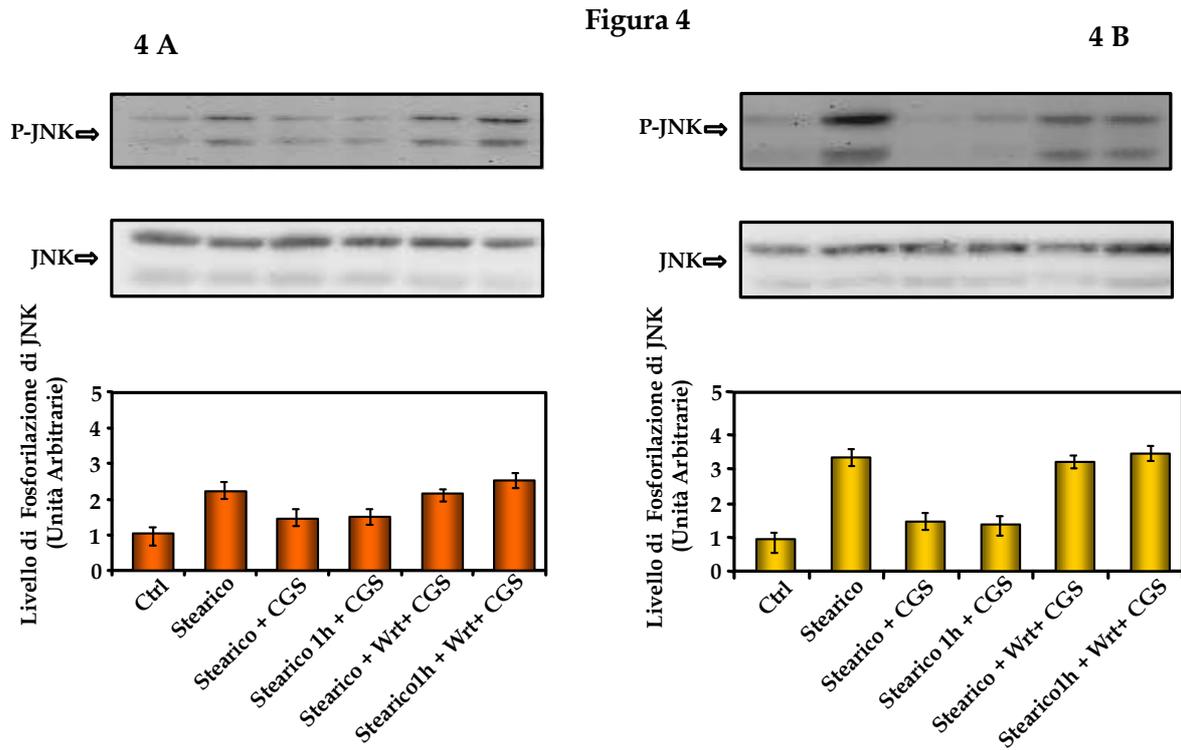


FIGURA 4: Attivazione di JNK in seguito a trattamento con Acido Stearico.

L'attivazione di JNK è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata della JNK su estratti di epatociti ed HTC controllo incubati per 4h con A.Stearico (25 e 200uM) previo o meno trattamento contemporaneo o successivo ad 1h di Stearico con CGS21680 (5uM) o Wortmannina (Wrt, 250nM). L'intensità relativa sia alla banda fosforilata sia a quella non fosforilata è stata misurata con videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come unità arbitrarie dopo normalizzazione al Controllo. Le Figure 4 A (epatociti) e 4B (HTC) sono un esperimento rappresentativo di 4.

Dopo aver confermato il coinvolgimento della MAP chinasi JNK nei nostri modelli cellulari di lipoapoptosi, siamo passati ad investigare il ruolo della chinasi MKK4/SEK1. Estratti cellulari di epatociti ed HTC trattati con acido Stearico alla concentrazione finale di 25 e 200 uMoli rispettivamente sono stati analizzati con analisi in Western Blot. Avendo dimostrato il coinvolgimento di PI3K nella regolazione di JNK ed essendo noto il ruolo di PI3K nell'indurre l'inibizione di SEK1 tramite fosforilazione in Ser80 (27), abbiamo analizzato la presenza di fosforilazione di SEK1 a livello della Ser80 posta nel suo

dominio D coinvolto nel legame attivatorio con la JNK. Come mostrato in Figura 5, l'acido Stearico non comporta un aumento dei livelli di fosforilazione in Ser80 di SEK1 rispetto al controllo sia negli epatociti (Fig. 5A) sia nelle HTC (Fig. 5B), mentre il CGS21680 (5uM), aumenta in maniera evidente la fosforilazione in Ser80 di SEK1 e tale effetto è inibito dalla Wrt (250nM).

Questo ci dice che il CGS21680 induce la fosforilazione inibitoria di SEK1 e che tale effetto è dovuto all'azione di PI3K/Akt. Oggetto dei prossimi studi sarà verificare la fosforilazione attivatoria in Ser257 e Thr261 di SEK1 da parte dell'acido Stearico, controllando l'eventuale effetto prodotto dal trattamento con CGS21680 su questo processo.

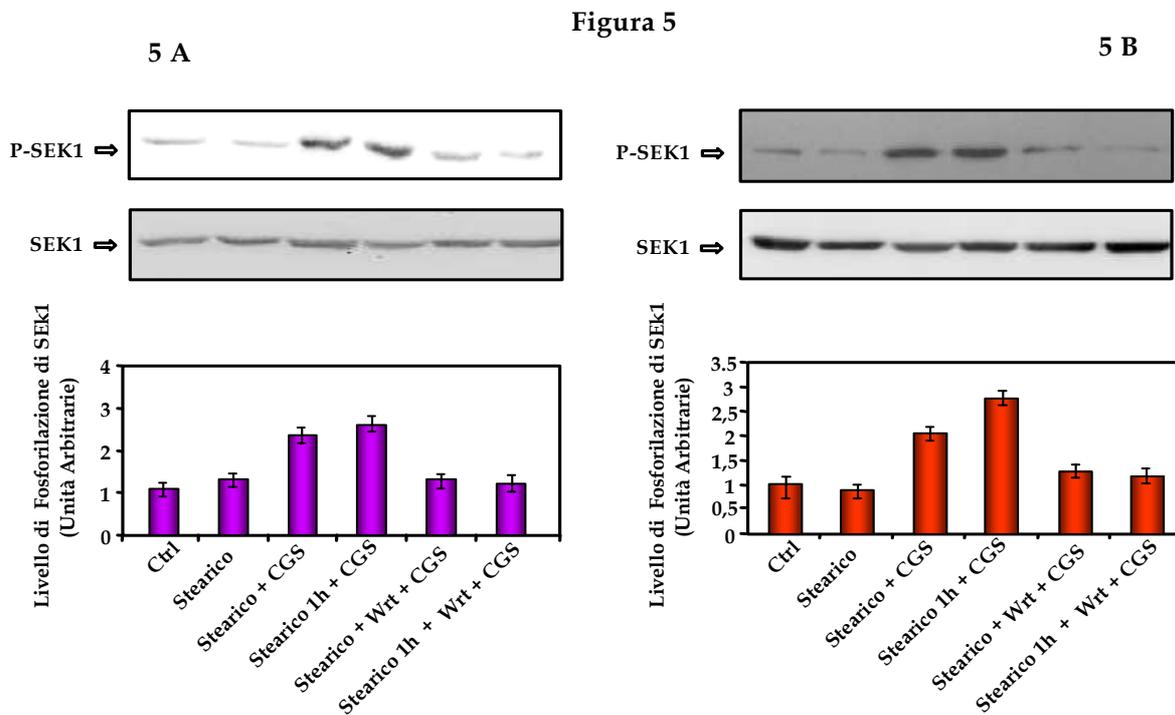


FIGURA 5: *Inibizione di SEK1 in seguito a fosforilazione in Ser80 dopo trattamento con CGS21680.*

L'inibizione di SEK1 è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata di SEK1 in Ser80 su estratti di epatociti ed HTC controllo incubati per 4h con A.Stearico (25 e 200uM) previo o meno trattamento contemporaneo o successivo ad 1h di Stearico con CGS21680 (5uM) o Wortmannina (Wrt, 250nM). L'intensità relativa sia alla banda fosforilata sia a quella non fosforilata è stata misurata con videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come unità arbitrarie dopo normalizzazione al Controllo. Le Figure 5 A (epatociti) e 5B (HTC) sono un esperimento rappresentativo di 4.

Il trattamento con CGS21680 protegge dalla lipoapoptosi indotta da acidi grassi liberi in seguito a conservazione a freddo

Epatociti isolati da fegato di ratto sono stati risospesi in terreno DMEM-HAM F12 senza siero alla concentrazione di 1 milione per ml e mantenuti ad una temperatura costante di 37°C in normossia e trattati con acido Stearico ad una concentrazione finale di 25µM.

E' stato poi aggiunto là dove richiesto il CGS21680 (5µM) e gli inibitori SP600125 (1µM) e Wrt (250nM) per 15 minuti. Alla fine dei 15 minuti gli epatociti sono stati risospesi nella soluzione di mantenimento Wisconsin ed incubati a 4°C per 16h.

Alla fine delle 16h sono stati nuovamente risospesi in terreno DMEM-HAM F12 privo di siero e sottoposti a riossigenazione.

A partire dal Tempo Zero di riossigenazione sono state fatte prese per l'analisi dell'apoptosi con l'uso del Kit Annessina-V-FLUOS. Come possiamo osservare dalla Figura 6, in particolare ad 1h di riossigenazione si ha un aumento evidente dell'apoptosi rispetto al controllo in seguito a trattamento con Stearico (25µM), mentre dove gli epatociti sono stati trattati con GCS21680 (5µM) o con l'inibitore della JNK SP600125 (1µM) si ha una forte protezione dalla morte apoptotica indotta da trattamento con acido Stearico. Se però trattiamo gli epatociti con l'inibitore della PI3K, Wrt (250nM), vediamo che si ha un nuovo aumento della morte apoptotica.

Figura 6

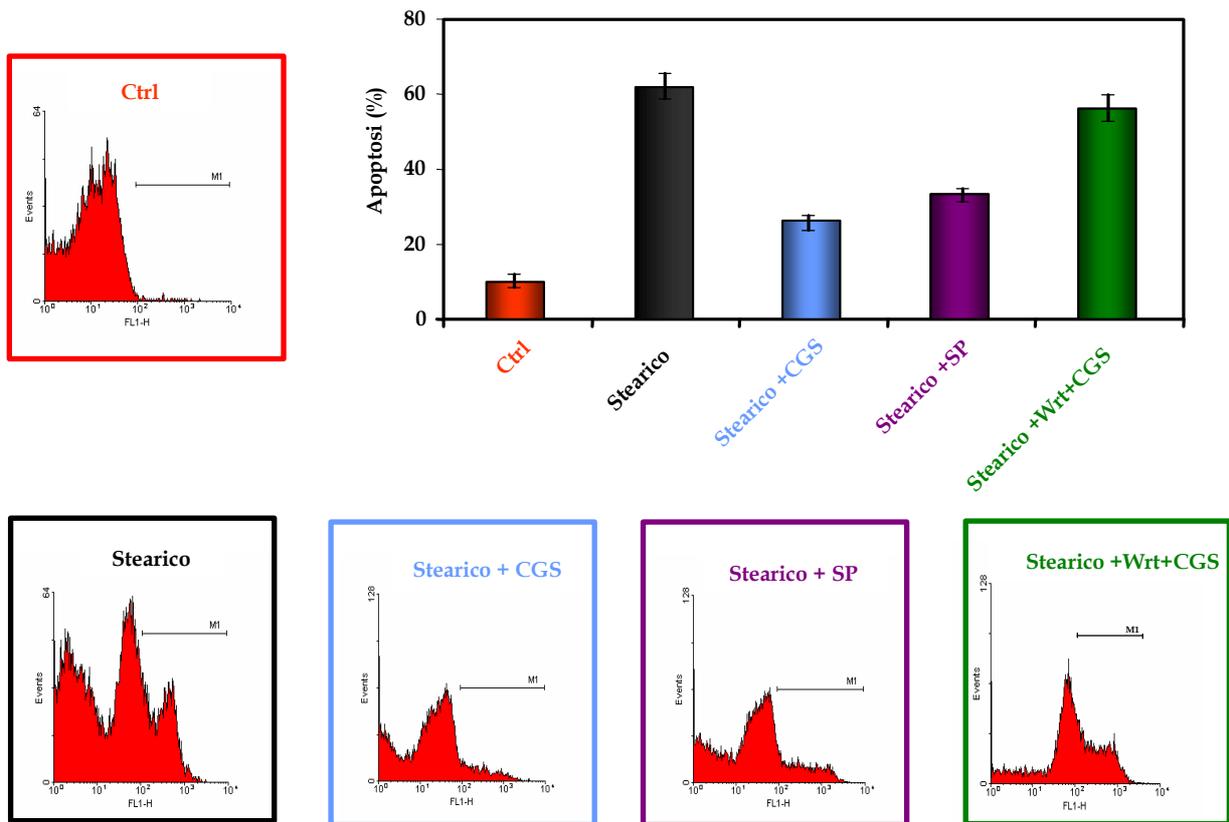


FIGURA 6: Morte apoptotica indotta da Acido Stearico in seguito ad ischemia fredda negli epatociti: ruolo dei recettori A_{2A} dell'adenosina (A₂AR), di JNK e di PI3K.

La morte apoptotica è stata indotta esponendo epatociti in sospensione alla concentrazione di 1 milione/ml a 4h di trattamento con Acido Stearico (25µM). Alla fine del trattamento con Acido Stearico sono stati aggiunti il CGS21680 (5µM) e gli inibitori SP600125 (1µM) e Wrt (250nM) per 15 minuti. Le cellule sono poi state sottoposte a conservazione a freddo nella soluzione di preservazione Wisconsin per 16h a 4°C. Alla fine delle 16h gli epatociti sono stati sottoposti a riossigenazione in terreno. Le cellule apoptotiche sono state analizzate in citofluometria a flusso in seguito ad incubazione con Annexina V-FITC e propidio ioduro ad 1h dalla riossigenazione. I risultati sono stati espressi come media ± D.S. di 3 esperimenti differenti. La Figura 6 è un esperimento rappresentativo di 3.

Come mostrato in Figura 7, la linea cellulare HTC mostra lo stesso andamento degli epatociti primari. Infatti il danno da conservazione a freddo seguita da 1h di riossigenazione comporta una marcata apoptosi nelle cellule trattate con acido Stearico (200µM) rispetto al controllo, mentre il preconditionamento con CGS21680 o l'inibizione della JNK con SP600125 proteggono in maniera evidente dalla lipoapoptosi. Anche in

questo caso, l'aggiunta di Wrt al CGS21680 annulla l'effetto protettivo del preconditionamento ed aumenta il segnale apoptotico.

Figura 7

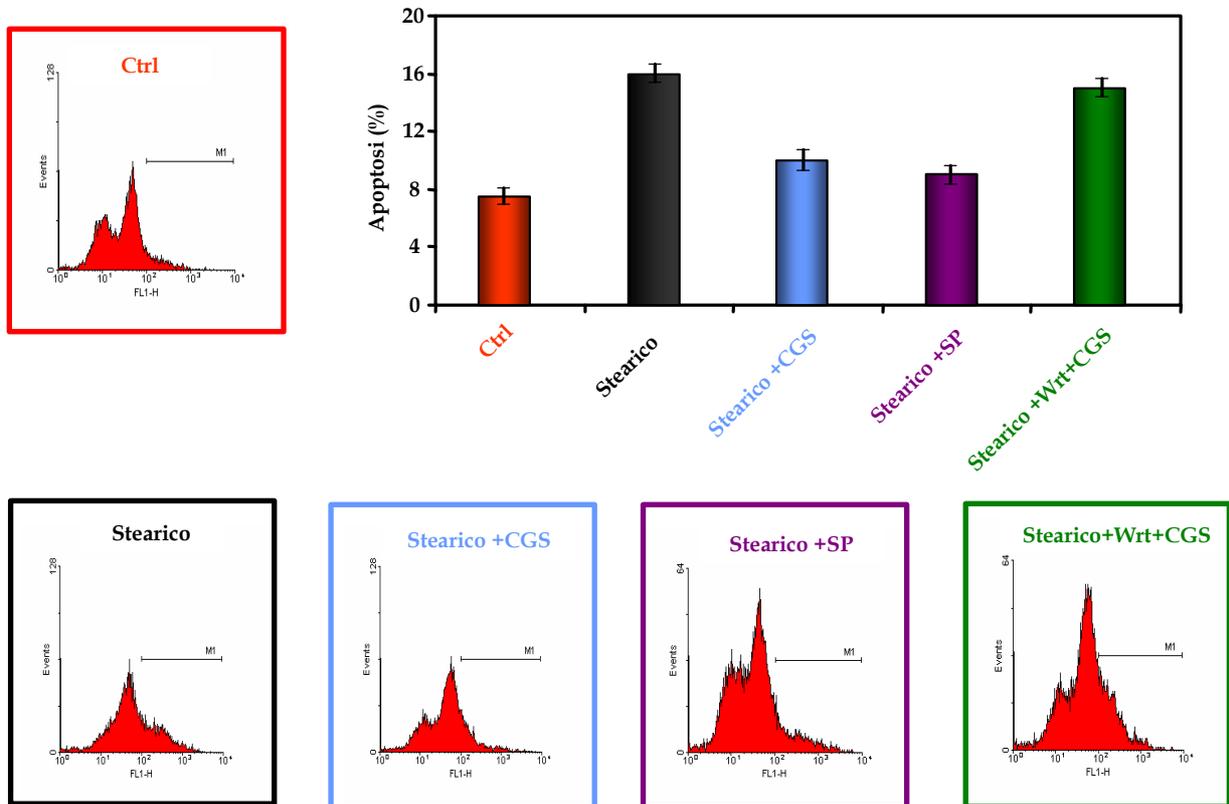


FIGURA 7: Morte apoptotica indotta da Acido Stearico in seguito ad ischemia fredda nelle HTC: ruolo dei recettori A_2A dell'adenosina (A_2AR), di JNK e di PI3K.

La morte apoptotica è stata indotta esponendo le HTC a 4h di trattamento con Acido Stearico (25uM). Alla fine del trattamento con Acido Stearico sono stati aggiunti il CGS21680 (5uM) e gli inibitori SP600125 (1uM) e Wrt (250nM) per 15 minuti. Le cellule sono poi state sottoposte a conservazione a freddo nella soluzione di preservazione Wisconsin per 16h a 4°C. Alla fine delle 16h le HTC sono state sottoposte a riossigenazione in terreno. Le cellule apoptotiche sono state analizzate in citofluometria a flusso in seguito ad incubazione con Annessina V-FITC e propidio ioduro ad 1h dalla riossigenazione. I risultati sono stati espressi come media \pm D.S. di 3 esperimenti differenti. La Figura 7 è un esperimento rappresentativo di 3.

Unitamente all'analisi dell'apoptosi con AnnessinaV è stata eseguita sugli stessi campioni l'analisi della frammentazione del DNA. Come possiamo vedere nelle Figure 8 e 9,

l'andamento rispecchia quello ottenuto dall'analisi con Annessina V sia per gli epatociti (Fig. 8) sia per le HTC (Fig. 9), confermando la capacità del CGS21680 di innescare meccanismi endogeni di citoprotezione che aumentano la resistenza cellulare al danno lipotossico anche in condizioni di conservazione a freddo

Figura 8

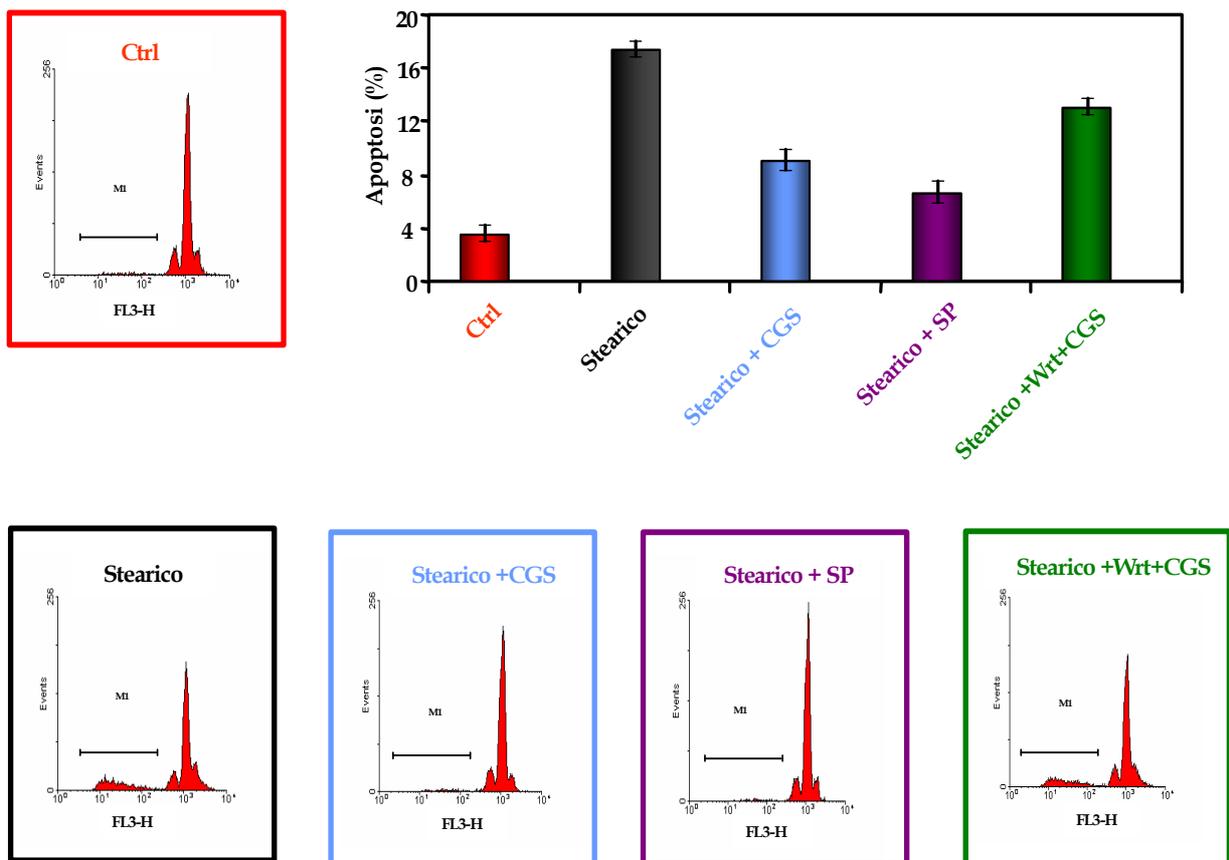


FIGURA 8: Analisi della presenza del picco sub-diploide del DNA in seguito a trattamento con Acido Stearico dopo ischemia fredda negli epatociti.

La morte apoptotica è stata indotta esponendo epatociti in sospensione alla concentrazione di 1 milione/ml a 4h di trattamento con Acido Stearico (25uM). Alla fine del trattamento con Acido Stearico sono stati aggiunti il CGS21680 (5uM) e gli inibitori SP600125 (1uM) e Wrt (250nM) per 15 minuti. Le cellule sono poi state sottoposte a conservazione a freddo nella soluzione di preservazione Wisconsin per 16h a 4°C. Alla fine delle 16h gli epatociti sono stati sottoposti a riossigenazione in terreno. Le cellule apoptotiche sono state rilevate in citofluometria a flusso sfruttando il test della frammentazione del DNA, visibile per la presenza del picco sub-diploide ad 1h dalla riossigenazione. I risultati sono espressi come media \pm D.S. di 3 esperimenti differenti. La Figura 8 è un esperimento rappresentativo di 3.

Figura 9

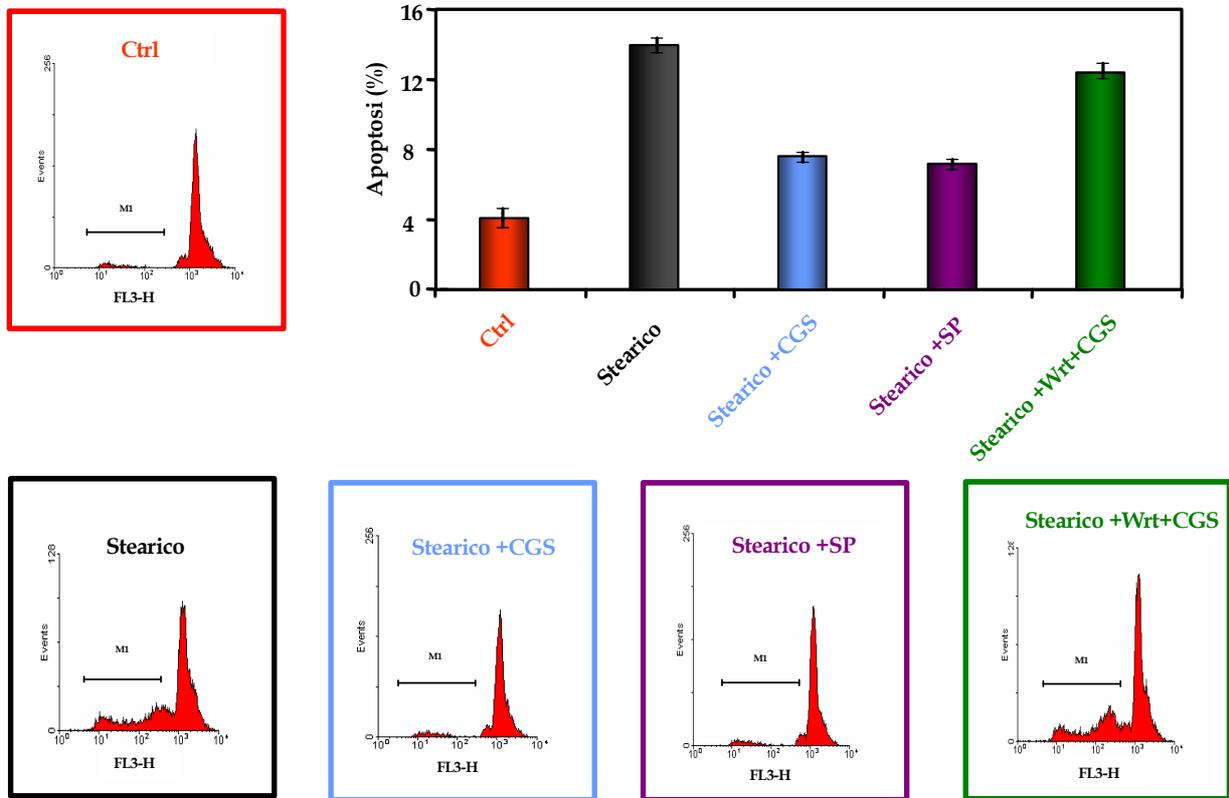


FIGURA 9: Analisi della presenza del picco sub-diploide del DNA in seguito a trattamento con Acido Stearico dopo ischemia fredda nelle cellule HTC.

La morte apoptotica è stata indotta esponendo le HTC a 4h di trattamento con Acido Stearico (200uM). Alla fine del trattamento con Acido Stearico sono stati aggiunti il CGS21680 (5uM) e gli inibitori SP600125 (1uM) e Wrt (250nM) per 15 minuti. Le cellule sono poi state sottoposte a conservazione a freddo nella soluzione di preservazione Wisconsin per 16h a 4°C. Alla fine delle 16h le HTC sono state sottoposte a riossigenazione in terreno. Le cellule apoptotiche sono state rilevate in citofluometria a flusso sfruttando il test della frammentazione del DNA, visibile per la presenza del picco sub-diploide ad 1h dalla riossigenazione. I risultati sono espressi come media \pm D.S. di 3 esperimenti differenti. La Figura 9 è un esperimento rappresentativo di 3.

Studio dei mediatori molecolari coinvolti nella lipoapoptosi indotta da acidi grassi liberi in seguito a conservazione a freddo

Le stesse aliquote di campione prelevate ad 1h di riossigenazione utilizzate per l'analisi dell'apoptosi con Annessina V e per lo studio della frammentazione del DNA sono state sottoposte ad analisi in Western Blot per vedere se anche in questo modello cellulare di lipoapoptosi indotta da acido Stearico e sottoposto a conservazione a freddo fossero coinvolte le chinasi JNK e SEK1. Come possiamo vedere nella Figura 10, la fosforilazione di JNK aumenta rispetto al controllo sia negli epatociti (Fig. 10A) sia nelle HTC (Fig. 10B) in seguito a trattamento con A.Stearico mentre dopo trattamento con CGS21680 la sua attivazione viene nuovamente ridotta. La Wrt annulla tale effetto protettivo attivando nuovamente la JNK.

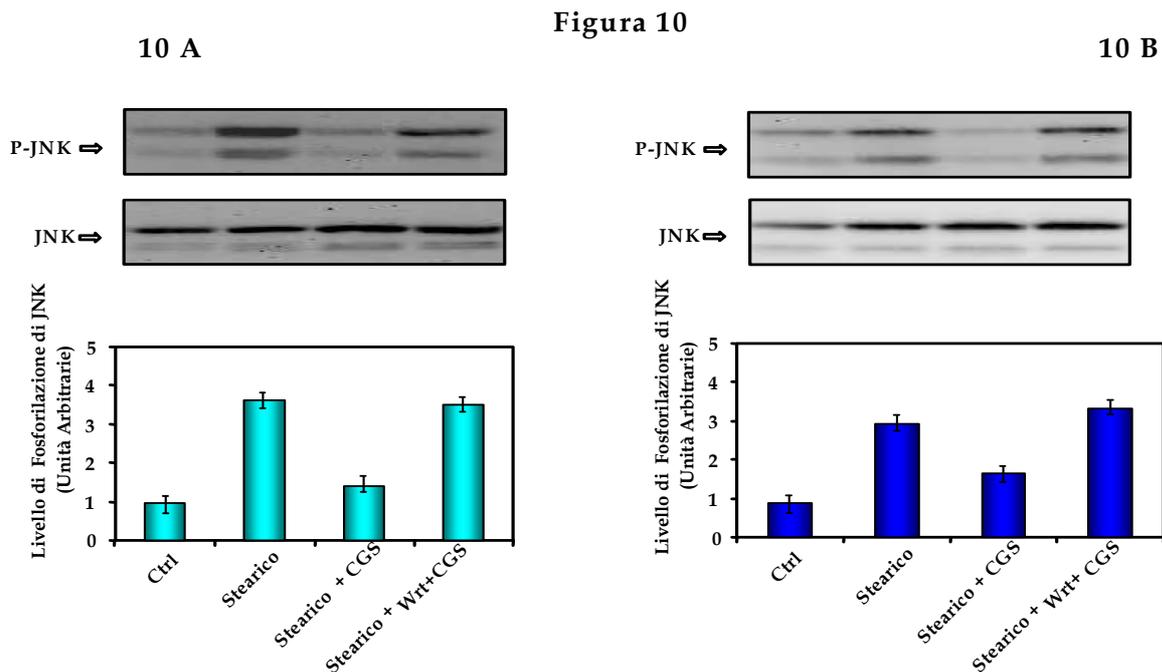


FIGURA 10: Attivazione di JNK nel modello di lipoapoptosi fredda.

L'attivazione di JNK è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata della JNK su estratti di epatociti ed HTC controllo incubati per 4h con A.Stearico (25 e 200uM) e successivamente trattati con CGS21680 (5uM) o Wortmannina (Wrt, 250nM) per 15 minuti. L'intensità relativa sia alla banda fosforilata sia a quella non fosforilata è stata misurata con videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come unità arbitrarie dopo normalizzazione al Controllo. Le Figure 10 A (epatociti) e 10B (HTC) sono un esperimento rappresentativo di tre.

Per quanto riguarda la chinasi SEK1, nella Figura 11 vediamo che, anche in questi campioni, il CGS21680 è in grado di inibire l'attività di SEK1 tramite fosforilazione in Ser80 e tale effetto viene annullato trattando sia gli epatociti (Fig.11 A) sia le HTC (Fig. 11B) con Wrt (250uM), confermando il ruolo di PI3K nell'inattivazione di SEK1 tramite fosforilazione in Ser80.

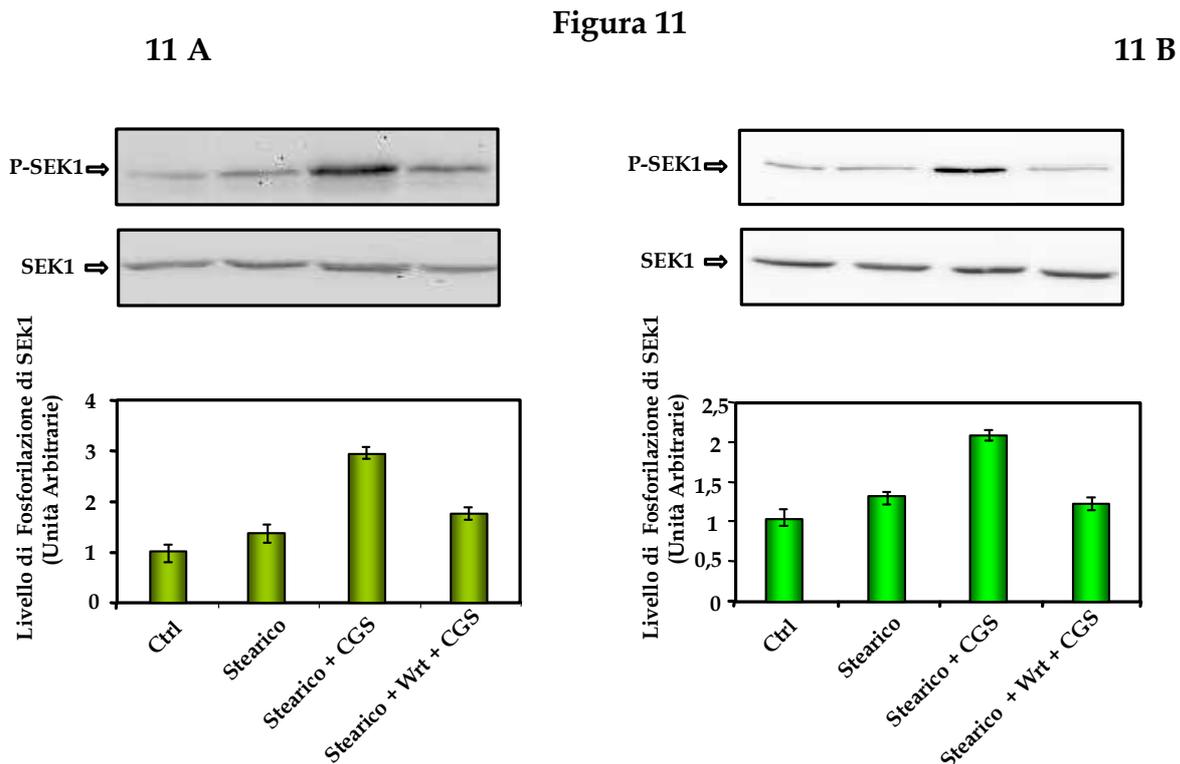


FIGURA 11: *Inibizione di SEK1 in seguito a fosforilazione in Ser80 nel modello di lipoapoptosi fredda .*

L'inibizione di SEK1 è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata di SEK1 in Ser80 su estratti di epatociti ed HTC controllo incubati per 4h con A.Stearico (25 e 200uM) e successivamente trattati con CGS21680 (5uM) o Wortmannina (Wrt, 250nM). L'intensità relativa sia alla banda fosforilata sia a quella non fosforilata è stata misurata con videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come unità arbitrarie dopo normalizzazione al Controllo. Le Figure 11 (epatociti) A e 11B (HTC) sono un esperimento rappresentativo di tre.

DISCUSSIONE

Rifacendoci allo studio di Malhi e coll. del 2006 (10), in questo progetto abbiamo riprodotto "in vitro" il fenomeno della lipoapoptosi, processo riscontrato nei fegati affetti da NASH (9).

A tale proposito sono stati sviluppati due modelli distinti di danno lipoapoptotico usando per entrambi epatociti isolati da fegato di ratto e cellule in linea di epatoma di ratto, HTC. Nel modello a caldo le cellule sono state trattate con l'acido saturo Stearico ed incubate a 37°C fino a 8h, mentre nel modello di ischemia fredda le cellule, dopo 4h di trattamento con Acido Stearico, sono state sottoposte a preservazione a freddo nella soluzione di mantenimento Wisconsin.

I dati riportati in questo lavoro evidenziano che anche in entrambi i modelli sperimentali impiegati si sviluppa danno apoptotico.

Le nostre ricerche hanno inoltre evidenziato per la prima volta che l'adenosina, tramite la stimolazione dei recettori A_{2a}R, è in grado di inibire tali effetti proapoptotici dell'acido Stearico. L'aggiunta di CGS21680 contemporaneamente o 1h dopo il trattamento con acido Stearico o il trattamento delle cellule con CGS21680 prima della conservazione a freddo riduce infatti in maniera evidente la morte apoptotica sia negli epatociti che nelle HTC. Tale effetto protettivo è associato all'inibizione dell'attività della chinasi c-Jun-NH₂-terminal kinase (JNK). Tali dati sono in accordo con studi precedenti riguardanti il ruolo centrale della JNK come mediatore comune coinvolto in malattie metaboliche quali la NASH (38).

Abbiamo quindi voluto indagare il suo coinvolgimento nella lipoapoptosi indotta da acido Stearico nei nostri modelli cellulari utilizzando un suo specifico inibitore, l'SP600125.

Il trattamento degli epatociti e delle HTC con SP600125 annulla l'apoptosi indotta dall'acido Stearico, confermando il coinvolgimento della chinasi JNK.

Come riportato nell'introduzione, la chinasi MKK4 è essenziale per l'attivazione di JNK (24). Uno studio di Park e coll (27) ha inoltre dimostrato che l'inibizione di MKK4 tramite la fosforilazione in Ser80 da parte della chinasi Akt impedisce l'attivazione di JNK. La chinasi Akt è attivata dalla PI3 chinasi, un mediatore centrale di sopravvivenza attivato dall'adenosina (34).

Partendo da queste osservazioni abbiamo quindi valutato il possibile coinvolgimento di PI3K/Akt anche nei nostri due modelli di lipoapoptosi impiegando un suo specifico inibitore farmacologico, la Wortmannina.

Come emerge dai nostri dati, la PI3K è coinvolta nell'effetto protettivo dell'adenosina in quanto, se inibita dalla Wrt, blocca gli effetti citoprotettivi del CGS21680 e permette la nuova attivazione della JNK.

Inoltre abbiamo dimostrato che gli effetti protettivi del CGS21680 sulla lipoapoptosi indotta da acido Stearico sono associati alla sua capacità di indurre la fosforilazione di MKK4 in Ser80. Tale fosforilazione viene inoltre annullata in seguito all'inibizione della PI3K da parte della Wrt.

I nostri dati, anche se preliminari, suggeriscono dunque che l'attivazione di Akt indotta da adenosina inibisce MKK4 e quindi JNK prevenendo l'apoptosi indotta da acido Stearico.

In successivi esperimenti ci proponiamo di verificare la capacità dell'acido stearico di attivare MKK4 inducendone la fosforilazione a livello dei residui Ser257 e Thr261.

Ci proponiamo inoltre di dimostrare che l'inibizione di MKK4 (con specifici siRNA) blocca l'attivazione di JNK indotta da acido stearico.

Nel loro insieme tali esperimenti costituirebbero la dimostrazione che la via proapoptotica dell'acido stearico coinvolge l'asse MKK4/JNK. Tali esperimenti suffragherebbero inoltre l'ipotesi che l'adenosina previene la lipoapoptosi da acido Stearico tramite l'inibizione Akt-dipendente di MKK4. Tali dati dovranno comunque essere suffragati da studi "in vivo" nell'animale con fegato steatosico

In conclusione, i nostri risultati evidenziano per la prima volta l'adenosina come fattore citoprotettivo contro la lipoapoptosi indotta da acidi grassi e suggeriscono che l'adenosina possa essere impiegata come nuovo agente terapeutico per la prevenzione della NASH.

I nostri dati indicano inoltre il meccanismo molecolare coinvolto nella maggiore suscettibilità all'ischemia fredda del fegato steatosico e spiegano la particolare efficacia del preconditionamento di prevenire tale danno.

BIBLIOGRAFIA

1. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. *Trends Mol Med*. 2008 Feb;14(2):72-81. Epub 2008 Jan 22. Review.
2. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32345-53. Epub 2004 May 27.
3. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. *Physiol Behav*. 2008 May 23;94(2):231-41. Epub 2007 Dec 5. Review.
4. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Malhi H, Gores GJ. *Semin Liver Dis*. 2008 Nov;28(4):360-9. Epub 2008 Oct 27. Review.
5. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, Fantoni LI, Marra F, Bertolotti M, Banni S, Lonardo A, Carulli N, Loria P. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 May;24(5):830-40. Epub 2009 Jan 13.
6. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. *Hepatology*. 2008 May;47(5):1495-503.
7. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1413-9.
8. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. *J Hepatol*. 2003 Dec;39(6):978-83.
9. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. *Gastroenterology*. 2003 Aug;125(2):437-43.

10. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. *J Biol Chem*. 2006 Apr 28;281(17):12093-101. Epub 2006 Feb 27.
11. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. Day CP, James OF. *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):842-5. No abstract available.
12. c-Jun N-terminal kinase signaling in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: Multiple roles in multiple steps. Kodama Y, Brenner DA. *Hepatology*. 2009 Jan;49(1):6-8. No abstract available.
13. Steatosis as a risk factor in liver surgery. Veteläinen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM. *Ann Surg*. 2007 Jan;245(1):20-30. Review
14. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. *Mayo Clin Proc*. 1980 Jul;55(7):434-8.
15. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. Malhi H, Gores GJ. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1641-54. Review.
16. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. *Hepatology*. 2006 Jul;44(1):27-33.
17. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2498-502.
18. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. Unger RH, Orci L. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 30;1585(2-3):202-12. Review.
19. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. Johnson GL, Nakamura K. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1341-8. Epub 2007 Jan 4. Review. (4 JNK)
20. JNK signaling in apoptosis. Dhanasekaran DN, Reddy EP. *Oncogene*. 2008 Oct 20;27(48):6245-51. Review. (3 JNK)
21. Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis. Xie X, Gu Y, Fox T, Coll JT, Fleming MA, Markland W, Caron PR, Wilson KP, Su MS. *Structure*. 1998 Aug 15;6(8):983-91.

22. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Davis RJ. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):239-52. Review. No abstract available. (6 JNK)
23. The JNK signal transduction pathway. Weston CR, Davis RJ. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Apr;19(2):142-9. Epub 2007 Feb 15. Review. (5 JNK)
24. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4). Cuenda A. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000 Jun;32(6):581-7. Review (1 SEK1)
25. Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. Whitmarsh AJ, Davis RJ. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3172-84. Review. (2 SEK1
26. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Chang L, Karin M. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):37-40. Review (3 SEK1
27. Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation. Park HS, Kim MS, Huh SH, Park J, Chung J, Kang SS, Choi EJ. *J Biol Chem*. 2002 Jan 25;277(4):2573-8. Epub 2001 Nov 13(4 SEK1)
28. Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Peralta C. *Am J Pathol*. 2002 Aug;161(2):587-601.
29. Is ischemic preconditioning a useful strategy in steatotic liver transplantation? Fernández L, Carrasco-Chaumel E, Serafín A, Xaus C, Grande L, Rimola A, Roselló-Catafau J, Peralta C. *Am J Transplant*. 2004 Jun;4(6):888-99
30. The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or a clinical reality? Yellon DM, Dana A. *Circ Res*. 2000 Sep 29;87(7):543-50. Review
31. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. Carini R, Albano E. *Gastroenterology*. 2003 Nov;125(5):1480-91. Review
32. Ischemic preconditioning reduces Na(+) accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E. *Hepatology*. 2000 Jan;31(1):166-72.
33. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E. *Hepatology*. 2001 Jan;33(1):131-9.
34. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning. Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Baldanzi G, Nitti MP,

- Alchera E, Filigheddu N, Domenicotti C, Pronzato MA, Graziani A, Albano E. *Gastroenterology*. 2004 Sep;127(3):914-23.
35. Insulin protects isolated hearts from ischemia/reperfusion injury: cross-talk between PI3-K/Akt and JNKs. Liu HT, Zhang HF, Si R, Zhang QJ, Zhang KR, Guo WY, Wang HC, Gao F. *Sheng Li Xue Bao*. 2007 Oct 25;59(5):651-9.
36. Addition of adenosine monophosphate-activated protein kinase activators to University of Wisconsin solution: a way of protecting rat steatotic livers. Ben Mosbah I, Massip-Salcedo M, Fernández-Monteiro I, Xaus C, Bartrons R, Boillot O, Roselló-Catafau J, Peralta C. *Liver Transpl*. 2007 Mar;13(3):410-25
37. Current status and perspective of liver preservation solutions. Feng XN, Xu X, Zheng SS. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006 Nov;5(4):490-4. Review
38. Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. Singh R, Wang Y, Xiang Y, Tanaka KE, Gaarde WA, Czaja MJ. *Hepatology*. 2009 Jan;49(1):87-96.

SEMINARI 2008-2009

- 5 dicembre 2008, *Production of bio-farmaceuticals in plants*, Prof. Luca Santi, Virologia e Biotecnologie Vegetali, Dipartimento di Biologia, Facoltà di Scienze Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".
- 12 dicembre 2008 , *Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche*, Antonio Uccelli, Università degli Studi di Genova.
- 15 dicembre 2008, *Interazioni geni - ambiente nella eziologia della SM: studi sui gemelli*, Marco Salvetti, Università "La Sapienza" di Roma.
- 9 gennaio 2009, *La malattia celiaca*, Riccardo Troncone, Università "Federico II" di Napoli
- 13 gennaio 2009, *Porpora trombocitopenica autoimmune:nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici*, Francesco Zaja, Università di Udine
- 27 gennaio 2009, *Interazioni geni - ambiente nella eziologia della sclerosi multipla: studi sui gemelli*, Marco Salvetti, Università "La Sapienza" di Roma
- 10 febbraio 2009, *Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica*, Antonio Musarò, Dipartimento di Istologia e Embriologia, Università "La Sapienza" di Roma
- 20 febbraio 2009, *When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the Prolyl-isomerase Pin1 in cancer*, Giannino Del Sal, Università di Trieste, Laboratorio Nazionale CIB, Area Science Park, Padriciano, Trieste
- 26 febbraio 2009, *Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica*, Mauro Maccarrone, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Teramo
- 18 marzo 2009, *La proteomica: un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine*, Piero Pucci, Dipartimento di Biochimica Clinica e Organica, Università di Napoli Federico II
- 18 marzo 2009, *Cellule staminali tumorali: implicazioni terapeutiche*, Giorgio Stassi Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Università di Palermo
- 19 marzo 2009, *Le nanotecnologie applicate alla medicina*, G. Peluso Istituto di Biochimica delle proteine, CNR di Napoli

- 23 marzo 2009, *Enzima P e il Social Network per l'Innovazione*, Salvatore Timpanaro, Responsabile Scientifico del Social Network per l'Innovazione, Politecnico di Torino
- 23 marzo 2009, *Tecnologie innovative in ergonomia, ginecologia, medicina del lavoro e dello sport*, Roberto Merletti, Responsabile del Laboratorio di Ingegneria del Sistema Neuromuscolare, Dipartimento di Elettronica del Politecnico di Torino
- 26 marzo 2009, *Regulation of integrin functions in vascular systems*, Federico Bussolino, Department of Oncological Sciences, University of Torino
- 9 aprile 2009, *I bioreattori nella Medicina Rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up*, Sara Mantero, Dipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano
- 28 aprile 2009, *Polycystin-1, the product of the PKD1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), is an orphan receptor regulating cell migration and polarity*, Anna Boletta, P.I. at Dulbecco Telethon Institute, at DIBIT San Raffaele Scientific Institute, Milano
- 30 aprile 2009, *Polarized inflammation in tumour development*, Antonio Sica, Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche (DISCAF), Università del Piemonte Orientale
- 5 maggio 2009, *Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo*, Amedeo Columbano, Dip. Tossicologia, Sezione Oncologia e Patologia Molecolare, Università di Cagliari
- 6 maggio 2009, *Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy*, Barbara Palazzo, Department of Chemistry, University of Bologna.
- 12 maggio 2009, *Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana*, Giuseppe Poli, Università di Torino (II Facoltà di Medicina e Chirurgia)
- 12 maggio 2009, *Neurotossicità delle proteine 'misfolded' nelle malattie del motoneurone*, Angelo Poletti, Università di Milano (Facoltà di Medicina e Chirurgia)
- 14 maggio 2009, *Tecniche di split liver nel trapianto di fegato adulto e pediatrico*, V. Corno, Divisione di Chirurgia Generale, Centro Trapianto di Fegato e Centro Trapianto di Polmone Ospedali Riuniti di Bergamo
- 14 maggio 2009, *Functional Genomics of Brain*, Stefano Gustincich, SISSA di Trieste Basovizza, Trieste ITALY

- 21 maggio 2009, *Il Doping ormonale: aspetti clinici e legislativi*, Prof. L. Di Luigi, Università agraria; Foro Italico di Roma
- 10 giugno 2009, *Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla teoria alla pratica clinica*, Milo Frattini, Responsabile Laboratorio di Diagnostica Molecolare Istituto Cantonale di Patologia, Locarno (Svizzera)

ATTIVITÀ FORMATIVA

Secondo anno

Durante questo secondo anno di dottorato, oltre al mio progetto, ho partecipato alla realizzazione di altre linee di ricerca seguite dal mio gruppo di lavoro:

- 1) Studio del ruolo della DGK nello sviluppo del Precondizionamento epatico:
- 2) Messa a punto di co-culture cellulari epatiche con l'obiettivo di appurare se lo sviluppo del fenotipo preconditionato da parte di una specifica cellula epatica è dovuto o meno alla presenza di altri tipi di cellule epatiche.

CORSI FREQUENTATI:

Secondo anno

Partecipazione a seminari in inglese sottoforma di Journal Club tenuti dai dottorandi su argomenti vari a partire dallo sviluppo del tema dell'Autoimmunità.

CONGRESSI FREQUENTATI:

Secondo anno

Ho partecipato al congresso:

44rd Annual Meeting dell' European Association for the Study of the Liver (EASL), Aprile 22-26, 2009 Copenaghen.

E' stato inviato l'Abstract dal titolo: "**Down regulation of diacylglycerol kinase θ activity mediates the cytoprotective effect of hepatic preconditioning**", E. Alchera, C. Dal Ponte, C. Imarisio, L. Tacchini, E. Albano and R. Carini.

Comunicazione presentata personalmente (poster):

"Down regulation of diacylglycerol kinase θ activity mediates the cytoprotective effect of hepatic preconditioning", E. Alchera, C. Dal Ponte, C. Imarisio, L. Tacchini, E. Albano and R. Carini, 44rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 22-26, 2009 Copenaghen, Poster Session.

Primo anno

Ho partecipato al congresso:

“Molecular, cellular, physiological and pathogenic responses to hypoxia”.

15-20 Gennaio 2008, Fairmont Hotel Vancouver - Vancouver, British Columbia - Canada.

E' stato inviato l'abstract **“Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned rat hepatocytes”** Elisa Alchera, Lorenza Tacchini, Chiara Imarisio, Caterina Dal Ponte, Cristina De Ponti, Elena Gammella, Gaetano Cairo, Emanuele Albano and Rita Carini.

Comunicazioni presentate personalmente (poster):

“Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned rat hepatocytes” Elisa Alchera, Lorenza Tacchini, Chiara Imarisio, Caterina Dal Ponte, Cristina De Ponti, Elena Gammella, Gaetano Cairo, Emanuele Albano and Rita Carini. Gennaio 2008, Fairmont Hotel Vancouver - Vancouver, British Columbia - Canada.

PUBBLICAZIONI:

Articoli:

Secondo anno

M Cescon, R Carini, G L Grazi, P Caraceni, E Alchera, G Gasloli, M Ravaioli, F Tuci, C Imarisio, C Dal Ponte, A M Pertosa, M Bernardi, A Pinna and E Albano; **Variable activation of phosphoinositide 3-kinase influences the response of liver grafts to Ischemic preconditioning.** Journal of Hepatology 2009, 50:937-947

Primo anno

E. Alchera, L. Tacchini, C. Imarisio, C. Dal Ponte, C. De Ponti, E. Gammella, G. Cairo, E. Albano, R. Carini. **Adenosine-Dependent Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 Induces Late Preconditioning in Liver Cells.** Hepatology 2008; 48: 230-239.

Abstract:**Secondo anno**

E Alchera, C Dal Ponte, C Imarisio, L Tacchini, E Albano and R Carini

“Molecular mechanisms involved in hepatocarcinoma cells resistance to hypoxia: role of HIF-1 and of carbonic anhydrase IX”, 44rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 22-26, 2009 Copenhagen, Poster Session.

M Cescon, R Carini, GL Grazi, P Caraceni, E Alchera, G Gasloli, M Ravaioli, F Tuci, C Imarisio, C Dal Ponte, AM Pertosa, M Bernardi, AD Pinna and E Albano **“The efficacy of ischemic preconditioning in protecting human transplanted liver from ischemia/reperfusion injury is associated to the activation of phosphoinositide-3kinase”**, 44rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 22-26, 2009 Copenhagen, Poster Session.

Primo anno

“Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned rat hepatocytes” Elisa Alchera, Lorenza Tacchini, Chiara Imarisio, Caterina Dal Ponte, Cristina De Ponti, Elena Gammella, Gaetano Cairo, Emanuele Albano and Rita Carini. Keystone Symposia on molecular and cellular biology; 2008 Abstract Book; 144, pag.140.

“Role of HIF-1 and Carbonic Anhydrase IX in the induction of the Late Protective effects of Hepatocyte Preconditioning”. Elisa Alchera, Lorenza Tacchini, Chiara Imarisio, Caterina Dal Ponte, Cristina De Ponti, Elena Gammella, Gaetano Cairo, Emanuele Albano and Rita Carini. Journal of Hepatology; Abstracts of the 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver, April 23-27,2008, Milan, Italy. S65-147.

“Stimulation of Adenosine A2A Receptors Induces Postconditioning in Isolated Hepatocytes”. Caterina Dal Ponte, Elisa Alchera, Chiara Imarisio, Emanuele Albano and Rita Carini. Journal of Hepatology; Abstracts of the 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver, April 23-27,2008, Milan, Italy. S66-150.