

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XXIII

Relazione 3° anno

TITOLO:

**Meccanismi di protezione dalla steatoepatite: meccanismo
epatoprotettivo dell'adenosina**

Candidato: Imarisio Chiara

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

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

INTRODUZIONE	3
Steatosi epatica	3
Modelli animali di steatoepatite	6
Lipotossicità e Lipoapoptosi	7
c-jun-NH ₂ -terminal Chinasi (JNK)	9
Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4).....	11
Protein Kinasi B (PKB/Akt)	12
Il preconditionamento protegge il fegato steatosico dal danno da ischemia-riperfusione	13
RISULTATI PRECEDENTI.....	15
SCOPO DEL LAVORO	17
MATERIALI E METODI.....	18
Materiali	18
Animali.....	18
Descrizione del protocollo sperimentale applicato	18
Prelievo di sangue ed isolamento del siero	19
Prelievo dei tessuti.....	19
Valutazione delle sezioni epatiche	19
Dosaggio delle transaminasi	20
Preparazione dei campioni per l'analisi in Western Blotting	20
Analisi dello stato di fosforilazione delle chinasi SAPK/JNK, PKB/Akt e MKK4/SEK1.....	21
Analisi dei dati	21
RISULTATI	22
Caratteristiche fisiologiche degli animali	22
Valutazione della capacità dell'adenosina di inibire l'evoluzione della steatosi in steatoepatite.	23
Mediatori molecolari coinvolti nella steatosi epatica indotta dalla dieta MCD.....	24
CONCLUSIONI	27
BIBLIOGRAFIA.....	28
SEMINARI 2009/2010.....	32
ATTIVITÀ FORMATIVA.....	35
Terzo anno	35
CORSI FREQUENTATI:.....	35
Terzo anno	35
CONGRESSI FREQUENTATI:.....	36
Terzo anno	36
Secondo anno.....	36
Primo anno.....	36
PUBBLICAZIONI:	37
Articoli:.....	37
Terzo anno	37
Secondo anno.....	37
Primo anno.....	37
Abstract:	38
Terzo anno	38
Secondo anno.....	38
Primo anno.....	38

INTRODUZIONE

Steatosi epatica

La Steatosi Epatica (SE) nota anche come “fegato grasso” è dovuta ad un accumulo di grasso, per lo più sottoforma di trigliceridi, all’interno delle cellule del tessuto epatico. Un paziente si considera affetto da steatosi epatica quando la quantità di lipidi del fegato supera del 5% il peso totale dell’organo(1).

Si conoscono due tipi diversi di SE: una macrovescicolare caratterizzata da gocce lipidiche di elevate dimensioni che determinano l’aumento del volume delle cellule epatiche spostando il nucleo alla periferia della cellula e la steatosi microvescicolare dovuta all’accumulo di gocce di lipidiche di piccole dimensioni nelle cellule che assumono un aspetto schiumoso e mantengono i nuclei in posizione centrale.

Nei Paesi Occidentali la degenerazione grassa rappresenta la principale alterazione del fegato nella popolazione generale. La frequenza di tale alterazione è da correlarsi al generale incremento nella popolazione dell’obesità e di malattie metaboliche quali il diabete mellito di tipo 2, l’ipertensione e la sindrome metabolica (X-Sindrome) correlata ad Insulino Resistenza (IR). Nel caso particolare dell’IR, è stato osservato uno stretto legame tra l’aumento di grasso epatico ed un’alterata azione dell’insulina che non risulta essere dipendente né dall’adiposità regionale né da quella globale. Quindi, una diagnosi che rivela un eccessivo contenuto di lipidi a livello epatico può permettere di identificare pazienti con un’IR altrimenti non rilevata da altre analisi cliniche standard (2). Secondo le attuali teorie si ritiene che l’IR, agendo a livello periferico sugli adipociti, sia in grado di aumentare il rilascio in circolo di acidi grassi liberi (Free Fatty Acids, FFAs) a causa di una mancata azione antilipolitica dell’insulina, portando il fegato ad un incontrollato up-take di FFAs con conseguente accumulo di TG. Inoltre, 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 sufficiente a controbilanciare l’eccessivo accumulo di grassi negli epatociti, sviluppando così una condizione di steatosi che può rivelarsi fatale per lo sviluppo dell’epatopatia steatosica non alcolica (NAFLD) (1,3, 4, 5,6) .

La NAFLD è attualmente la più comune forma di malattia cronica del fegato che affligge indistintamente adulti e bambini in Europa e negli Stati Uniti con un'incidenza nella popolazione generale del 20-30%(2). La NAFLD include un ampio spettro di quadri clinici che vanno dalla steatosi semplice macrovescicolare alla 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 rappresentano un sottogruppo di pazienti precedentemente affetti da NAFLD (1, 8, 9, 10) in cui alla steatosi iniziale si somma un grave danno epatico con una importante componente infiammatoria (2).

Nel 1998 Day e James hanno proposto il modello "two hit" per spiegare lo sviluppo della NAFLD e la sua successiva degenerazione in NASH (11). Il "first hit" è sempre stato identificato con l'accumulo di lipidi a livello epatico, mentre il "second hit", allora descritto in maniera generica come fattore responsabile della comparsa di infiammazione (12), è attualmente ritenuto essere innescato da numerosi fattori quali: stress ossidativo, perossidazione lipidica, endotossine batteriche ed un alterato funzionamento delle cellule di Kupffer (2, 13).

Un ulteriore elemento chiave che si associa criticamente allo sviluppo della NASH è la comparsa della morte degli epatociti per 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 α , 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 (14).

Una volta innescato il pathway apoptotico, avviene la permeabilizzazione mitocondriale con fuoriuscita 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 (10, 14).

Come descritto da Feldstein et al., 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 steatoepatite alcolica. 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, attraverso la morte programmata, progredisce nella sua gravità fino alla definitiva perdita di funzione dell’organo.

Lo studio di Feldstein ha inoltre contribuito alla caratterizzazione di nuovi markers utili per la messa a punto di test non invasivi necessari per facilitare lo screening di pazienti a rischio e il follow-up di pazienti trattati e non trattati, senza dover ricorrere necessariamente alla biopsia epatica. Per esempio, un promettente marker per la diagnosi non invasiva della steatoepatite è il frammento sierico M30 della citocheratina18 (CK18), frammento epiteliale delle cellule epatiche apoptotiche. Tale saggio permette una corretta diagnosi di NASH e dà la possibilità di discriminarla correttamente dalla steatoepatite alcolica (2, 15). Per permettere lo sviluppo di nuovi test non invasivi ed ampliare le conoscenze dei meccanismi responsabili dello sviluppo e progressione della steatoepatite, negli ultimi anni si è ricorso in maniera sempre maggiore all’uso di modelli animali, fondamentali soprattutto per supplire alle limitazioni a cui la ricerca clinica è soggetta (16).

Modelli animali di steatoepatite

L'utilizzo di specifici modelli animali ha permesso di capire in maniera più approfondita le cause responsabili dell'evoluzione della steatosi epatica in steatoepatite(16). Tra i modelli animali di tipo genetico troviamo quelli in cui il danno epatico è dovuto ad una condizione di obesità, come nei topi "*nullizygous*" per l'acyl-CoA ossidasi (ACOX), i metionina adenosyltransferasi (MAT)-1A (topi MATO) e quelli con una specifica delezione di *pten* a livello del tessuto epatico. Altri modelli genetici come i topi *ob/ob* incapaci di sintetizzare la leptina o quelli (*db/db*) mancanti del suo recettore sono oltre che obesi, iperfagici, insulino resistenti e sviluppano diabete di tipo2 (16). Altri modelli genetici di steatosi associata ad insulino resistenza sono i topi transgenici per la porzione di DNA legante la proteina regolatrice della sintesi di sterolo (SREBP)-1c(17). Oltre a questi modelli genetici, sono attualmente disponibili modelli dove la steatoepatite è dovuta ad una condizione di over-nutrizione che contraddistingue il moderno stile di vita dei nostri giorni nei paesi industrializzati, ricreata in laboratorio con l'uso di una dieta ricca in grassi dall'elevato contenuto calorico (16). Sono in fine disponibili i modelli animali in cui il danno epatico è dovuto ad una dieta colina (CD) o colina-metionina (MCD) carenti. Metionina e colina sono presenti nel ciclo omocisteina-metionina, dove la S-adenosilmetionina è necessaria per la sintesi di fosfatidilcolina e glutatione. La dieta MCD non permette la sintesi della fosfatidilcolina che è fondamentale per la formazione delle VLDL. Una condizione di fosfatidilcolina-deficienza fa sì che i livelli di trigliceridi diminuiscono nel siero mentre aumentano in maniera incontrollata a livello epatico dando adito alla formazione di steatosi (18). Ad oggi il modello di riferimento per lo studio della steatoepatite è quello metionina-colina carente perché è in grado di indurre rapidamente steatosi seguita da necro-infiammazione e fibrosi epatica (19). Dati in letteratura confermano che questo tipo di dieta induce una marcata steatosi, dovuta all'elevato accumulo di trigliceridi all'interno delle cellule del fegato e che per questo motivo consente l'analisi di ciò che comporta un accumulo incontrollato di grasso epatico e la comparsa di infiammazione (20).

Lipotossicità e Lipoapoptosi

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 danneggiandoli a livello cellulare ed alterandone le funzioni fino ad indurre la morte. 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 (21); 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 (20).

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.) ed in parte sintetizziamo endogenamente. La biosintesi avviene principalmente a livello del tessuto epatico e, in misura minore, in alcuni tessuti extraepatici (sistema nervoso centrale, piastrine, neutrofili, miociti), dove gli acidi grassi 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.

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 li divide in: (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 sono molti lavori che dimostrano il ruolo centrale 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).

Negli epatociti, gli acidi grassi saturi come l'acido palmitico e stearico 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 risulta essere regolata in particolare da una MAP chinasi sensibile allo stress intracellulare, la c-jun-N-terminal Chinasi (JNK) (10). JNK è nota per rivestire un ruolo importante in entrambi gli "hit" 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). È stato dimostrato in modelli animali trattati con dieta metionina-colina carente che una sostenuta attività di JNK è necessaria per sviluppare steatoepatite (23).

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 (24). 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).

Informazioni più dettagliate sulle funzioni che la JNK ha all'interno della cellula sono state ottenute in seguito alla determinazione della sua struttura atomica (25).

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 (26). 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 (26,27).

L'attivazione della 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 (21)

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 (21). 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 (14). 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 (14).

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 trascurabili (28,29).

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 (28,29).

MKK4 è una proteina di cui nel suo dominio chinasi (KD) è conservato il motivo S-I-A-K-T localizzato tra i sottodomini VII e VIII, dove la chinasi MKKK induce la doppia fosforilazione nei residui Ser257 e Thr261, che, se mutati, non permettono più l'attivazione di MKK4 (28). In seguito a questa duplice fosforilazione, MKK4 è attiva e capace di interagire in maniera specifica con JNK fosforilandola 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 (29).

Uno studio del 2000 di Park et al. (30) volto ad approfondire ed identificare nuovi target cellulari del fattore di sopravvivenza Akt ha dimostrato che la stessa 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 SEK1-JNK. La fosforilazione compiuta da Akt non permette più tale interazione, annullando la capacità di SEK1 di attivare JNK (30).

Protein Kinasi B (PKB/Akt)

PKB/Akt è una serina-treonina chinasi effettrice a valle della fosfatidil-inositolo 3 chinasi PI(3)K. Akt nei mammiferi ha un ruolo fondamentale nella regolazione della crescita cellulare, della sintesi proteica e della sopravvivenza cellulare. Akt è in grado di svolgere queste funzioni grazie alla sua struttura, che si esplica in tre domini: PH (pleckstrin homology), un dominio di riconoscimento comune a tutti gli enzimi tirosin-chinasici; il dominio Catalitico, in cui risiede l'attività chinasica, in cui è presente una Thr che costituisce il sito di fosforilazione per l'attivazione ed il dominio Regolatorio, in cui troviamo una Ser, sito di autofosforilazione. Quando un ligando specifico (per es. insulina, IGF) lega il recettore tirosin-chinasico che si autofosforila, viene attivata la PI(3)K e Akt, mediante il suo dominio PH, si dirige verso la membrana plasmatica. PI(3)K converte PIP2 in PIP3 il quale si lega ad Akt cambiandone la conformazione. Può così intervenire la chinasi PDK1 che aggiunge un fosfato sulla Thr. Akt, dopo essere stata parzialmente attivata, mediante autofosforilazione su residuo di Ser si attiva completamente e, staccandosi dalla membrana, ritorna nel citoplasma dove può fosforilare una serie di proteine. In particolare, Akt è in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare fosforilando e quindi inibendo varie proteine pro-apoptotiche come Bad, la famiglia di fattori di trascrizione Fork-head, la Caspasi-9 e Ask1 (30). Si è visto che Akt regola la risposta a segnali di stress extracellulari attraverso la fosforilazione inibitoria di MKK4-SEK1 nella cascata di segnale SAPK-JNK. Tale meccanismo risulta essere un evento necessario affinché Akt riesca in maniera integrale a garantire la sopravvivenza cellulare in presenza di forti segnali di stress cellulari (30).

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 (31). 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 (31,32).

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 (33).

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 (34).

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 (35).

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 tra gli altri 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 (36,37).

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 (32).

I meccanismi implicati in tale effetto protettivo devono essere tuttavia in gran parte ancora chiariti.

RISULTATI PRECEDENTI

Lo scorso anno abbiamo riprodotto “*in vitro*” il fenomeno della lipoapoptosi utilizzando epatociti isolati da fegato di ratto e cellule in linea di epatoma di ratto, HTC trattati con varie concentrazioni di acido stearico fino ad 8 ore.

Lo sviluppo di tale modello ci ha permesso di iniziare la caratterizzazione di alcune delle proteine implicate nell’induzione del danno lipotossico e l’effetto ed i meccanismi molecolari anti-lipoapoptotici dovuti all’attivazione dei recettori A_{2A}R dell’adenosina.

In particolare abbiamo analizzato i meccanismi di attivazione della JNK durante la lipoapoptosi degli epatociti, ed abbiamo investigato l’eventuale coinvolgimento della proteina PI3K, il mediatore centrale degli effetti epatoprotettivi indotti dall’adenosina, nel regolare nell’effetto anti-lipotossico dell’adenosina.

I nostri risultati hanno mostrato che le cellule trattate con l’acido stearico presentano un elevato incremento di apoptosi rispetto al controllo. Al contrario, il trattamento con il CGS21680, agonista specifico dei recettori A_{2A} dell’adenosina, ha protetto le cellule dalla morte apoptotica in maniera analoga all’SP600125, un inibitore specifico della chinasi JNK. Inoltre il trattamento con wortmannina (Wrt), un inibitore specifico della PI3K, annulla la protezione data dal CGS21680.

In accordo con i dati in letteratura abbiamo inoltre osservato un aumento significativo dell’attivazione di JNK sia negli epatociti sia nelle HTC trattati con ac. stearico. Tale aumento è stato fortemente inibito dal trattamento con CGS21680. Al contrario, la inibizione di PI3K con wrt ha ripristinato l’attivazione della JNK annullando l’effetto del CGS21680. Questo risultato ha indicato che l’attivazione di JNK indotta dall’acido stearico è annullata dall’azione del CGS21680 tramite PI3K.

La chinasi JNK viene direttamente attivata dalla chinasi MKK4/SEK1, attivata a sua volta da una doppia fosforilazione, in accordo con questo abbiamo osservato un aumento della fosforilazione attivatoria di MKK4/SEK1 sia negli epatociti che nelle cellule HTC trattate con ac. stearico. 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, abbiamo analizzato la presenza di fosforilazione inibitoria di SEK1 in seguito a trattamento con CGS21680. I nostri dati hanno evidenziato che l’acido Stearico non comporta un aumento dei livelli di fosforilazione in Ser80 di SEK1 rispetto al controllo sia

negli epatociti sia nelle HTC, mentre il CGS21680 aumenta in maniera evidente la fosforilazione in Ser80 di SEK1 e tale effetto è inibito dalla Wrt. Questo ha indicato che il CGS21680 induce la fosforilazione inibitoria di SEK1 e che tale effetto è dovuto all'azione di PI3K/Akt.

SCOPO DEL LAVORO

Sulla base dei risultati ottenuti lo scorso anno, lo scopo di questa seconda parte di progetto è quello di:

- 1) valutare la capacità del trattamento farmacologico *in vivo* con CGS21680 di ratti Wistar alimentati con dieta metionina-colina carente, di prevenire la progressione della steatosi a steatoepatite.
- 2) Confermare il ruolo pro- ed anti-apoptotico dei mediatori molecolari identificati nei modelli cellulari.

MATERIALI E METODI

Materiali

Buffer salino fosfato (PBS 1X), soluzione fisiologica pH 7.4 (NaCl 0,9%p/v), formalina tamponata al 4%p/p. Dalle seguenti ditte sono state ottenute le sostanze chimiche: Cloruro di Sodio (NaCl), CGS21680, dimetilsolfossido (DMSO sterile) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

La dieta metionina-colina carente (MCD) è stata acquistata dal Laboratorio Piccioni Srl (Gessate, Milano, Italia). Questa dieta è stata conservata a 4°C quando non utilizzata.

Animali

L'uso e cura degli animali sono stati approvati dal Ministero Italiano della Salute e dalla Commissione Universitaria per la Cura degli Animali rispettando le direttive del Consiglio Nazionale della Ricerca Italiano. Ratti maschi di ceppo Wistar con peso corporeo di 250-300 g (Harlan, S. Pietro al Natisone, Udine, Italia) sono stati lasciati in isolamento per sette giorni ad una temperatura costante di 24°C ed abituati ad un ciclo di luce-buio di 12ore. In questo periodo sono stati nutriti con una normale dieta isocalorica acquistata dalla Harlan-Nossan (San Pietro al Natisone, Udine, Italia) con accesso *ad libitum* all'acqua.

Descrizione del protocollo sperimentale applicato

Trascorsi i sette giorni di isolamento, ratti maschi di ceppo Wistar sono stati suddivisi casualmente in tre distinti gruppi e ciascun animale è stato riposto in una propria gabbia. Il gruppo numero 1 ($n=8$) è stato designato come gruppo controllo ed è stato nutrito per tutte le 8 settimane di trattamento con una normale dieta isocalorica, mentre i gruppi numero 2 ($n=8$) e numero 3 ($n=8$) sono stati nutriti dall'inizio dell'esperimento fino al suo termine con la dieta metionina-colina carente (MCD).

Dopo due settimane dall'inizio dell'esperimento, abbiamo iniziato a trattare con CGS21680 per via intraperitoneale tutti gli 8 ratti del Gruppo 3. Affinchè i recettori A_{2A}R del fegato

fossero farmacologicamente attivati dal CGS21680, questo è stato iniettato ad una concentrazione di 0,5 mg/kg (38) due volte alla settimana ad intervalli regolari fino alla fine delle 8 settimane.

Il cibo è stato rinnovato ogni giorno per tutta la durata dell'esperimento, i ratti hanno sempre avuto libero accesso al cibo ed all'acqua e sono stati pesati all'inizio di ogni settimana per tutta la durata del trattamento ed alla fine delle 8 settimane tutti i ratti sono stati sacrificati.

Prelievo di sangue ed isolamento del siero

Immediatamente dopo essere stato anestetizzato, a ciascun ratto sono stati prelevati circa 2ml di sangue. Il sangue raccolto è stato lasciato a temperatura ambiente e centrifugato prima a 3250rpm per 5 minuti e successivamente a 14000rpm per 8 minuti per isolare il siero. A questo punto i campioni sono stati subito sottoposti al dosaggio delle transaminasi e successivamente conservati a -20°C.

Prelievo dei tessuti

Il fegato di ciascun animale è stato rimosso e lavato con PBS 1X freddo. Da ogni lobo sono state prelevate sezioni di tessuto epatico subito immerse in formalina tamponata al 4% p/p per essere analizzate istologicamente tramite colorazione Ematossilina-Eosina (H&E) e tramite saggio TUNEL. Altre sezioni di tessuto epatico sono state immerse in azoto liquido e conservate a -80°C per analisi molecolari.

Valutazione delle sezioni epatiche

Sezioni epatiche dello spessore di 4 µm colorate con Ematossilina-Eosina (H&E) sono state analizzate ai fini di valutare la presenza di steatosi micro-macrovescicolare, necrosi epatocitaria ed infiammazione. Inoltre, per valutare l'eventuale presenza di apoptosi è stata eseguita la tecnica TUNEL *in situ* utilizzando il kit Apoptag (Intergene company, Purchase, NY, USA) come descritto (39). La media di cellule apoptotiche per sezione di

tessuto è stata calcolata prendendo in considerazione 10 campi microscopici per ogni sezione (ingrandimento 40X).

Dosaggio delle transaminasi

La determinazione cinetica dell'alanina-aminotransferasi (ALT) è stata effettuata secondo le indicazioni IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) (GPT-ALT, Metodo cinetico UV ottimizzato IFCC, Radim, Calenzano, Firenze). L'ALT catalizza la reazione tra l'acido alfa-chetoglutarato e l'alanina, dando acido L-gluttammico e piruvato. Quest'ultimo reagisce, in presenza di lattato deidrogenasi (LDH), con il coenzima NADH dando acido lattico e NAD⁺. La variazione di D.O. a 340nm è proporzionale all'attività della ALT. La lettura dei campioni è stata eseguita allo spettrofotometro JASCO V-630 UV-Vis Spectrophotometer.

Preparazione dei campioni per l'analisi in Western Blotting

Frammenti di 0.4-0.5 mg delle biopsie epatiche congelate sono stati omogenizzati in 2 ml di buffer di lisi in ghiaccio contenente: 2mmol/L di Hepes buffer a pH 7.4, 10% di glicerolo, 50 mmol/L di NaCl, 5 mmol/L di EDTA, 2mmol/L di EGTA, 1 mmol/L di ZnCl₂, 50 mmol/L di ammonio molibdato, 1% NP-40, 1mmol/L di Na₃VO₄, 0.2 mmol/L difenilmetilsulfonil fluoruro, 10 mmol/L fluoruro di sodio, 0.5 mmol/L ditiotreitolo, 1 µg/ml di leupeptina, 1 µg/ml di pepstatina, 1 µg/ml di inibitore della tripsina e 1 µg/ml aprotinina. Il surnatante ottenuto mediante centrifugata a 14.000 RPM per 20 minuti è stato diluito con 0.5 ml di buffer di Laemmli e sono state prelevate aliquote per la determinazione della concentrazione proteica.

Il contenuto proteico dei campioni è stato determinato secondo il metodo di Lowry modificato secondo Peterson (40).

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

Aliquote di 40ug 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 anti-SAPK/JNK usato 1:1000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). L'analisi dello stato di fosforilazione di PKB/Akt è stata effettuata incubando le membrane prima con anticorpi verso Ser473 fosfo-Akt (1:500) e dopo lo stripping con anticorpi anti-Akt (1:500) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Per valutare lo stato di fosforilazione inibitoria di SEK1/MKK4 è stato utilizzato l'anticorpo policlonale Phospho-SEK1/MKK4 (Ser80) usato 1:1000, mentre per valutare lo stato di fosforilazione attivatoria di SEK1/MKK4 è stato utilizzato l'anticorpo policlonale Phospho-SEK1/MKK4 (Ser257/Thr261) ed il contenuto totale nella cellula di SEK1/MKK4 è stato rilevato con l'anticorpo anti-SEK1/MKK4 usato 1:1000 (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

Tutti i dati sono stati espressi come media \pm D.S.. Valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Caratteristiche fisiologiche degli animali

Al momento della suddivisione in gruppi, ogni ratto è stato pesato prima di essere posto nella propria gabbia provvista di cibo ed acqua. Al termine della suddivisione, nessuno dei tre gruppi ottenuti mostrava differenze significative per quanto riguarda il peso corporeo iniziale degli animali ($p>0.05$). Nel corso dell'esperimento il peso corporeo dei ratti del Gruppo 1 Controllo, sempre nutriti con la dieta isocalorica normale, è aumentato costantemente, mentre i ratti del Gruppo 2 e quelli del Gruppo 3, nutriti da subito con la dieta MCD come quelli del secondo gruppo, ma in più trattati dalla fine della seconda settimana di dieta con CGS21680 ip. (0,5 mg/Kg) hanno avuto, a partire dalla seconda settimana di esperimento, un importante calo ponderale che si è mantenuto costante nel tempo fino al momento del sacrificio, come mostrato in Figura 1. A parte la perdita di peso, le condizioni generali degli animali sono rimaste tuttavia soddisfacenti.

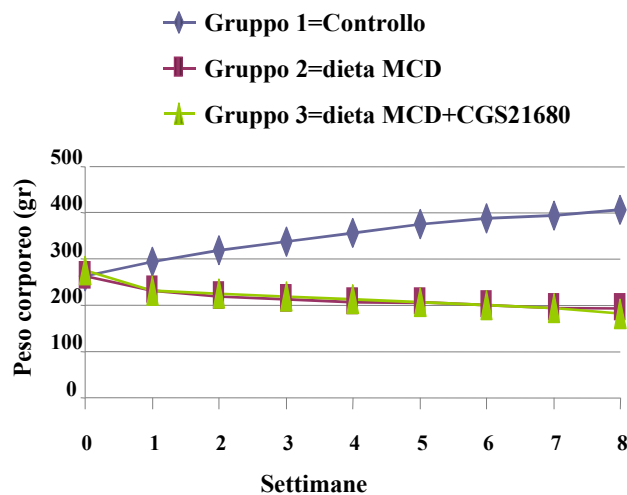


Fig.1 Monitoraggio del peso corporeo dei ratti durante le 8 settimane di dieta. Gruppo 1= Controllo, Gruppo 2= dieta MCD per 8 settimane e Gruppo 3= dieta MCD per 8 settimane con somministrazione di CGS21680 ip. (0,5 mg/Kg) a partire dalla seconda settimana.

Valutazione della capacità dell'adenosina di inibire l'evoluzione della steatosi in steatoepatite.

La valutazione del danno epatico è stata in una prima fase determinata dosando i livelli sierici di ALT. Come mostra la Figura 2, i livelli sierici di ALT aumentano in maniera significativa nel Gruppo trattato con la dieta MCD rispetto al Gruppo Controllo. Il trattamento con l'agonista specifico dei recettori A_{2A} CGS21680 ha invece prodotto un'evidente riduzione dei livelli di ALT circolanti.

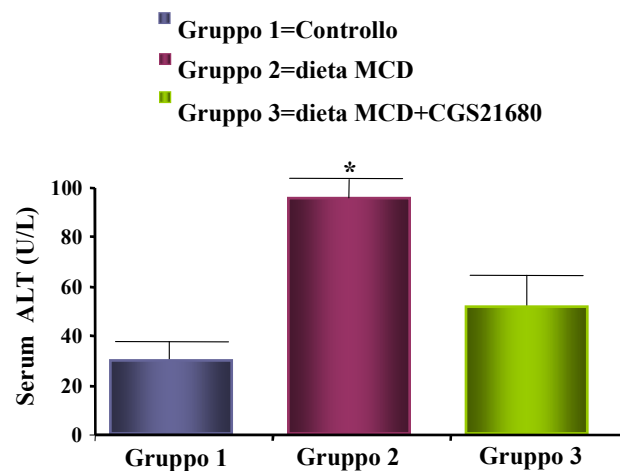


Fig.2 Dosaggio dei livelli sierici di alanina amino transferasi (ALT). Dosaggio sierico di ALT nel Gruppo1=Controllo, Gruppo 2=dieta MCD 8 settimane e Gruppo 3=dieta MCD 8 settimane trattato con CGS21680 ip. (0,5 mg/Kg) dalla fine della seconda settimana. Significatività statistica: *p<0.01 Gruppo 2 vs Gruppo 1.

L'analisi di tipo istologico di sezioni di fegato dimostra un evidente aumento della steatosi micro-macrovescicolare rilevabile già a partire dalle due settimane di dieta (non mostrato). L'analisi istologica all'ottava settimana di dieta dimostra un'evoluzione verso un severo danno epatico con presenza di necrosi coagulativa (Fig. 3 A). Il trattamento con CGS21680 dalla seconda settimana di dieta risulta prevenire completamente le lesioni istologiche del fegato senza interferire con la comparsa di steatosi (Fig. 3 A).

Nelle stesse sezioni di fegato, l'analisi TUNEL ha permesso di valutare la presenza di epatociti apoptotici quantificando la frammentazione del DNA, marker delle cellule apoptotiche. Come mostrano le Figure 3B-3C, la dieta MCD somministrata per 8 settimane al Gruppo2 aumenta di circa 3 volte l'indice di morte apoptotica degli epatociti rispetto al

Gruppo 1 Controllo, mentre il trattamento con il CGS21680 abbassa i livelli di apoptosi di circa 2,5 volte rispetto al Gruppo 2 trattato con la dieta MCD.

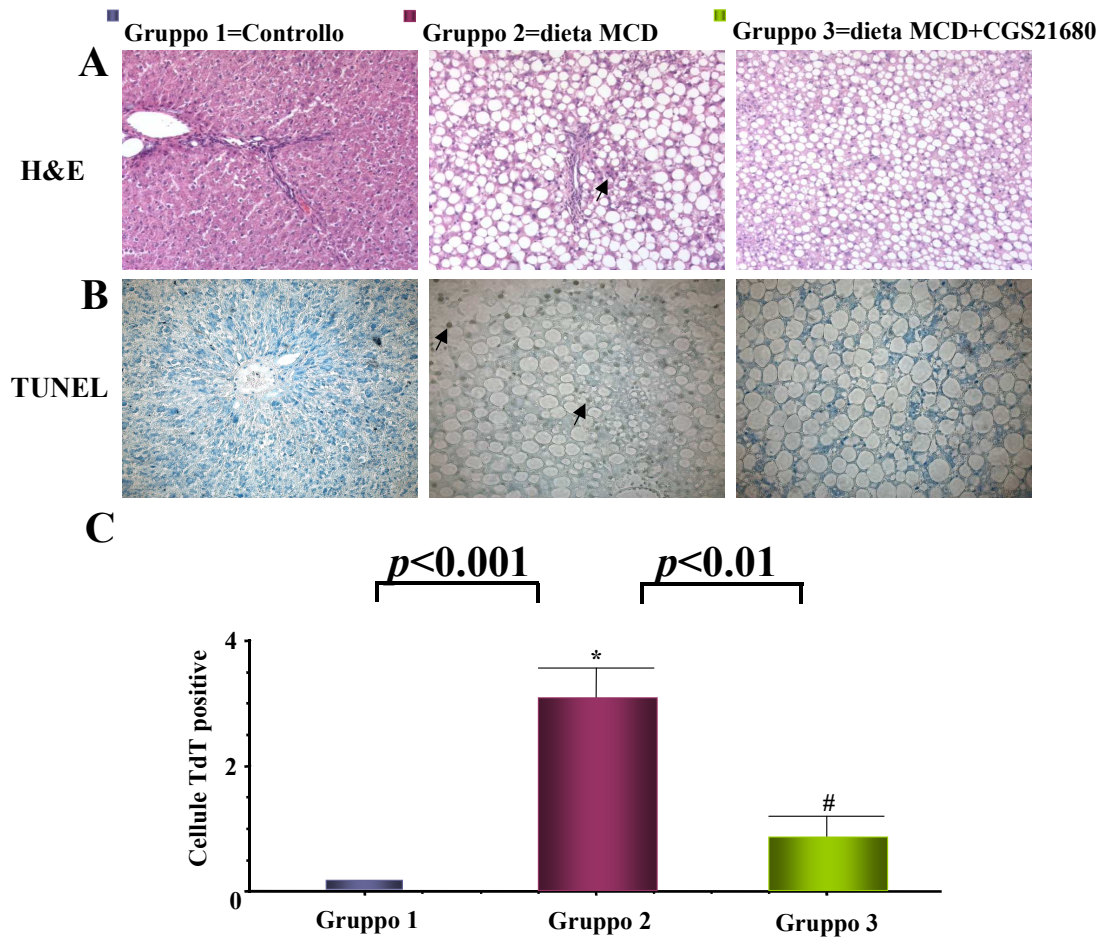


Fig.3 Il trattamento con CGS21680 ip. (0,5 mg/Kg) attenua il danno steatosico MCD-dipendente. Immagini rappresentative di: 3A Colorazione con Ematossilina-Eosina: evidenzia le lesioni epatiche (ingrandimento 20X), 3B Colorazione TUNEL: mostra il danno apoptotico (aree marroni tondeggianti) (ingrandimento 40X), 3C Quantificazione dell'apoptosi: i risultati di ogni sezione sono espressi come media delle cellule positive alla colorazione TUNEL \pm D.S.. Significatività statistica: * $p < 0.001$ Gruppo2 vs Gruppo 1; # $p < 0.01$ Gruppo3 vs Gruppo2.

Mediatori molecolari coinvolti nella steatosi epatica indotta dalla dieta MCD.

I risultati ottenuti l'anno precedente hanno dimostrato il coinvolgimento delle chinasi JNK e SEK1/MKK4 nello sviluppo nel danno lipotossico degli eaptociti. In questa seconda parte di progetto abbiamo quindi voluto verificare l'attivazione dei mediatori di danno lipoapoptotico anche nel modello *in vivo* di steatoepatite.

Come mostrato in Figura 4A, la forma fosforilata di JNK aumenta in maniera evidente nel Gruppo2 dei ratti trattati solo con la dieta MCD rispetto al Gruppo1 Controllo. Al contrario, la somministrazione di CGS21680 riduce nettamente l'attivazione di JNK.

Poiché l'attivazione dei recettori A_{2A} dell'adenosina da parte del CGS21680 conduce alla successiva stimolazione di PI3K/Akt e, a sua volta, la PI3K risulta coinvolta nella regolazione negativa della chinasi MKK4/SEK1, chinasi attivatoria di JNK, abbiamo valutato l'attivazione della PI3-K tramite lo studio della fosforilazione in Ser⁴⁷³ di Akt.

Come mostrato in Figura 4 B, il livello di fosforilazione di Akt risulta essere più elevato in seguito a trattamento con CGS21680 rispetto al Gruppo1 Controllo ed al Gruppo2 trattato con la dieta MCD.

I nostri dati indicano inoltre che la steatoepatite sviluppata nel fegato dei ratti del Gruppo2 è associata all'attivazione di JNK dipendente da SEK1, infatti la sola dieta MCD è in grado di indurre la fosforilazione attivatoria in Ser²⁵⁷ e Thr²⁶¹ di SEK1 (Fig.4C), mentre (Fig. 4D) nel Gruppo 3 si osserva un aumento della fosforilazione inibitoria in Ser⁸⁰ di SEK1.

Questi dati suggeriscono che, come osservato nel modello *in vitro*, l'inibizione PI3K-dipendente di SEK1 e quindi di JNK determina l'effetto epatoprotettivo del CGS21680.

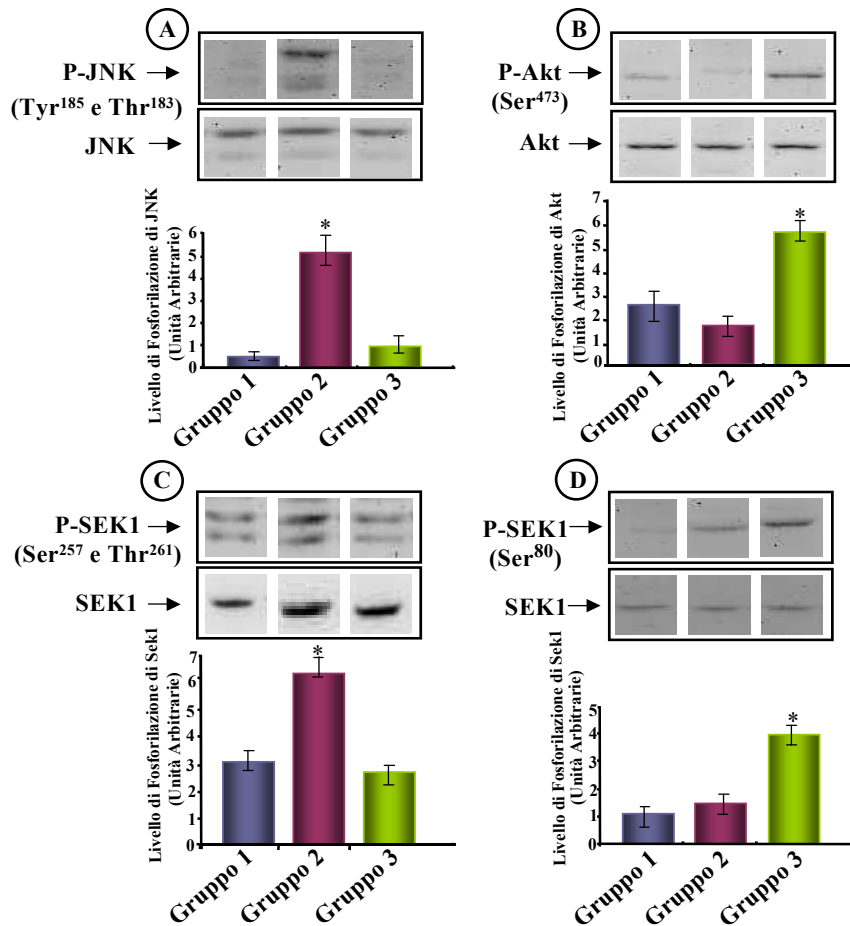


Fig.4 Mediatori molecolari regolati dal CGS21680 in seguito al trattamento con dieta MCD. **4A** L'attivazione di JNK è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata della JNK su omogenati di fegato di ratto; **4B** L'attivazione di PKB/Akt è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata di Akt su omogenati di fegato di ratto; **4C** La fosforilazione attivatoria di SEK1 in Ser²⁵⁷ e Thr²⁶¹ è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata di SEK1 su omogenati di fegato di ratto. **4D** La presenza della fosforilazione inibitoria di SEK1 in Ser⁸⁰ è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata di SEK1 su omogenati di fegato di ratto. 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. Significatività statistica: * $p < 0.01$ vs Gruppo1. I pannelli 4 A, B, C e D sono immagini rappresentative.

CONCLUSIONI

L'impiego di una dieta deficiente in colina e metionina (dieta MCD) determina nel topo e nel ratto steatosi associata ad infiammazione e fibrosi, creando un quadro patologico del tutto assimilabile alle forme più gravi di steatoepatite dell'uomo (41,42). Usando tale modello, nel nostro laboratorio abbiamo voluto valutare gli effetti del trattamento con l'agonista dei recettori A_{2A} dell'adenosina CGS21680 somministrato intraperitonealmente in ratti maschi di ceppo Wistar a partire dalla seconda settimana di dieta MCD, determinando la sua capacità di modulare la progressione della steatosi a steatoepatite.

I nostri esperimenti mostrano che i ratti sviluppano steatosi a partire dalla seconda settimana di dieta con evoluzione a steatoepatite all'ottava settimana, come evidenziato da un significativo aumento delle transaminasi in circolo, dalla comparsa di lesioni istologiche e dall'apoptosi degli epatociti.

Le nostre ricerche hanno inoltre mostrato che la stimolazione dei recettori A_{2A} dell'adenosina è in grado di prevenire queste alterazioni, determinando di fatto un'attenuata progressione della steatosi in steatoepatite.

La verifica nel nostro modello *in vivo* di steatoepatite dell'attivazione dei mediatori della lipoapoptosi evidenziati lo scorso anno nei modelli cellulari ha confermato che l'effetto protettivo del CGS21680 è associato all'inibizione dell'attività della chinasi JNK e SEK1.

I nostri dati hanno anche evidenziato che tale effetto è associato all'attivazione di Akt, un mediatore centrale della sopravvivenza mediata dall'adenosina.

In conclusione, i nostri risultati evidenziano per la prima volta l'adenosina come fattore citoprotettivo contro l'effetto lipotossico indotto dalla dieta MCD e suggeriscono l'impiego dell'adenosina come nuovo agente terapeutico per la prevenzione della NASH.

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. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. *J Hepatol*. 2010 Aug; 53(2):372-84. Epub 2010 May 7.
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.
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. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. Malhi H, Gores GJ. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1641-54. Review.
15. 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.
16. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. Larter CZ, Yeh MM. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Nov;23(11):1635-48.
17. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. Veteläinen R, van Vliet A, van Gulik TM. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Sep;22(9):1526-33.
18. The treatment with antibody of TNF-alpha reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet. Koca SS, Bahcecioglu IH, Poyrazoglu OK, Ozercan IH, Sahin K, Ustundag B. *Inflammation*. 2008 Apr;31(2):91-8. Epub 2007 Dec 8.
19. Polyunsaturated fat in the methionine-choline-deficient diet influences hepatic inflammation but not hepatocellular injury. Lee GS, Yan JS, Ng RK, Kakar S, Maher JJ. *J Lipid Res*. 2007 Aug;48(8):1885-96. Epub 2007 May 27.
20. Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats. Romestaing C, Piquet MA, Bedu E, Rouleau V, Dautresme M, Hourmand-Ollivier I, Filippi C, Duchamp C, Sibille B. *Nutr Metab (Lond)*. 2007 Feb 21;4:4.

21. 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.
22. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. Unger RH, Orci L. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 30;1585(2-3):202-12. Review.
23. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, Czaja MJ. *Hepatology*. 2006 Jan;43(1):163-72.
24. 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.
25. 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.
26. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Davis RJ. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):239-52. Review. No abstract available.
27. The JNK signal transduction pathway. Weston CR, Davis RJ. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Apr;19(2):142-9. Epub 2007 Feb 15. Review.
28. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4). Cuenda A. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000 Jun;32(6):581-7. Review.
29. Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. Whitmarsh AJ, Davis RJ. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3172-84. Review.
30. 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.
31. 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.
32. 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.

33. 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.
34. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. Carini R, Albano E. *Gastroenterology*. 2003 Nov;125(5):1480-91. Review.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. Gomez G, Sitkovsky MV. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4472-8. Epub 2003 Aug 28.
39. Different apoptosis modalities in periprosthetic membranes. Sabbatini M, Piffanelli V, Boccafoschi F, Gatti S, Renò F, Bosetti M, Leigheb M, Massè A, Cannas M. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Jan;92(1):175-84.
40. A simplification of the protein assay method of Lowry, which is more generally applicable. Peterson GL. *Anal Biochem*. 1977;83:346-356.
41. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. Dela Peña A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. *Gastroenterology*. 2005 Nov;129(5):1663-74.
42. Protective effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental nonalcoholic steatohepatitis model. Ustundag B, Bahcecioglu IH, Sahin K, Duzgun S, Koca S, Gulcu F, Ozercan IH. *Dig Dis Sci*. 2007 Aug;52(8):2006-14.

SEMINARI 2009/2010

- 14 ottobre 2009: "Regolazione del metabolismo del ferro: nuove acquisizioni" tenuto dalla Prof.ssa C. Camaschella, Università Vita-Salute e IRCCS San Raffaele, Milano.
- 17 novembre 2009: "ALK e tumorigenesi" tenuto dal Prof. Giorgio Inghirami, Università di Torino.
- 30 novembre 2009 : "Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression" tenuto dal Prof. Nicolas Mermod Institute of Biotechnology, University of Lausanne, Switzerland.
- 14 dicembre 2009: "Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare" tenuto da Fabio Grassi, Università di Milano.
- 14 gennaio 2010: "Clinical significance of Antinuclear Antibodies in Autoimmune liver disease" tenuto dal Prof. Pietro Invernizzi, Dep. of Internal Medicine, IRRCS, Istituto Clinico Humanitas (Milano).
- 21 gennaio 2010 : "Cellule mesenchimali stromali fetali ed adulte: potenziali applicazioni in patologie ischemiche" tenuto dal Prof. Giulio Alessandri, UO-UCV Neurobiologia Cellulare, Dipartimento di Malattie Cerebrovascolari, IRCCS Carlo Besta (Milano).
- 28 gennaio 2010: "Dal difetto genetico all'inflammatione" tenuto dal Prof. Luigi Maiuri, Università di Foggia.
- 11 febbraio 2010: "A novel antiviral mechanism mediated by the chemokine receptor CCR6" tenuto dal Prof. Alfredo Garzino-Demo Biotechnology Institute, University of Maryland (USA).

- 17 febbraio 2010:"Computational analysis of protein-protein interactions" tenuto dal Prof. Stefano Pieraccini, Dipartimento di Chimica Fisica ed Elettrochimica Università di Milano.
- 9 febbraio 2010:"R & D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs" tenuto dal Dott. Giovanni Baldi, Colorobbia Italia Ce.Ri.Col Centro di Ricerche Colorobbia, Vinci (Fi).
- 17 febbraio 2010:"Computational analysis of protein-protein interactions" tenuto dal Prof. Stefano Pieraccini, Dipartimento di Chimica Fisica ed Elettrochimica Università di Milano.
- 4 marzo 2010:"I virus dell'influenza: aspetti patogenetici, epidemiologici e preventivi" tenuto dal Prof.ssa Alberta Azzi, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Firenze.
- 3 marzo 2010:"Basi genetiche del diabete di tipo 1 e della sclerosi multipla: l'esempio della popolazione sarda. tenuto dal Prof. Francesco Cucca, Istituto di Neurogenetica e Neurofarmacologia, CNR, Cittadella Universitaria, Moserrato (CA) e Università di Sassari.

Prof. Steve Ellis, Visiting Professor proveniente dall' Università di Louisville (USA), ha tenuto una serie di 3 lezioni/seminari rivolti ai dottorandi nelle seguenti date:

- venerdì 5 marzo ore 14,30:The Wonders of Yeast: Yeast as a Model Organism
- lunedì 8 marzo ore 14,30: Chromosome 5q deletions in MDS: Genotype/Phenotype Relationships
- martedì 9 marzo ore 14,30: Dasatinib: Transforming an adverse event into a new therapeutic target .
- 6 maggio 2010: "The Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Disease" tenuto dal Dr. John Doorbar, Division of Virology, MRC, National Institute for Medical Research, (London-UK).

- 26 maggio 2010:"Prediction of RNA-RNA interaction" tenuto dal Dr. Hakim Tafer, Bioinformatics Group Department of Computer Science and Interdisciplinary Center for Bioinformatics University of Leipzig – Germany.
- 4 giugno 2010: "Functional nanocomposite for pharmaceutical application from physicochemical viewpoints", tenuto dal Prof. Mamoru, SENNA RIKEN Innovation Center, Wako, Japan.
- 14 giugno 2010:"Fenotipo e cellule staminali tumorali nei gliomi maligni", tenuto da Davide Schiffer Ph.D. M.D. Professore Emerito di Neurologia, Università di Torino Direttore Centro di Neuro-Bio-oncologia della Fondazione Policlinico di Monza-Vercelli.
- 15 giugno 2010:"Nuove strategie anticancro: i microRNA come agenti differenziativi per i tumori solidi", tenuto dalla Prof.ssa Carola Ponzetto, dell'Università di Torino.
- 17 giugno 2010:"Combating Bioterrorism: New Antidotes for an Old Poison", tenuto dal Prof. Steve Ellis, Università di Louisville (USA).
- 30 giugno 2010:"Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma", tenuto dal Prof. Franco Novelli, Università di Torino.
- 6 settembre 2010:"Ruolo delle microvescicole nella comunicazione tra cellule", tenuto da Giovanni Camussi, Università di Torino.
- 17 settembre 2010: "Prevention and cure of autochthonous mammary carcinomas in her2 transgenic mice", tenuto da Federica Cavallo, Università di Torino.
- 22 settembre 2010:"Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica", tenuto dal Dr. Ruggero DE MARIA, Istituto Superiore di Sanità.

- 23 settembre 2010: "Preventing Persisters: Targeting Epigenetic Changes in Cancer Chemotherapy", tenuto dal Dr. Steven R. Ellis, University of Louisville, Kentucky, USA.

ATTIVITÀ FORMATIVA

Terzo anno

Durante questo terzo anno di dottorato, oltre al mio progetto, ho partecipato alla realizzazione anche di altri progetti seguiti dal mio gruppo di lavoro, quali:

- 1) Studi *in vivo* sullo sviluppo del Post-condizionamento epatico.
- 2) Studio del ruolo dell'espressione dell'Anidrasi Carbonica IX nella resistenza al danno da ipossia in cellule tumorali.

CORSI FREQUENTATI:

Terzo anno

All'interno del Journal Club per dottorandi, il 9 Luglio 2010 ho tenuto il seminario dal titolo: "Fat and Hepatocellular Carcinoma", nell'ambito del ciclo di seminari di oncologia per il dottorato aperto da alcune lezioni introduttive tenute dal Prof.re E. Albano.

CONGRESSI FREQUENTATI:

Terzo anno

Ho partecipato al congresso:

EASL Monothematic conference, February 18-20, 2010 Amsterdam, Netherlands.

E' stato inviato l'Abstract dal titolo: **"Adenosine A2a receptor stimulation prevents hepatocyte lipotoxicity through a PI3-kinase dependent inhibition of MKK4/SEK1-induced JNK activation."**, C. Imarisio, E. Alchera, C. Dal Ponte, E. Albano and R. Carini.

Comunicazione presentata personalmente (poster):

"Adenosine A2a receptor stimulation prevents hepatocyte lipotoxicity through a PI3-kinase dependent inhibition of MKK4/SEK1-induced JNK activation", C Imarisio, E Alchera, C Dal Ponte, E Albano and R Carini. EASL Monothematic conference, February 18-20, 2010 Amsterdam, Netherlands, Poster Session.

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:

Terzo anno

G Baldanzi, E Alchera, C Imarisio, M Gaggianesi, C Dal Ponte, P Nitti, C Domenicotti, W J. van Blitterswijk, E Albano, A Graziani and R Carini; **Negative regulation of diacylglycerol kinase theta mediates adenosine-dependent hepatocyte preconditioning.** CDD 2009, doi:10.1038/cdd.2009.210.

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:**Terzo anno**

C Imarisio, E Alchera, C Dal Ponte, E Albano and R Carini; **Adenosine A2a receptor stimulation prevents hepatocyte lipotoxicity through a PI3-kinase dependent inhibition of MKK4/SEK1-induced JNK activation**, EASL Monothematic conference, February 18-20, 2010 Amsterdam, Netherlands, Poster Session.

C Dal Ponte, E Alchera, C Imarisio, E Albano and R Carini; **Pharmacological post-conditioning by chemical inhibition of PTEN protects re-oxygenation damage of rat hepatocytes: role of PI3-kinase and ERK1/2 activation**, EASL Monothematic conference, February 18-20, 2010 Amsterdam, Netherlands, Poster Session.

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.*