

**Università degli Studi del Piemonte Orientale**  
**“Amedeo Avogadro”**

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**  
**Dipartimento di Scienze Mediche**



**Dottorato di Ricerca in**

**MEDICINA MOLECOLARE**

*Ciclo XXIII*

**TESI DI DOTTORATO**

**La stimolazione dei recettori A2aR dell'adenosina  
previene nel ratto la lipoapoptosi degli epatociti e la  
progressione della steatosi epatica a steatoepatite**

**Coordinatore: Chiar.mo Prof. Dianzani Umberto**

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

**Candidata: Imarisio Chiara**

**ANNO ACCADEMICO 2009/2010**

## SOMMARIO

1)	RIASSUNTO.....	4
2)	INTRODUZIONE.....	6
2.1	Steatosi epatica.....	6
2.2	Modelli animali di steatoepatite.....	9
2.3	Lipotossicità e Lipoapoptosi.....	10
2.4	c-jun-NH <sub>2</sub> -terminal kinase (JNK).....	13
2.5	Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4).....	15
2.6	Protein Kinase B (PKB/ Akt).....	17
2.7	Precondizionamento ischemico ed effetto epatoprotettivo della stimolazione dei recettori A <sub>2a</sub> R dell'adenosina.....	18
3)	SCOPO DEL LAVORO.....	21
4)	MATERIALI E METODI.....	22
4.1	Materiali.....	22
	“In vitro”.....	23
4.2	Cellule.....	23
4.3	Isolamento, coltura e trattamenti degli epatociti.....	23
4.4	Colorazione e quantificazione dell'accumulo lipidico intracellulare tramite saggio Oil Red O (ORO).....	25
4.5	Valutazione dell'apoptosi.....	26
	“In Vivo”.....	27
4.6	Animali.....	27
4.7	Descrizione del protocollo sperimentale applicato.....	27
4.8	Prelievo di sangue ed isolamento del siero.....	28
4.9	Prelievo dei tessuti.....	28
4.10	Dosaggio delle transaminasi.....	29
4.11	Valutazione delle sezioni epatiche.....	29
4.12	Identificazione delle cellule apoptotiche tramite colorazione TUNEL.....	30
4.13	Preparazione dei campioni per l'analisi in Western Blotting.....	30
	“In vitro” & “In vivo”.....	31

4.14	Analisi dello stato di fosforilazione delle chinasi SAPK/JNK, PKB/Akt e MKK4/SEK1 e dello stato di attivazione della Caspasi 3.....	31
4.15	Analisi dei dati.....	32
5)	RISULTATI.....	33
5.1	La stimolazione dei recettori A2a dell'adenosina con CGS21680 protegge gli epatociti dalla lipoapoptosi senza modulare la steatosi.....	33
5.2	Meccanismi molecolari implicati nella protezione del CGS21680 dalla lipoapoptosi.....	38
5.3	Il CGS21680 diminuisce l'apoptosi epatica ed i segnali pro-lipoapoptotici nei fegati di ratto alimentati con dieta MCD .....	43
5.4	Il CGS21680 previene la progressione della NAFLD in NASH.....	48
6)	DISCUSSIONE .....	51
7)	CONCLUSIONI.....	55
8)	BIBLIOGRAFIA .....	57

## 1) RIASSUNTO

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) rappresenta la principale alterazione del fegato nella popolazione occidentale e può progredire verso la steatoepatite non alcolica (NASH) con perdita progressiva ed irreversibile della funzionalità epatica. Questa sindrome è associata ad elevati livelli sierici di acidi grassi liberi ed a lipoapoptosi degli epatociti.

L'adenosina è il principale induttore degli effetti epatoprotettivi del preconditionamento epatico. Il suo rilascio indotto da una breve ipossia non letale attiva, a seguito dell'interazione con i recettori A2a (A2aR) degli epatociti, una cascata di mediatori intracellulari che aumentano la resistenza degli epatociti alla morte cellulare. Tali mediatori includono, fra gli altri, la fosfatidil-inositolo-3 chinasi (PI3K).

In questo lavoro abbiamo messo a punto un modello *in vitro* di steatosi epatica utilizzando epatociti primari di ratto trattati con acido stearico (SA).

I nostri dati dimostrano che l'acido stearico comporta un accumulo lipidico intracellulare responsabile della morte per apoptosi degli epatociti dipendente dalla chinasi JNK. I nostri risultati evidenziano inoltre che l'effetto pro-apoptotico dell'SA è associato all'attivazione di SEK1/MKK4, un enzima implicato nella regolazione di JNK. Il trattamento con CGS21680, un agonista specifico dei recettori A2aR, riduce in modo significativo l'apoptosi indotta da acido stearico. Tale azione protettiva è correlata all'attivazione di PI3K/Akt ed alla contemporanea inibizione di JNK. La somministrazione di CGS21680 produce, inoltre, l'inibizione di SEK1/MKK4 con conseguente annullamento dell'attivazione di JNK. L'inibizione di PI3K con wortmannina abolisce l'inibizione di SEK1/MKK4 e ripristina l'attivazione di JNK annullando la citoprotezione indotta dal CGS21680.

Nella seconda parte del lavoro abbiamo verificato i risultati ottenuti nel modello cellulare anche nel fegato *in vivo*, somministrando a ratti maschi di ceppo Wistar la dieta MCD (carente in metionina e colina). Abbiamo visto

che tale dieta induce a partire dalla prima-seconda settimana un quadro di steatosi epatica che si evolve dalla settima-ottava settimana in steatoepatite con presenza di necro-infiammazione, apoptosi epatocitaria e rilascio di transaminasi. Il trattamento *in vivo* con CGS21680 a partire da due settimane dall'inizio della dieta, riduce significativamente la comparsa del danno epatico e dell'apoptosi senza interferire con l'induzione della steatosi. Tale effetto si accompagna all'attivazione della PI3K, alla inibizione della stimolazione di JNK ed alla comparsa della fosforilazione inibitoria di SEK1/MKK4.

Concludendo, i nostri risultati mostrano che il trattamento con acido stearico causa la morte apoptotica negli epatociti in seguito ad un aumento dell'attività di SEK1/MKK4 con conseguente stimolazione di JNK. I nostri dati evidenziano, inoltre, che la stimolazione dei recettori A2a dell'adenosina è in grado di prevenire il danno lipotossico degli epatociti e la progressione della NAFLD a NASH e che tali effetti sono associati all'annullamento dell'attivazione di JNK conseguente all'azione inibitoria di PI3K su SEK1/MKK4. Queste osservazioni indicano le potenzialità dell'adenosina come nuovo agente terapeutico in grado di attenuare la tossicità degli acidi grassi liberi e rappresentano la base per lo sviluppo di interventi farmacologici per i pazienti affetti da NAFLD.

## 2) INTRODUZIONE

### 2.1 Steatosi epatica

La Steatosi Epatica (SE) è dovuta ad un accumulo di grasso, per lo più sottoforma di trigliceridi, all'interno delle cellule del tessuto epatico. 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 lipidiche di piccole dimensioni nelle cellule che assumono un aspetto schiumoso e mantengono i nuclei in posizione centrale. Un paziente si considera affetto da steatosi epatica quando la quantità di lipidi del fegato supera del 5% il peso totale dell'organo (1).

Nei Paesi Occidentali la degenerazione grassa rappresenta la principale alterazione del fegato nella popolazione generale. La frequenza di tale alterazione risulta correlata 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-Syndrome) associata 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  $\beta$ -ossidazione non siano più sufficienti a controbilanciare l'eccessivo accumulo di grassi negli epatociti, determinando così 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 "hits" 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. La morte cellulare per apoptosi degli epatociti può esplicarsi sia per via estrinseca che per 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 (14).

Una volta innescato il pathway apoptotico, avviene la permeabilizzazione mitocondriale con fuoriuscita nel citosol del citocromo *c* e l'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 da parte 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). Questi risultati hanno quindi permesso di identificare la NASH come una malattia proapoptotica che, attraverso la morte programmata, progredisce nella sua gravità fino alla definitiva perdita di funzione dell'organo.

## 2.2 Modelli animali di steatoepatite

L'utilizzo di specifici modelli animali ha permesso di studiare in maniera più approfondita i fattori associati all'evoluzione della steatosi epatica in steatoepatite (15). Tra quelli di tipo genetico troviamo modelli 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 con diabete di tipo2 (15). Ulteriori modelli 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 (15). Oltre a questi modelli genetici, ve ne sono attualmente disponibili altri dove la steatoepatite è dovuta ad una condizione di over-nutrizione che spesso si associa allo 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 (15). Sono in fine disponibili modelli in cui il danno epatico è dovuto ad una dieta colina (CD) o colina-metionina (MCD) carente (16). 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 (17). Ad oggi il modello di riferimento per lo studio della steatoepatite è quello metionina-colina carente in quanto in grado di indurre rapidamente steatosi seguita da necro-infiammazione e fibrosi epatica (18,19).

### 2.3 Lipotossicità e Lipoapoptosi

L'obesità determina un accumulo elevato e progressivo 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 ma, in caso di obesità, i TG aumentano in maniera eccessiva anche in questi organi inducendo danno e morte cellulare ed alterandone così la funzionalità. Tale processo è conosciuto con il nome di lipotossicità (3,5).

Il fegato affetto da NASH risente tipicamente 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 (20); da allora, il termine lipoapoptosi è entrato comunemente in uso per definire le forme di apoptosi non familiari causate da un elevato accumulo di acidi grassi liberi (Free Fatty Acids, FFAs) nei tessuti non adiposi (19).

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 (Short Chain Fatty

Acids; SCFA) fino a 4 atomi di carbonio di cui il principale è l'acido butirrico (4:0); (b) acidi grassi a catena media (Medium Chain Fatty Acids; MCFA) fino a 12 atomi di (acido caproico 6:0, acido caprilico 8:0, acido caprico 10:0, acido laurico 12:0); (c) acidi grassi a lunga catena (Long Chain Fatty Acids; LCFA) fino a 18 atomi di carbonio 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  $\omega$ -9) con funzione ipocolesterolemizzante; (c3) LCFA polinsaturi essenziali (acido linoleico 18:2  $\omega$ -6 e acido linolenico 18:3  $\omega$ -3); (d) acidi grassi a catena molto lunga (Very Long Chain Fatty Acids; VLCFA) da 20 atomi di carbonio in poi ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6,  $\omega$ -9) ed i loro derivati prostaglandine, trombossani e leucotrieni.

In letteratura, molti lavori 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 (Fatty Acid Transport Protein; 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), in mancanza della quale gli epatociti sono protetti dall'accumulo eccessivo di TG indotto da acidi grassi saturi (4).

Negli epatociti, gli acidi grassi saturi come l'acido palmitico e stearico risultano 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 modulata da una MAP chinasi sensibile allo stress intracellulare, la c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal Chinasi (JNK) (10).

JNK è nota per rivestire un ruolo importante sia nella comparsa della NAFLD che della NASH (12). Per quanto riguarda la NAFLD, un aumento dell'attività di JNK può promuovere l'IR correlata alla steatosi epatica. Per

quanto riguarda la NASH, l'attivazione di JNK si è dimostrata associata allo sviluppo della NASH stessa, poiché contribuisce alla cronicizzazione dell'infiammazione necessaria alla progressione della steatoepatite (21).

## 2.4 c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK)

La c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal Chinasi (JNK), conosciuta anche come chinasi attivata dallo stress (Stress Activated Protein Kinase; SAPK), appartiene alla famiglia di proteine Serina-Treonina chinasi intracellulari attivate da stimoli mitogeni (Mitogen Activated Protein; 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 (22). 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 (22) ed, a seconda della natura dello stimolo ricevuto, regola motilità, metabolismo o riparo del DNA. E' stato infatti dimostrato che se la JNK è attivata in maniera transiente ha un effetto citoprotettivo, mentre se la sua attivazione si protrae nel tempo è responsabile di morte cellulare (23).

Informazioni più dettagliate sulle funzioni che la JNK ha all'interno della cellula sono state ottenute in seguito alla determinazione della sua struttura atomica (24).

La JNK ha una struttura tridimensionale simile alle altre MAPK. Tale struttura è costituita dai due domini NH<sub>2</sub> 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 (25). Al contrario, in presenza di fattori di crescita, stress o citochine la JNK viene

attivata in seguito ad una cascata di segnalamento che inizia con MAP chinasi chinasi chinasi (MAP3K) che fosforilano ed attivano a loro volta 2 isoforme distinte di MAP chinasi chinasi (MAP2K), MKK4 e MKK7, che fosforilano JNK (25,26).

L'attivazione di SAPK/JNK richiede una doppia fosforilazione indotta rispettivamente dalla SEK1/MKK4 ed della MKK7 chinasi nel motivo conservato Thr-Pro-Tyr situato nell'Activation-Loop a livello dei residui Tyr<sup>185</sup> e Thr<sup>183</sup>. 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 (25).

Il principale bersaglio d'azione della JNK è c-jun, una delle due subunità del fattore di trascrizione eterodimerico proteina1-attivatoria (activator protein-1; AP-1). JNK fosforila c-jun ai residui NH<sub>2</sub>-terminali Ser<sup>63-73</sup> in risposta ad irradiazioni UV o a stimoli di stress (27). 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 (27). In particolare, è stato osservato che JNK può mediare la fosforilazione del fattore antiapoptotico Bcl-2 inattivandolo e promuovendo l'apoptosi. In alternativa è stato riportato che JNK può mediare l'attivazione del fattore pro-apoptotico Bax determinando il rilascio del citocromo c e la conseguente attivazione delle caspasi 9 e 3 con successiva morte per apoptosi (15).

## 2.5 Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)

Nel paragrafo precedente abbiamo riportato che JNK può essere attivata attraverso una doppia fosforilazione ad opera delle chinasi MKK4 e MKK7.

Diversi studi hanno dimostrato che tra le due isoforme di MAP chinasi chinasi, quella maggiormente espressa nel fegato è MKK4. MKK4 è già rilevabile a partire dal 12° embrionic day (E12), ed è coinvolta nella regolazione dello sviluppo embrionale del fegato. Al contrario, la quantità di MKK7 è mantenuta a livelli trascurabili (28,29).

MKK4, conosciuta anche come JNKK1, è stata per la prima volta clonata nel 1994 in topo e denominata proteina/Erk attivata dallo stress1 (Stress-Activated Protein/Erk Kinase1; SEK1). Successivamente questo enzima è stato clonato nell'uomo e denominato MKK4 (28,29).

MKK4 è una proteina di 399 aminoacidi localizzata sul Cromosoma 17. L'analisi della struttura cristallizzata ha rivelato che le MKK sono formate da un piccolo foglietto  $\beta$  all'N-terminale ed un'ampia  $\alpha$ -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  $\text{NH}_2$  -COOH terminali (29).

Per quanto riguarda i meccanismi molecolari di attivazione di MKK4, è stato dimostrato che 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 Ser<sup>257</sup> e Thr<sup>261</sup>, che, se mutati, aboliscono l'attivazione di MKK4 (28).

Tra le varie MKKK che regolano l'attività di MKK4 quelle più importanti sono MEKKs, MLKs, TAK1 e ASK1 (24), che legano MKK4 al dominio DVD al suo C-terminale (29).

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, una volta attiva e libera nel citosol, interagisce in maniera specifica con JNK fosforilandola attraverso la formazione di un complesso tra il D-domain (D) all' N-terminale di MKK4 e JNK che, una volta sciolto, permette a JNK attiva di agire sui suoi substrati più a valle (30).

Dati in letteratura mostrano che 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) (29,30).

Per quanto riguarda i meccanismi di regolazione negativa di MKK4, gli studi disponibili sono più limitati. Una ricerca del 2000 di Park et al. (31), volta ad approfondire ed identificare nuovi target cellulari del fattore di sopravvivenza Akt, ha dimostrato che la chinasi Akt può rivestire il ruolo di regolatore negativo di MKK4.

E' infatti emerso che Akt è in grado di interagire 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 (31).

## 2.6 Protein Kinase B (PKB/Akt)

PKB/Akt è una serina-treonina chinasi effettrice a valle della fosfatidilinositolo 3 chinasi PI(3)K. Akt ha, nei mammiferi, 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, responsabile dell'attività chinastica, 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 1 fosfoinositidi-dipendente (3-phosphoinositide-dependent protein kinase1; PDK1) che aggiunge un fosfato sulla Thr del dominio catalitico di Akt.

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 risulta avere un ruolo centrale nel promuovere la sopravvivenza cellulare fosforilando e quindi inibendo varie proteine proapoptotiche come Bad, la famiglia di fattori di trascrizione Forkhead, la caspasi 9 e Ask1 (31). In questo ambito è interessante rimarcare che Akt è in grado di regolare la risposta a segnali di stress extracellulari attraverso la fosforilazione inibitoria di MKK4-SEK1 inibendo così gli effetti proapoptotici della chinasi JNK (31).

## 2.7 Precondizionamento ischemico ed effetto epatoprotettivo della stimolazione dei recettori A2aR dell'adenosina

La scoperta che l'esposizione dei tessuti ad una breve ischemia-riperfusion (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 precondizionamento 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 (32).

Il precondizionamento ischemico del fegato tramite una breve interruzione (5-10 minuti) del flusso ematico seguita da 10-15 minuti di ri-perfusione, è stato eseguito per la prima volta su fegati di topi e ratti ed ha dimostrato la sua capacità di ridurre il danno epatico indotto da una successiva esposizione ad un periodo prolungato di ischemia seguita da ri-perfusione (33).

Studi condotti *in vivo* ed *in vitro* hanno chiaramente stabilito che gli effetti protettivi del PC ischemico sono per la maggior parte mediati dal rilascio di adenosina nel mezzo extracellulare ed alla conseguente stimolazione dei recettori dell'adenosina A2a (A2aR) (34). In particolare, studi di Peralta e coll. hanno dimostrato che il trattamento con adenosina riproduce gli effetti protettivi del PC ischemico e che tale effetto è annullato dall'uso dell'adenosina deaminasi e dall'antagonista specifico dei recettori A2a dell'adenosina, 3,7-dimetil-1-propargilxantina (34,35).

Inoltre, il pretrattamento di ratti con l'agonista specifico dei recettori A2a, CGS21680, aumenta la resistenza del fegato al danno da ischemia-riperfusion (36,37).

Nel nostro laboratorio, utilizzando come modello cellulare di precondizionamento epatico epatociti primari di ratto precondizionati con 10 minuti di ipossia seguiti da 10 minuti di riossigenazione, abbiamo iniziato la

caratterizzazione dei meccanismi e dei mediatori intracellulari responsabili del preconditionamento degli epatociti (38).

In particolare abbiamo osservato 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<sub>2a</sub> (A<sub>2a</sub>R) dell'adenosina, una cascata di mediatori intracellulari che aumentano la resistenza degli epatociti al danno cellulare.

In seguito alla stimolazione degli A<sub>2a</sub>R, l'induzione della citoprotezione è associata all'attivazione di una via di segnalamento che coinvolge le proteine G inibitorie (G<sub>i</sub>), la fosfolipasi C (PLC), le specifiche isoforme delta ed epsilon della proteina chinasi C (PKC) e la MAP chinasi p38 (p38 MAPK) (39).

I recettori A<sub>2a</sub>R sono classicamente accoppiati alle proteine G stimolatorie (G<sub>s</sub>) e quindi alla adenilato-ciclastasi (A-C) ed alla proteina chinasi A (PKA).

In corso di preconditionamento, abbiamo infatti la stimolazione delle proteine G<sub>s</sub>, della A-C e della PKA; la PKA è quindi responsabile della fosforilazione dell'A<sub>2a</sub>R e tale processo determina lo spostamento dell'affinità del recettore dalle proteine G<sub>s</sub> alle G<sub>i</sub> con conseguente attivazione di PLC, PKC e p38 MAPK ed induzione della citoprotezione (40).

La via di segnalamento che si attiva a partire dalle proteine G<sub>i</sub>, coinvolge un ulteriore fattore critico del preconditionamento epatico: il mediatore della sopravvivenza cellulare, fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K) (40). PI3K si attiva a seguito della congiunta stimolazione delle proteine G<sub>i</sub> e della Src tirosino chinasi ed è successivamente coinvolta nella attivazione della PLC e della PKC (40).

Le PI3K sono una classe di enzimi coinvolti nella regolazione della proliferazione, sopravvivenza, metabolismo e del traffico intracellulare. Numerosi studi presenti in letteratura mostrano che la PI3K è in grado di trasdurre il suo segnale tramite la chinasi 1 fosfoinositidi-dipendente (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PDK1) e la serina-treonina

chinasi PKB/Akt prevenendo così il danno epatico dovuto all'apoptosi degli epatociti causata dagli acidi biliari, TNF $\alpha$  e da Fas ligando (40,41).

### 3) SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del progetto di studio di questa Tesi è quello di indagare la capacità dell'attivazione farmacologica dei recettori A2a dell'adenosina di prevenire l'apoptosi degli epatociti indotta da acidi grassi liberi e lo sviluppo della steatoepatite non alcolica.

A tale scopo le nostre ricerche hanno impiegato sia modelli cellulari *in vitro* che modelli animali *in vivo*.

#### **Ricerche con modelli cellulari "in vitro":**

- 1) studio della capacità dell'agonista dei recettori A2aR , il CGS21680, di prevenire la lipoapoptosi indotta dal trattamento di epatociti primari di ratto con acido stearico;
- 2) caratterizzare i meccanismi molecolari coinvolti, con particolare riferimento al ruolo pro-apoptotico di MKK4/JNK ed anti-apoptotico di PI3K/Akt.

#### **Ricerche con modelli animali "in vivo":**

- 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 nel modello cellulare.

## 4) MATERIALI E METODI

### 4.1 Materiali

Le sostanze chimiche utilizzate sono state acquistate dalle seguenti ditte: Eparina, Collagenasi (Tipo IV), N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-athanesulfonic acid) HEPES, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM-HAM F12, DMEM5671), Desametasone, Insulina, L-Glutamina, Penicillina, Streptomina, Propidio Ioduro, Ribonucleasi A (RNase A), Acido Stearico, (2-[p-(2-carboxyethyl)phenethylamino]-5'-ethylcarboxamido-adenosine) CGS21680, Wortmannina, SP600125, Dimethyl Sulfoxide (DMSO sterile), Iso-propanolo e Cloruro di Sodio (NaCl) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

L'Accutase è stata acquistata dalla PAA Laboratories-GmbH PAA-Strasse (Pasching, Austria). Il Percoll è stato acquistato dalla GE-HELTCARE Bio-Sciences (Uppsala, Svizzera). L'Annessina-V- Fluos Staining kit è stato acquistato dalla Roche (Monza, Milano, Italia). Il Kit Steatosis Colorimetric Assay è stato acquistato dalla Cayman Chemical Company (Milano, Italia). Il GPT-ALT kit, Metodo cinetico UV ottimizzato IFCC, è stato acquistato dalla Radim (Calenzano, Firenze).

Buffer salino fosfato (PBS 1X), soluzione fisiologica pH 7.4 (NaCl 0,9%p/v), formalina tamponata al 4%p/p.

La dieta metionina-colina carente (MCD) è stata acquistata dal Laboratorio Piccioni Srl (Gessate, Milano, Italia). Questa dieta è stata mantenuta a 4°C nei periodi di non utilizzo.

## **“In vitro”**

### **4.2 Cellule**

In questo lavoro sono stati utilizzati epatociti primari isolati da fegato di ratto coltivati in terreno DMEM-HAM F12 al 10% di siero fetale bovino (FBS), all'1% di penicillina/streptomina e L-glutamina, desametasone (400ng/mL), insulina (2,5 µg/mL).

### **4.3 Isolamento, coltura e trattamenti degli epatociti**

Gli epatociti primari sono stati isolati da fegato di ratto maschio 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 (40). 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 10mM 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, CaCl<sub>2</sub> 5mM, la collagenasi di tipo IV 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 da 3 minuti a 1050 rpm su gradiente di Percoll. La purezza cellulare è stata determinata secondo il metodo descritto da Benten et al. (42).

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 (purezza >95%) è stata portata ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/mL.

Gli epatociti così risospesi sono stati inizialmente coltivati su piastre per adesione cellulare precedentemente trattate con collagene e lasciati in incubatore per 24h in terreno DMEM-HAM F12 al 10% di siero fetale bovino, all'1% di penicillina/streptomina e L-glutammina, desametasone (400ng/ml), insulina (2,5 µg/ml).

Gli epatociti sono poi stati trattati con acido Stearico ad una concentrazione finale di 50µmol/L da adesi in terreno DMEM-HAM F12 privo di siero per 8h al fine di indurre lipotossicità. L'acido Stearico (numero di catalogo S4751) è stato sciolto in isopropanolo.

Là dove stabilito è stato aggiunto CGS21680 (5µmol/L), SP600125 (10µmol/L) e Wortmannina (250nmol/L) contemporaneamente o 1h dopo trattamento con A. Stearico.

#### **4.4 Colorazione e quantificazione dell'accumulo lipidico intracellulare tramite saggio Oil Red O (ORO)**

Epatociti primari di ratto piastrati sono stati incubati ad una confluenza del 70% con Acido Stearico ( $50\mu\text{mol/L}$ ) per 8 ore.

Al termine del trattamento è stata eseguita l'analisi della distribuzione intracellulare dei vacuoli lipidici e la loro quantificazione utilizzando il Kit Steatosis Colorimetric Assay (Cayman Chemical Company, Milano, Italia).

Brevemente, le cellule sono state lavate con PBS1X freddo e trattate con il fissativo fornito dal Kit per 15minuti. Dopo 2 lavaggi con acqua bidistillata, è stata aggiunta alle cellule la soluzione Oil Red O (ORO solution) e lasciata ad agire per 20 minuti, al termine dei quali sono stati eseguiti lavaggi con acqua bidistillata seguiti da due lavaggi con soluzione di lavaggio fornita dal Kit. A questo punto, le cellule sono state osservate al microscopio a luminescenza per valutare la presenza dei vacuoli lipidici intracellulari. Di ogni campione sono state acquisite almeno tre immagini diverse ad ingrandimento 20x.

Successivamente, servendoci sempre di questo Kit, abbiamo quantificato l'accumulo lipidico tramite analisi densitometrica. Le cellule sono state trattate nei modi e nei tempi sopra descritti fino al momento della colorazione con la soluzione Oil Red O. Da qui, le cellule colorate con Oil Red O sono state lisate utilizzando la soluzione di estrazione fornita dal Kit e sottoposte a leggera agitazione per favorire il rilascio nel mezzo dei vacuoli lipidici accumulati in seguito a trattamento. La lettura spettrofotometrica a 490nm ha permesso di ottenere la concentrazione lipidica di ciascun campione. Tutti i campioni sono stati valutati in quintuplo ed il risultato finale mostrato è la media delle singole letture.

#### 4.5 Valutazione dell'apoptosi

Gli epatociti primari di ratto piastrati in terreno privo di FBS sono stati trattati con Acido Stearico per 8h con l'aggiunta di CGS21680 ( $5\mu\text{mol/L}$ ) e degli inibitori chimici SP600125 ( $10\mu\text{mol/L}$ ) e Wortmannina ( $250\mu\text{mol/L}$ ) contemporaneamente o 1h dopo l'aggiunta dell'Acido Stearico. Alla fine delle 8h le cellule sono state lavate con tampone fosfato salino 1X (PBS1X) e staccate con Accutase1X per ottenere i pellet dei singoli campioni.

Per l'analisi dell'apoptosi sono stati utilizzati due saggi distinti:

- Annessina-V-FLUOS:

$2 \times 10^5$  cellule sono state lavate 2 volte con PBS1X filtrato ed il pellet cellulare ottenuto di ogni campione è stato risospeso in  $100\mu\text{L}$  di Annexin Incubation Buffer con successiva aggiunta di  $2\mu\text{L}$  di Annessina-V-FLUOS più  $2\mu\text{L}$  di Propidio Ioduro ( $50\mu\text{g/mL}$ ) e lasciato incubare per 10 minuti a R.T. Alla fine dei 10 minuti sono stati aggiunti  $400\mu\text{L}$  di PBS1X filtrato per campione ed è stata eseguita l'analisi al FACScan Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

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

- determinazione della frammentazione del DNA:

$5 \times 10^5$  cellule sono state lavate con PBS1X filtrato e poi risospese in una soluzione di etanolo al 70% a freddo. Successivamente, le cellule sono state nuovamente lavate con PBS1X filtrato ed il pellet di ciascun campione è stato risospeso in  $400\mu\text{L}$  di PBS1X con l'aggiunta di  $50\mu\text{L}$  di RNase A e  $10\mu\text{L}$  di PI ( $1\text{mg/mL}$ ) e lasciati incubare per 1h a R.T.

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.

## “In Vivo”

### 4.6 Animali

L'uso e cura degli animali sono stati approvati dal Ministro 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 ( $n=24$ ) 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, con accesso *ad libitum* all'acqua.

### 4.7 Descrizione del protocollo sperimentale applicato

Trascorsi i sette giorni di isolamento, i ratti 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 metioninacolina 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 A2aR del fegato fossero farmacologicamente attivati dal CGS21680, questo è stato iniettato ad una concentrazione di 0,5 mg/kg (43) 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.

#### **4.8 Prelievo di sangue ed isolamento del siero**

Immediatamente dopo essere stato anestetizzato, a ciascun ratto è stato prelevato circa 1mL 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.

#### **4.9 Prelievo dei tessuti**

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

#### 4.10 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) sfruttando il GPT-ALT, Metodo cinetico UV ottimizzato IFCC (Radim, Calenzano, Firenze). Brevemente, l'ALT sierica presente catalizza la reazione tra l'acido alfa-chetoglutarato e l'alanina, dando acido L-glutammico e piruvato. Quest'ultimo reagisce, in presenza di lattato deidrogenasi (LDH) con il coenzima NADH dando acido lattico e NAD<sup>+</sup>. La variazione di D.O. a 340nm è proporzionale all'attività della ALT. La lettura cinetica dei campioni è stata eseguita allo spettrofotometro JASCO V-630 UV-Vis Spectrophotometer.

#### 4.11 Valutazione delle sezioni epatiche

Sezioni epatiche dello spessore di 4 µm sono state colorate con Ematossilina-Eosina (H&E) per valutare la presenza di steatosi, danno epatico, infiammazione e necrosi. Per ogni campione sono stati acquisiti al microscopio a luminescenza (40x) 10 campi random. Ogni campo è stato quindi valutato utilizzando una scala di score da 0 a 3 come descritto (44). La severità del danno epatico è stata definita come segue: grado 0, nessuna o minima presenza di danno epatico; grado 1, danno di media entità con presenza di vacuoli citoplasmatici e comparsa di pyknosis nucleare focale; grado 2, danno da severo a moderato con estesa pyknosis nucleare, ipereosinofilia citoplasmatica e perdita dei bordi intercellulari; grado 3, necrosi severa con disgregazione dei cordoni epatici, emorragia ed infiltrazione di neutrofili.

#### **4.12 Identificazione delle cellule apoptotiche tramite colorazione TUNEL**

Per valutare la presenza di apoptosi nelle sezioni di fegato di ciascun campione è stato eseguito il saggio terminal deoxyribonucleotide transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL), utilizzando il kit Apoptag (Intergen Company, Purchase, NY, USA) come descritto (45). Il numero delle cellule positive alla colorazione TUNEL risulta dalla conta di 5 campi microscopici random per ogni sezione (40x).

#### **4.13 Preparazione dei campioni per l'analisi in Western Blotting**

Frammenti di 0.4-0.5mg ottenuti dalle biopsie epatiche congelate sono stati omogenati a freddo in 2 mL di Buffer di lisi 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 ZnCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L di ammonio molibdato, 1% NP-40, 1mmol/L di Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 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 (46).

## “In vitro” & “In vivo”

### 4.14 Analisi dello stato di fosforilazione delle chinasi SAPK/JNK, PKB/Akt e MKK4/SEK1 e dello stato di attivazione della Caspasi 3

Per ottenere estratti proteici per analisi molecolari, gli epatociti primari piastrati sono stati solubilizzati in 2mL di Buffer di lisi a freddo alla fine dei trattamenti. Il contenuto proteico dei campioni è stato determinato secondo il metodo di Lowry modificato secondo Peterson (46).

Aliquote di 40µg di estratti cellulari totali e di omogenati tissutali 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 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) 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 Ser<sup>473</sup> 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 (Ser<sup>80</sup>) usato 1:1000, mentre per valutare lo stato di fosforilazione attivatoria di SEK1/MKK4 è stato utilizzato l'anticorpo policlonale Phospho-SEK1/MKK4 (Ser<sup>257</sup>/Thr<sup>261</sup>) 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'analisi dello stato di attivazione della Caspasi 3 è stata eseguita sugli omogenati totali dei campioni di fegato di ratto, incubando le membrane con l'anticorpo Caspasi 3 usato 1:500 in grado di rilevare sia la forma inattiva

della caspasi 3 (KDa 35) sia quella attivata, rappresentata dal frammento clivato (KDa 17).

Dopo incubazione con anticorpo secondario, mouse o rabbit in base all'anticorpo primario utilizzato, 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 o rispetto alla  $\beta$ -actina.

#### **4.15 Analisi dei dati**

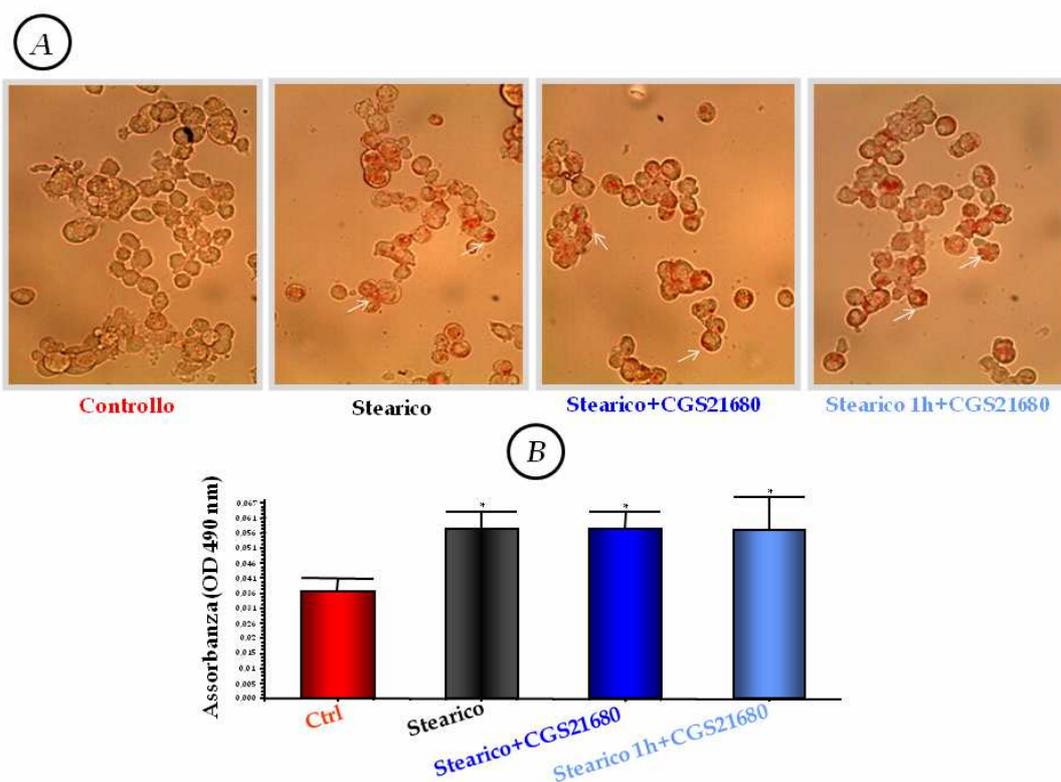
I dati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software statistico InStat-3 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) usando 1-way ANOVA test con la correzione di Bonferroni per confronti multipli quando sono stati analizzati più di due gruppi. L'adattamento alla distribuzione normale è stato valutato con i test di Kolmogorov-Smirnov. Valori di  $p$  inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

## 5) RISULTATI

### 5.1 La stimolazione dei recettori A2a dell'adenosina con CGS21680 protegge gli epatociti dalla lipoapoptosi senza modulare la steatosi

Nella prima parte di questo progetto abbiamo valutato in modelli *in vitro* il possibile effetto anti-lipoapoptotico dell'agonista dei recettori A2a dell'adenosina, il CGS21680. A tale scopo abbiamo messo a punto un sistema sperimentale di lipoapoptosi basandoci su un recente lavoro di Malhi e coll. in cui sono stati impiegati epatociti primari di topo e cellule in linea di epatocarcinoma trattati con acidi grassi liberi (FFAs) (10). Nel nostro studio abbiamo utilizzato epatociti primari di ratto incubati con Acido Stearico (SA; 50  $\mu\text{mol/L}$ ) per 8 ore in presenza o in assenza di CGS21680 (5  $\mu\text{mol/L}$ ), aggiunto contemporaneamente o un'ora dopo il trattamento con SA. L'esposizione a SA ha determinato un accumulo di vacuoli lipidici rilevabile tramite l'uso della colorazione Oil Red O (ORO Staining) (Fig. 1A). Tale accumulo lipidico è risultato evidente anche in presenza di CGS21680.

Per misurare in maniera oggettiva l'effetto steatotico del nostro trattamento con Acido Stearico, abbiamo eseguito un'analisi densitometrica di ciascun campione. Come mostrato in Figura 1B, il trattamento con SA induce un incremento dell'accumulo lipidico intracellulare pari circa al doppio del Controllo, e tale aumento è presente anche in seguito all'aggiunta di CGS21680 contemporaneamente o dopo 1h dal trattamento con Stearico.

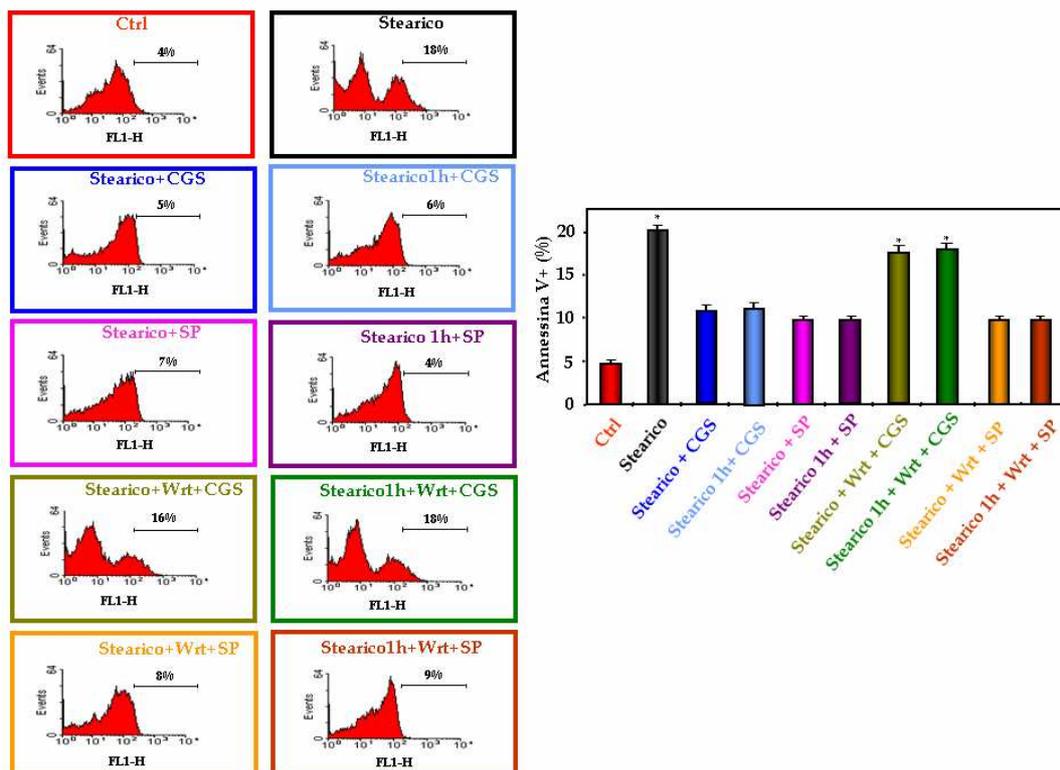


**FIGURA 1:** Caratterizzazione della steatosi intracellulare indotta da Acido Stearico.

La colorazione Oil Red O è stata eseguita su epatociti primari di ratto piastrati in assenza di siero ed incubati con 50  $\mu\text{M/L}$  di SA per 8h a 37°C con aggiunta di CGS21680 (5 $\mu\text{M/L}$ ) contemporaneamente o dopo 1h dal trattamento con SA. A) nella figura sono mostrate immagini rappresentative di ciascun campione (20x). B) la steatosi cellulare è stata quantificata tramite lettura dell'assorbanza a 490O.D. di ciascun campione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  D.S. di almeno 4 esperimenti differenti. Significatività statistica: \* $p < 0,01$  rispetto al Controllo.

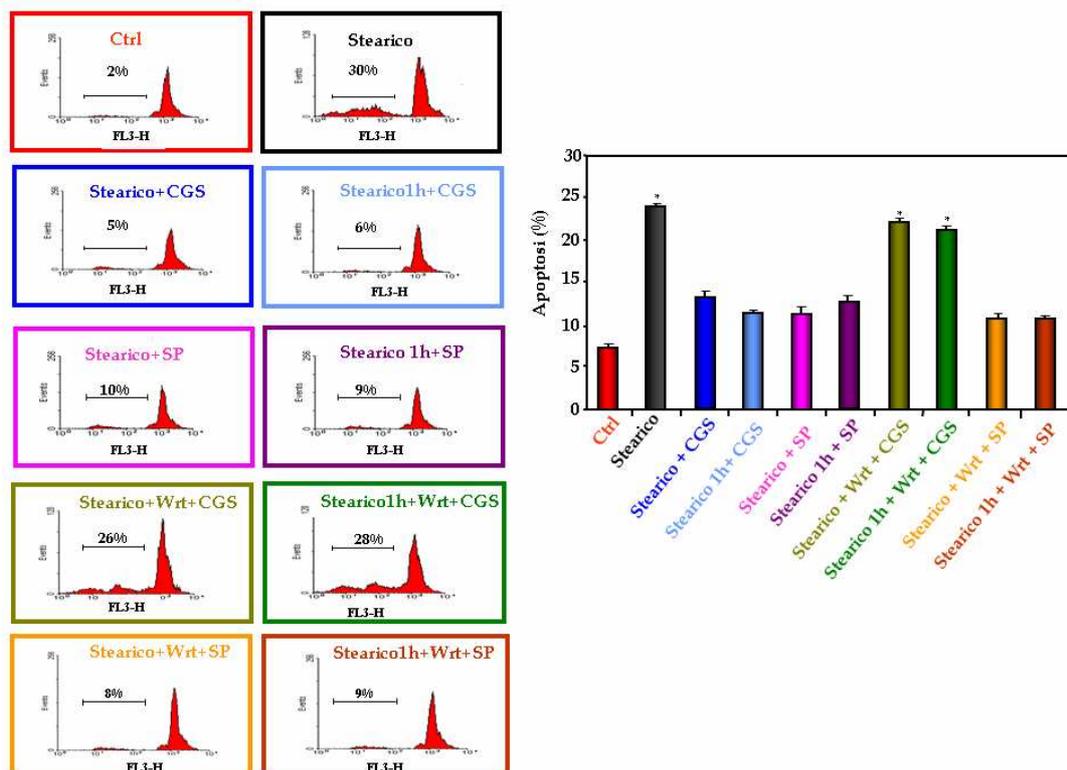
Tramite saggi di citofluometria a flusso, abbiamo successivamente verificato la capacità dell'SA di indurre apoptosi negli epatociti primari di ratto.

Il trattamento degli epatociti primari di fegato di ratto con SA determina un aumento delle cellule positive sia all'analisi dell'Annexina V, capace di discriminare l'esposizione in membrana della fosfatidilserina, noto segnale di apoptosi (Fig. 2), sia all'analisi della frammentazione del DNA (Fig. 3). Il trattamento di CGS21680 effettuato contemporaneamente o 1 ora dopo dall'aggiunta di SA ha protetto in maniera significativa gli epatociti dall'effetto lipoapoptotico dell'SA, diminuendo nettamente il segnale di positività all'Annexina V ed il picco sub-diploide del DNA (Fig. 2&3).



**FIGURA 2:** Il CGS21680 previene l'effetto lipoapoptotico dell' Acido Stearico.

Profili delle letture al citofluorimetro di epatociti marcati con Annessina-V dopo esposizione a 50 $\mu$ M di SA per 8 ore in assenza o in presenza di CGS21680, SP600125 e Wortmannina o Wortmannina+SP600125. I profili sono rappresentativi di 3-4 esperimenti indipendenti. La quantificazione è espressa come media  $\pm$  D.S. di 3-4 esperimenti differenti. Significatività statistica: \* $p$ <0,05 rispetto al Controllo o alle cellule trattate con Stearico+CGS21680, Stearico 1h+CGS21680, Stearico+SP600125, Stearico 1h+ SP600125, Stearico+ Wrt+SP600125 e Stearico 1h+Wrt+SP600125.



**FIGURA 3:** Il CGS21680 protegge gli epatociti dalla morte apoptotica indotta dall' Acido Stearico, studio della frammentazione del DNA.

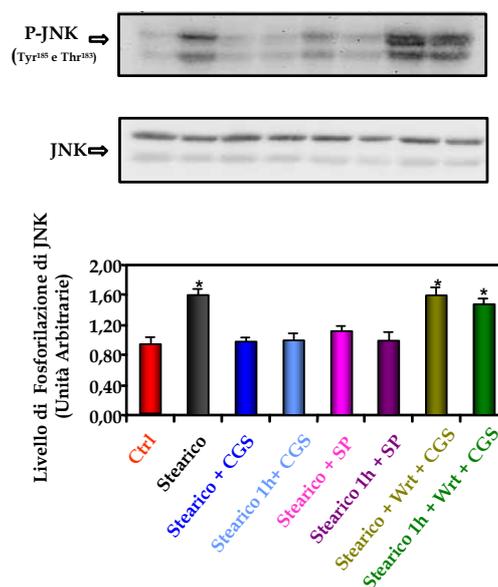
Profili delle letture al citofluorimetro di epatociti marcati con Propidio Ioduro dopo esposizione a  $50\mu\text{M/L}$  di SA per 8 ore in assenza o in presenza di CGS21680, SP600125 e Wortmannina o con Wortmannina+SP600125. I profili mostrati rappresentano 3-4 esperimenti indipendenti. I risultati sono espressi come media  $\pm$  D.S. di 3-4 esperimenti differenti. Significatività statistica: \* $p < 0,005$  rispetto al Controllo o alle cellule trattate con Stearico+CGS21680, Stearico 1h+CGS21680, Stearico+SP600125, Stearico 1h+SP600125, Stearico+ Wrt+SP600125 e Stearico 1h+Wrt+SP600125.

## 5.2 Meccanismi molecolari implicati nella protezione del CGS21680 dalla lipoapoptosi

Malhi e coll. hanno dimostrato che la lipoapoptosi degli epatociti primari murini è dipendente dalla attivazione della c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) (10). Abbiamo quindi voluto indagare l'effetto del CGS21680 sull'attivazione della JNK indotta dal trattamento con SA, valutando l'aumento della fosforilazione della JNK in Thr<sup>183</sup> e Tyr<sup>185</sup>. In accordo con quanto precedentemente descritto, la morte degli epatociti indotta dal trattamento con SA è associata ad un aumento della fosforilazione di JNK evidenziabile a partire dalle 4 ore di incubazione (Fig. 4) e persistente per le 8 ore di trattamento con SA (dati non mostrati).

L'uso dell' SP600125 (10μMol/L), uno specifico inibitore di JNK, aggiunto contemporaneamente o 1 ora dopo l'aggiunta dello SA, riduce in maniera significativa i segnali di morte apoptotica (Fig.2 & 3).

Il trattamento degli epatociti steatosici con il CGS21680 contemporaneamente o dopo 1h dall'incubazione con SA riduce significativamente la quantità di JNK attivata nella cellula (Fig.4), indicando che il signaling regolato dall'attivazione dei recettori A2a dell'adenosina interferisce con l'attivazione di JNK.

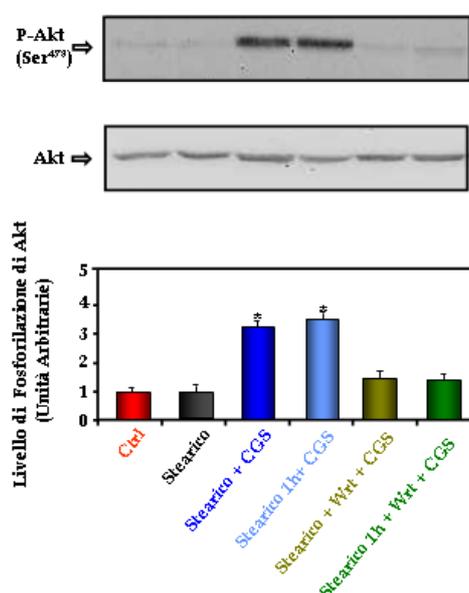


**FIGURA 4:** Attivazione di JNK in seguito a trattamento con Acido Stearico.

La fosforilazione di JNK è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) e non fosforilata della JNK su estratti di epatociti incubati con A.Stearico (50µM/L) in presenza o meno di CGS21680, SP600125 e Wortmannina. L'intensità sia della banda fosforilata sia di quella non fosforilata è stata misurata con videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come unità arbitrarie dopo normalizzazione a 1 del Controllo. E' mostrato un esperimento rappresentativo insieme alla quantificazione di 5 esperimenti indipendenti. Significatività statistica: \* $p < 0,001$  rispetto al Controllo o alle cellule trattate con Stearico+CGS21680, Stearico 1h+CGS21680, Stearico+SP600125 e Stearico 1h+ SP600125.

Nostri studi precedenti hanno mostrato che l'attivazione dei recettori A2a da parte dell'adenosina conduce alla successiva stimolazione di numerosi mediatori della sopravvivenza cellulare, tra i quali ha un ruolo centrale l'asse PI3K/ Akt (33,34).

Utilizzando Akt come marker dell'attivazione di PI3K, abbiamo confermato che anche in una condizione di steatosi epatocitaria, il CGS21680 è in grado di attivare l'asse di segnalamento PI3K/ Akt (Fig.5).



**FIGURA 5:** Attivazione di Akt in seguito a trattamento con CGS21680.

La fosforilazione di Akt è stata esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata (Ser<sup>473</sup>) e non fosforilata di Akt su estratti di epatociti incubati con A.Stearico (50  $\mu$ M/L) in presenza o meno di CGS21680, e Wortmannina. L'intensità sia della banda fosforilata sia di quella non fosforilata è stata misurata con videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come unità arbitrarie dopo normalizzazione a 1 del Controllo. E' mostrato un esperimento rappresentativo insieme alla quantificazione di 5 esperimenti indipendenti. Significatività statistica: \* $p < 0,005$  rispetto al Controllo o alle cellule trattate con Stearico, Stearico+Wrt+CGS21680 e Stearico1h+ Wrt+CGS21680.

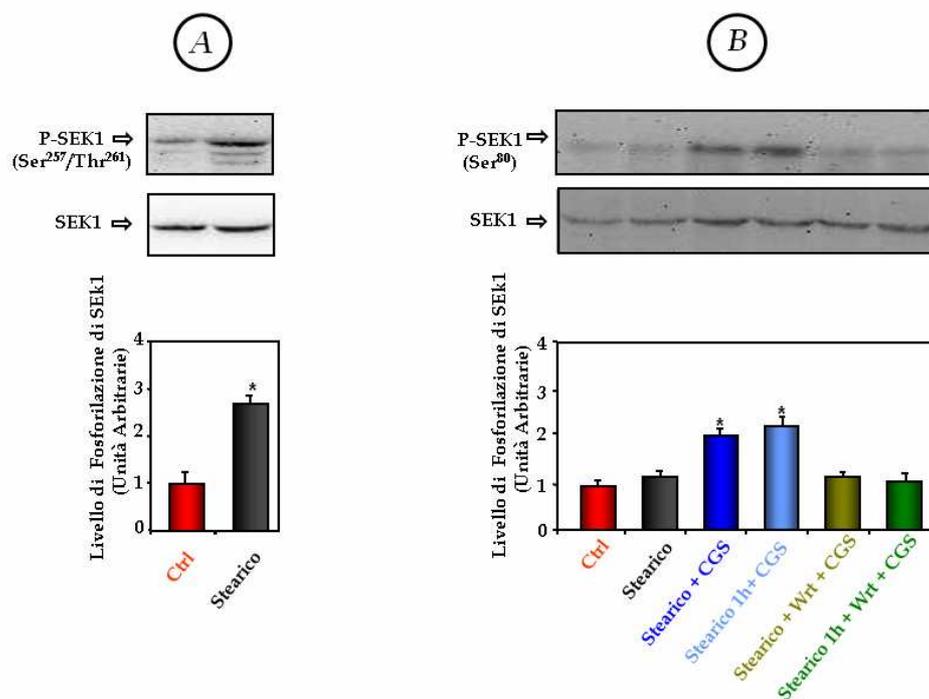
Come mostrano le Figure 2&3, il trattamento con Wortmannina (250nMol/L), un inibitore specifico di PI3K, annulla la protezione data dal CGS21680 e ripristina l'attivazione di JNK (Fig.4).

L'inibizione della PI3K da parte della Wortmannina, tuttavia, non risulta in grado di annullare l'effetto anti-apoptotico dell'inibizione di JNK con SP600125 (Fig. 2&3). Questo suggerisce che la stimolazione della PI3K inibisce la lipoapoptosi non interferendo direttamente con la JNK ma bloccando una chinasi coinvolta nella sua attivazione.

Come riportato nell'introduzione, numerose proteine MAP chinasi sono coinvolte nella regolazione di JNK e, fra queste, la MAPKK4 (o SEK1) è nota per essere fortemente espressa a livello epatico (28,29) e per attivare direttamente JNK attraverso la fosforilazione nei suoi residui Thr<sup>183</sup> e Tyr<sup>185</sup> in risposta a stimoli di stress extracellulari (25,28,29).

E' interessante rimarcare che SEK1/MKK4 è anche un target d'azione di Akt e la fosforilazione inibitoria in Ser<sup>80</sup> mediata da Akt riduce drasticamente l'affinità di legame di SEK1/MKK4 con JNK, non permettendo l'attivazione di quest'ultima (31).

Abbiamo quindi voluto indagare l'effetto dell'SA e del CGS21680 sullo stato di fosforilazione di SEK1/MKK4. Come mostrato in Figura 6A, dopo 3 ore di trattamento con SA, SEK1/MKK4 viene attivata da una doppia fosforilazione nei suoi residui Ser<sup>257</sup> e Thr<sup>261</sup>. Il successivo trattamento con CGS21680 induce inoltre la comparsa della fosforilazione inibitoria di SEK1/MKK4 in Ser<sup>80</sup> e tale effetto scompare in seguito all'uso dell'inibitore della PI3K, Wortmannina (Fig.6B).



**FIGURA 6:** Attivazione di SEK1/MKK4 da parte dell'Acido Stearico ed inibizione di SEK1/MKK4 in seguito a trattamento con CGS21680.

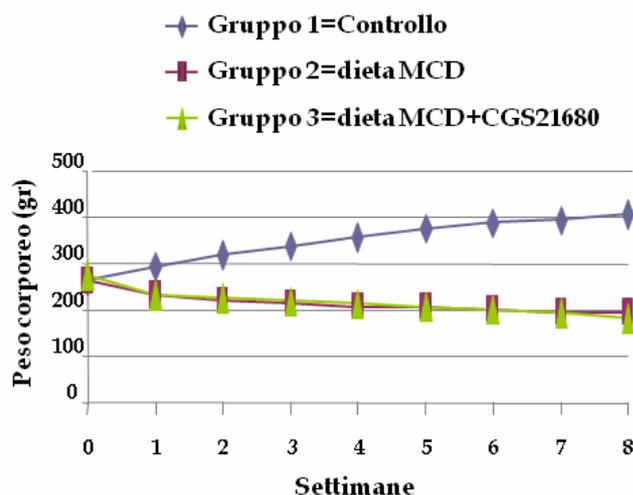
Attivazione tramite fosforilazione in Ser<sup>257</sup>/Thr<sup>261</sup> A) ed inibizione tramite fosforilazione in Ser<sup>80</sup> B) di SEK1/MKK4 esaminata tramite analisi in Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata della SEK1/MKK4 su estratti di epatociti incubati con Acido Stearico (50  $\mu$ M/L) in presenza o meno di CGS21680, e Wortmannina. L'intensità sia della banda fosforilata sia di quella non fosforilata è stata misurata con videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come unità arbitrarie dopo normalizzazione a 1 del Controllo. E' mostrato un esperimento rappresentativo insieme alla quantificazione di 5 esperimenti indipendenti. Significatività statistica: 5 A) \* $p$ <0,005 rispetto al Controllo; 6 B) \* $p$ <0,003 rispetto al Controllo o alle cellule trattate con Stearico, Stearico+Wrt+CGS21680 e Stearico 1h+ Wrt+CGS21680.

### 5.3 Il CGS21680 diminuisce l'apoptosi epatica ed i segnali pro-lipoapoptotici nei fegati di ratto alimentati con dieta MCD

Il ritrovamento che la stimolazione dei recettori A2a dell'adenosina favorisce la sopravvivenza degli epatociti alla lipoapoptosi indotta dall'SA, ci ha indotto ad esaminare gli effetti della stimolazione dei recettori A2a anche in un modello *in vivo* di lipotossicità epatica nel ratto. A tal fine, abbiamo utilizzato la dieta metionina-colina carente (MCD) come modello nutrizionale di steatoepatite.

Ratti maschi di ceppo Wistar ( $n=24$ ) sono stati suddivisi in tre gruppi distinti ed a tutti, eccetto il gruppo Controllo, è stata somministrata per 8 settimane la dieta MCD. A partire dalla fine della seconda settimana di dieta MCD, il terzo gruppo ha iniziato il trattamento con CGS21680 (0,5 mg/Kg) (43) somministrato con iniezioni intraperitoneali due volte alla settimana, fino alla fine delle 8 settimane di esperimento.

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, 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 7. A parte la perdita di peso, le condizioni generali degli animali sono rimaste tuttavia soddisfacenti.

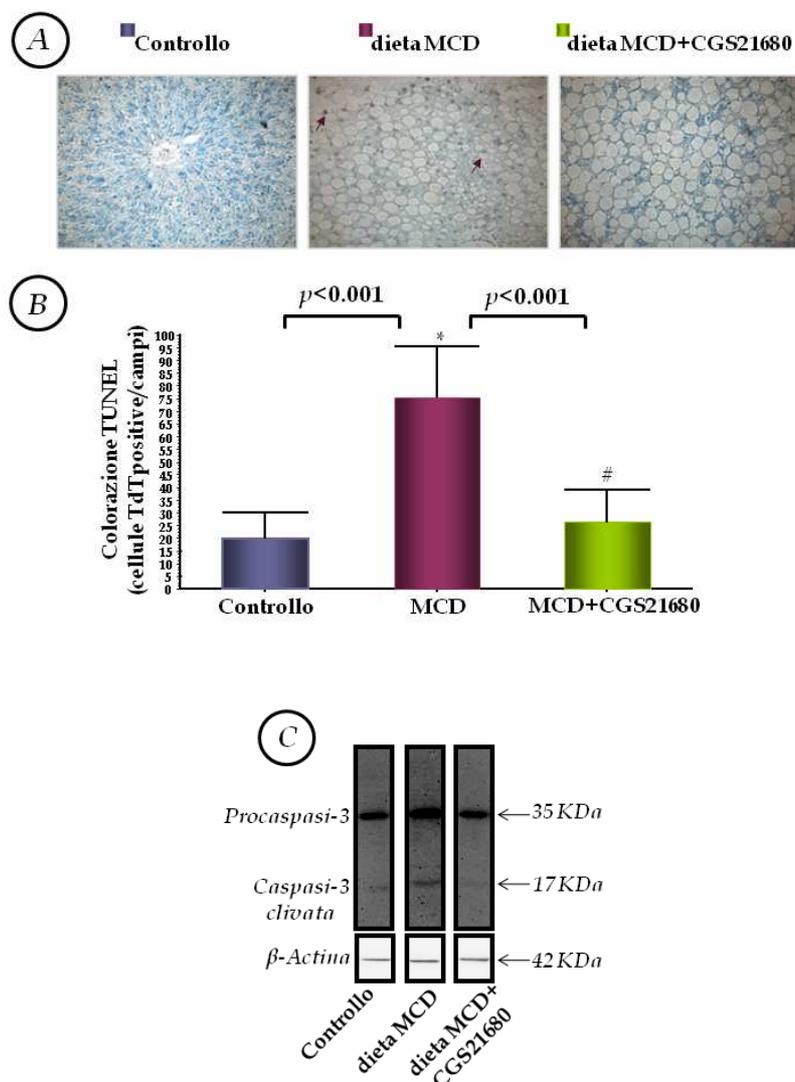


**FIGURA 7:** Monitoraggio del peso corporeo dei ratti durante le 8 settimane di dieta.

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 fine della seconda settimana.

Al momento del sacrificio, da ogni ratto sono stati prelevati campioni di sangue intero per analisi biochimiche e campioni di fegato per analisi istopatologiche e molecolari.

Tramite saggio TUNEL e lo studio dell'attivazione della Caspasi 3, abbiamo valutato la presenza di apoptosi nelle sezioni di fegato di ciascun campione. Come mostra la Figura 8 A, la colorazione TUNEL rivela la presenza delle cellule apoptotiche unicamente nelle sezioni di fegato prelevate da ratti trattati con la sola dieta MCD. Inoltre, la quantificazione dell'apoptosi epatocellulare ha evidenziato che la dieta MCD somministrata per 8 settimane al gruppo2 aumenta di circa 4 volte la quantità degli epatociti positivi alla TUNEL rispetto al gruppo Controllo (Fig. 8B). A conferma di ciò, l'espressione della Caspasi 3 attivata risulta presente nei fegati dei ratti del gruppo trattato con la sola dieta MCD rispetto al gruppo Controllo alimentato con la dieta isocalorica (Fig. 8 C). Al contrario, il trattamento con il CGS21680 i.p. dimostra di abbassare l'indice apoptotico di circa 2,5 volte rispetto al gruppo trattato con la sola dieta MCD (Fig 8 A e B) e di ridurre nettamente l'espressione della Caspasi 3 attivata (Fig. 8 C).



**FIGURA 8:** Il trattamento con CGS21680 preserva gli epatociti dalla morte apoptotica indotta dalla dieta MCD.

A) Visualizzazione (40x) della colorazione TUNEL delle cellule apoptotiche in sezioni di fegato di ratti trattati con la sola dieta MCD rispetto al gruppo trattato i.p. con CGS21680 ed al gruppo Controllo; 8B) Conta degli epatociti positivi alla colorazione TUNEL nelle sezioni di fegato di ciascun campione: i risultati sono espressi come media delle conte del numero di cellule positive alla TUNEL in 5 campi microscopici  $\pm$  D.S.. Significatività statistica: \* $p < 0.001$  MCD rispetto al Controllo; # $p < 0.001$  MCD+CGS21680 rispetto alla dieta MCD; 8 C) Analisi rappresentativa in Western Blot della Caspasi 3 clivata nel fegato di ratti Controllo, trattati con dieta MCD e MCD+CGS21680 alla fine delle 8 settimane. L'uguale caricamento dei campioni su gel è confermato dal contenuto di  $\beta$ -Actina in ciascun campione.

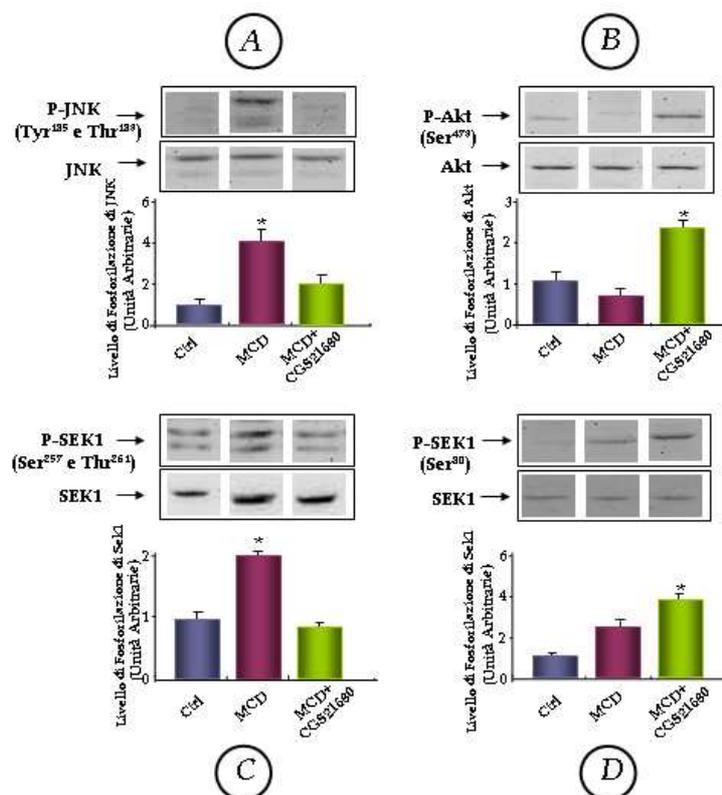
Abbiamo quindi valutato la modulazione dei segnali pro- ed anti-lipoapoptotici evidenziati nel sistema *in vitro*, anche nel modello *in vivo*.

Come mostrato nel pannello A della Figura 9, la forma fosforilata di JNK aumenta in maniera significativa nel gruppo dei ratti trattati solo con la dieta MCD rispetto al gruppo Controllo. Al contrario, la somministrazione di CGS21680 riduce nettamente l'attivazione di JNK.

Il livello di fosforilazione di Akt risulta inoltre più elevato in seguito a trattamento con CGS21680 rispetto al gruppo Controllo ed al gruppo trattato con la dieta MCD (Fig.9B).

I nostri dati indicano inoltre che l'attivazione di JNK nel gruppo trattato con la dieta MCD è associato alla fosforilazione attivatoria in Ser<sup>257</sup> e Thr<sup>261</sup> di SEK1 (Fig.9C), mentre nel gruppo 3 trattato i.p. con il CGS21680 si osserva un aumento della fosforilazione inibitoria in Ser<sup>80</sup> di SEK1(Fig. 9D).

Questi dati suggeriscono che, come osservato nel modello *in vitro*, l'inibizione dell'asse di segnalamento pro-apoptotico SEK1-JNK dipendente da PI3K è associata all'effetto epatoprotettivo del CGS21680.



**FIGURA 9:** Mediatori molecolari coinvolti nell'effetto anti-apoptotico del CGS21680 in ratti trattati con dieta MCD.

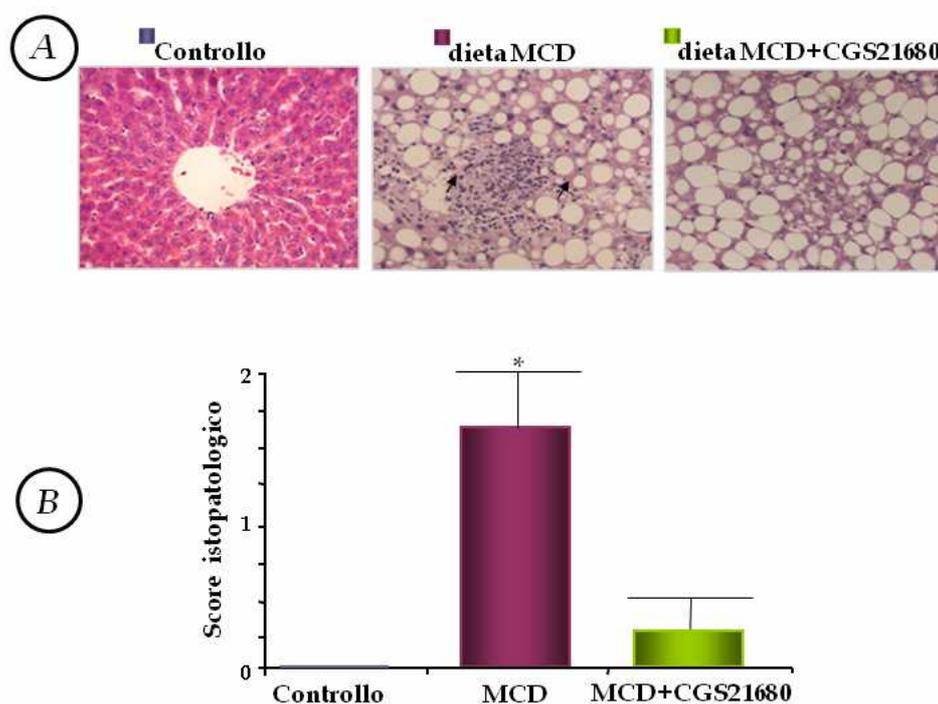
Analisi della modulazione molecolare dei segnali pro- ed anti-apoptotici esaminati tramite saggio Western Blot utilizzando anticorpi verso la forma fosforilata e non fosforilata della diverse chinasi su omogenati di fegato di ratto trattati per 8 settimane con dieta MCD: misurazione A) dell'attivazione di JNK di B) dell'attivazione di Akt C) della fosforilazione attivatoria di SEK1 in Ser<sup>257</sup> e Thr<sup>261</sup> D) della fosforilazione inibitoria di SEK1 in Ser<sup>80</sup>. 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 ad 1 del Controllo. Sono mostrate immagini rappresentative. Significatività statistica: 8 A)\* $p < 0.01$  rispetto al Controllo e alla dieta MCD+CGS21680; 8 B)\* $p < 0.001$  rispetto al Controllo ed alla dieta MCD; 8 C)\* $p < 0.003$  rispetto al Controllo ed alla dieta MCD+CGS21680; 8 D)\* $p < 0.005$  rispetto al Controllo ed alla dieta MCD.

#### 5.4 Il CGS21680 previene la progressione della NAFLD in NASH

Nel modello nutrizionale della dieta MCD, l'epatopatia steatosica non alcolica (NAFLD) evolve in steatoepatite non alcolica (NASH) con progressivo danno cellulare ed infiammatorio (47). Abbiamo quindi analizzato se l'inibizione della morte apoptotica degli epatociti attraverso la somministrazione i.p. del CGS21680 in ratti sottoposti a dieta MCD fosse associata alla prevenzione della comparsa della NASH.

L'analisi istopatologica di sezioni di fegato all'ottava settimana di dieta MCD ha confermato la presenza di un severo danno epatico con presenza di steatosi macrovescicolare più evidente nelle aree centrolubalari, associata ad infiltrato infiammatorio con presenza di neutrofili, necrosi focale, degenerazione ballooning degli epatociti con presenza dei corpi di Mallory (Fig. 10 A). Il trattamento con CGS21680 dalla fine della seconda settimana di dieta MCD risulta prevenire completamente le lesioni istologiche del fegato senza interferire con la comparsa di steatosi (Fig. 10 A).

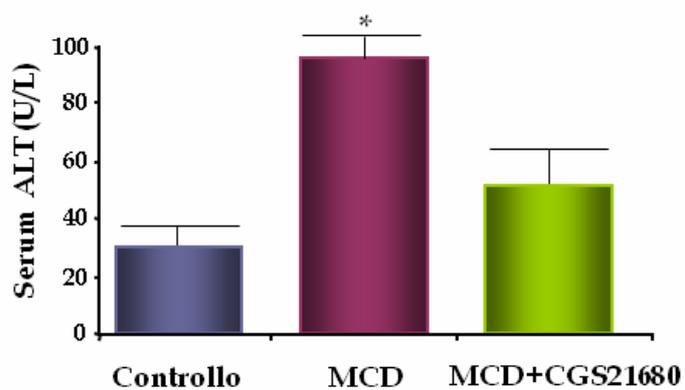
Il grado di danno epatico è stato quindi valutato impiegando uno score da 0 a 3 per un esame semiquantitativo. Come si può osservare dalla Figura 10B, il gruppo trattato con la sola dieta MCD presenta un valore di danno circa uguale a 2 e cioè un danno da moderato a severo, mentre al gruppo trattato con CGS21680 è stato assegnato un valore inferiore ad 1, corrispondente ad una minima o non evidente presenza di danno epatico (Fig. 10 B).



**FIGURA 10:** Il trattamento con CGS21680 previene la progressione del danno epatico indotto dalla dieta MCD.

10 A) Colorazione con Ematossilina ed Eosina (H&E) di sezioni di fegato (40x) di ratti alimentati con dieta Controllo, MCD o trattato i.p. con CGS21680 ed alimentato con dieta MCD; B) Score del danno istologico epatico attribuito alle sezioni di fegato di ratti Controllo o alimentati con la dieta MCD per 8 settimane con somministrazione o meno di CGS21680 i.p. Significatività statistica: \* $P < 0.05$  rispetto al Controllo ed alla dieta MCD+CGS21680.

In accordo con i dati istologici, l'analisi delle ALT sieriche mostra infine un aumento significativo di circa 4 volte rispetto al gruppo controllo delle ALT nel gruppo trattato con la sola dieta MCD. Tale aumento viene prevenuto in maniera significativa dal trattamento con l'agonista specifico dei recettori A2a, CGS21680, che riduce i valori di ALT portandoli a circa 1 volta e mezza i valori del controllo (Fig. 11).



**FIGURA 11:** 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+treatmento i.p. con CGS21680 (0,5 mg/Kg) dalla fine della seconda settimana. Significatività statistica: \* $p < 0.01$  rispetto al Controllo ed alla dietaMCD+CGS21680.

## 6) DISCUSSIONE

Questa Tesi mostra che la stimolazione dei recettori A2a dell'adenosina previene la lipoapoptosi degli epatociti ed inibisce la progressione della NAFLD in NASH. In particolare, i nostri risultati evidenziano che: 1) l'agonista dei recettori A2a dell'adenosina, il CGS21680, previene la lipoapoptosi degli epatociti JNK-dipendente indotta dall'acido stearico (SA), 2) la citoprotezione data dal CGS21680 è dovuta all'attivazione dell'asse di segnalamento PI3K/Akt e, a sua volta, PI3K risulta in grado di inibire la chinasi attivatrice di JNK, MKK4, 3) il CGS21680 inibisce la progressione della NAFLD in NASH in ratti alimentati con la dieta MCD e tale effetto è associato ad una diminuzione della morte apoptotica degli epatociti, all'attivazione di Akt ed all'inibizione di MKK4.

Nel loro insieme, questi risultati illustrano per la prima volta che il trattamento con adenosina è in grado di prevenire il danno lipotossico in modelli preclinici sia "*in vitro*" che "*in vivo*" ed evidenziano, inoltre, alcuni meccanismi molecolari responsabili di tale protezione.

In questa Tesi mostriamo che la stimolazione dei recettori A2a dell'adenosina protegge dalla morte apoptotica indotta da FFAs in un modello di lipoapoptosi precedentemente messo a punto da Malhi e coll. (10), con epatociti primari di topo, cellule in linea umane di epatoblastoma, HepG2, di epatoma, Huh7 e di carcinoma epatocellulare di ratto, MRH7777. In accordo con i dati di questo studio, in questa Tesi confermiamo che il trattamento degli epatociti primari di ratto con l'acido grasso saturo Stearico (SA) induce morte cellulare per apoptosi a seguito dell'attivazione della chinasi c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase, JNK anche nota con il nome di Stress-Activated Protein kinase (SAPK/JNK).

Numerosi studi presenti in letteratura indicano che la JNK riveste un ruolo chiave nello sviluppo di obesità e nell'insulino resistenza (IR), due dei principali fattori di rischio legati all'induzione della steatosi ed al successivo

sviluppo della NASH. In particolare, JNK risulta in grado di indurre l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi attraverso la stimolazione dei fattori pro-apoptotici Bim e Bax (10), la sensibilizzazione al ligando di morte TRAIL (48), l'induzione della sintesi del modulatore di apoptosi up-regolato p53(P53 Upregulated Modulator of Apoptosis; PUMA) (49) e nel mediare lo stress del reticolo endoplasmatico (50).

In questo studio, mostriamo che l'agonista specifico dei recettori A2a dell'adenosina, CGS21680, riduce in maniera significativa l'attivazione di JNK indotta dall'SA e la conseguente morte degli epatociti per apoptosi. Inoltre, l'inibitore specifico della JNK, SP600125, annulla gli effetti pro-apoptotici di JNK in seguito a trattamento con SA, proteggendo così gli epatociti dal danno lipotossico in maniera analoga al CGS21680.

Dati in letteratura indicano che gli FFAs son in grado di alterare numerose vie di segnalamento intracellulari, incluse quelle regolate dalla famiglia delle MAP chinasi (Mitogen-Activated Protein Kinase) (14,21).

JNK appartiene alla famiglia delle MAP chinasi. La sua stimolazione è mediata da MAP3 chinasi (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase), che a loro volta attivano MAP2 chinasi (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase), che, nel caso specifico della regolazione di JNK, coinvolgono le MAP2 chinasi 7 e 4 (MKK7 e MKK4). In particolare, MKK4, in risposta a condizioni di stress extracellulare, viene attivata da una doppia fosforilazione in Ser<sup>257</sup> e in Thr<sup>261</sup> nel suo dominio catalitico risultando così in grado di fosforilare e quindi attivare JNK (28). In questa Tesi mostriamo che l'SA è in grado di indurre la fosforilazione attivatoria di MKK4 in Ser<sup>257</sup>/Thr<sup>261</sup> e tale evento è associato alla morte apoptotica degli epatociti in maniera JNK-dipendente.

I nostri dati inoltre mettono in evidenza che la chinasi MKK4 è un target critico dell'azione citoprotettiva del CGS21680 contro la lipotossicità indotta dall'SA. Il CGS21680 infatti induce l'inibizione di MKK4 tramite fosforilazione in Ser<sup>80</sup> e tale evento è associato alla protezione del CGS21680 contro la morte apoptotica degli epatociti. I nostri risultati evidenziano infine

che l'asse di segnalamento PI3K/Akt riveste un ruolo centrale nel meccanismo di citoprotezione indotto dal CGS21680. A conferma di ciò, l'inibizione della PI3K annulla la fosforilazione inibitoria in Ser<sup>80</sup> di MKK4, riporta elevati i livelli di JNK, attivata e ripristina la morte apoptotica. Questi risultati sono in accordo con lo studio di Park e coll. (31) dove è dimostrata la capacità di Akt di annullare l'induzione di segnali di stress tramite fosforilazione inibitoria di MKK4 in Ser<sup>80</sup>.

Come è stato in precedenza mostrato, Akt è in grado di fosforilare e quindi inattivare anche altri componenti della via di segnalamento di JNK, come la chinasi regolatrice del segnale di apoptosi1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1; ASK1) e la proteina chinasi Mixed-lineage3 (MLK3) (31;51-53). E' quindi possibile che Akt possa interferire con l'attivazione di JNK anche interagendo con altri meccanismi molecolari che non coinvolgono MKK4.

L'attivazione della fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3K) generalmente è associata ad un aumento della sopravvivenza cellulare ed il suo effetto è mediato principalmente dall'attivazione della serina-treonina chinasi Akt.

Il pathway PI3K/Akt può promuovere la sopravvivenza cellulare attraverso l'inibizione di numerose proteine pro-apoptotiche, tra cui la glicogeno sintasi3 (Glycogen Synthase kinase-3; GSK-3), la proteina BAD, la Caspasi 9 ed i fattori di trascrizione Forkhead (33-34;54-56).

E' possibile dunque ipotizzare che l'asse di segnalamento A2aR/PI3K/Akt possa anche interferire con i mediatori molecolari a valle di JNK, contribuendo così all'induzione degli effetti epatoprotettivi del CGS21680.

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 una condizione patologica del tutto assimilabile al quadro clinico della steatoepatite non alcolica dell'uomo (57,58). I nostri esperimenti mostrano che ratti maschi di ceppo Wistar alimentati per 8 settimane con la dieta MCD sviluppano un evidente grado di steatoepatite con necroinfiammazione del fegato, morte apoptotica degli epatociti ed aumento delle transaminasi sieriche.

La somministrazione intraperitoneale di CGS21680 non solo previene l'apoptosi cellulare senza interferire con l'insorgere di steatosi macrovescicolare, ma riduce anche drasticamente la presenza di infiltrato infiammatorio intralobulare, la necrosi epatica e l'incremento delle transaminasi in circolo.

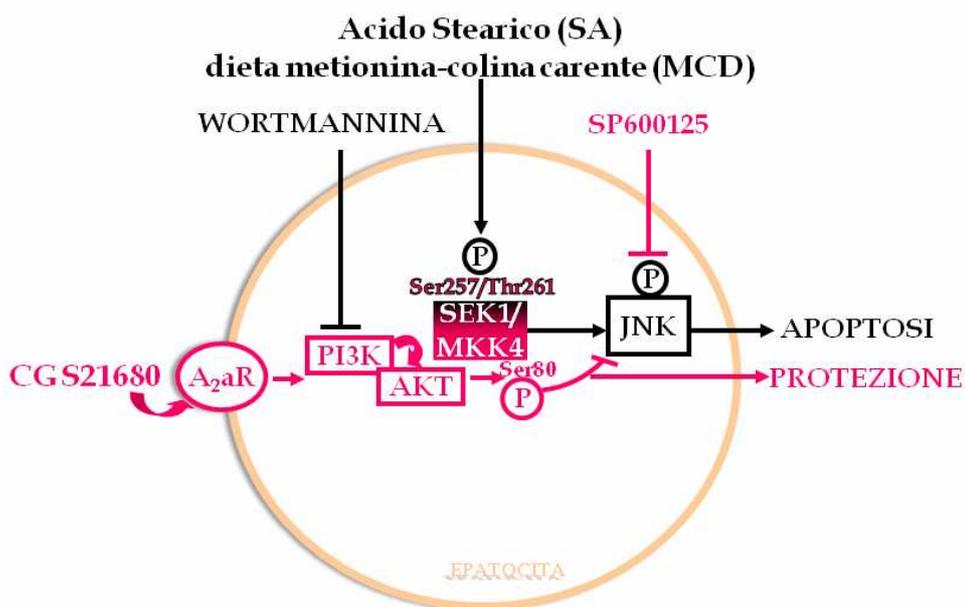
I nostri dati inoltre evidenziano l'associazione tra la prevenzione dello sviluppo della steatoepatite e l'attivazione molecolare di Akt unita all'inibizione di MKK4/JNK. Questo suggerisce che anche nel modello animale il CGS21680 previene la progressione della NAFLD in NASH attraverso il blocco dell'apoptosi degli epatociti mediante l'inibizione di MKK4/JNK dovuta a PI3K, indicando un ruolo chiave della lipotossicità nella comparsa della NASH.

Le nostre osservazioni non ci permettono per altro di escludere anche la possibilità che la stimolazione dei recettori A2a dell'adenosina possa interferire con lo sviluppo della NASH modulando altre alterazioni associate al fenotipo della steatoepatite. L'adenosina è un noto agente anti-infiammatorio in grado di prevenire la produzione delle citochine infiammatorie, come il TNF (33,59). In più, è noto che l'adenosina media gli effetti citoprotettivi del preconditionamento ischemico anche inducendo l'espressione di enzimi antiossidanti, che, in un contesto di NASH, potrebbero limitare lo sviluppo dello stress ossidativo e la perossidazione lipidica o ridurre il danno ai mitocondri indotto dallo stress ossidativo, così come già osservato nel preconditionamento ischemico del cuore e del fegato (60-61).

## 7) CONCLUSIONI

Questa Tesi mostra che il trattamento con acido stearico (SA) *in vitro* e la somministrazione *in vivo* della dieta carente in metionina e colina (MCD) sono in grado di indurre la fosforilazione attivatoria in Ser<sup>257</sup>/Thr<sup>261</sup> di SEK1/MKK4 che a sua volta determina l'attivazione JNK, mediatore centrale del danno lipotossico responsabile della morte apoptotica dell'epatocita. Al contrario, l'agonista specifico dei recettori A2a dell'adenosina, CGS21680, tramite l'induzione dell'asse di sopravvivenza PI3K/Akt, determina la fosforilazione inibitoria in Ser<sup>80</sup> di MKK4 bloccando la successiva attivazione di JNK ed aumentando la resistenza degli epatociti al danno lipotossico (Fig.12).

I nostri dati evidenziano, inoltre, che la stimolazione dei recettori A2a della adenosina è in grado di prevenire il danno lipotossico degli epatociti e la progressione della NAFLD a NASH e che tali effetti sono associati all'annullamento dell'attivazione di JNK conseguente all'azione inibitoria di PI3K su MKK4. Queste osservazioni evidenziano per la prima volta l'adenosina come fattore citoprotettivo contro la lipoapoptosi indotta da acidi grassi e suggeriscono la possibilità di un suo impiego come nuovo agente terapeutico per il trattamento della NASH.



*Figura 12: Mediatori molecolari dell'effetto pro-apoptico dell'acido stearico (SA) e della dieta MCD e dell'effetto protettivo dell'adenosina.*

L'acido stearico (SA) e la dieta metionina-colina carente (MCD) inducono la fosforilazione attivatoria di SEK1/MKK4 che a sua volta fosforila e attiva JNK, mediatore centrale del danno lipotossico responsabile della morte apoptotica dell'epatocita. Al contrario, l'agonista specifico dei recettori A<sub>2a</sub> dell'adenosina, CGS21680, tramite l'induzione dell'asse di sopravvivenza PI3K/Akt, determina la fosforilazione inibitoria in Ser<sup>80</sup> di Sek1 bloccando la sua azione attivatoria su JNK ed aumentando la resistenza degli epatociti al danno lipotossico.

## 8) 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. 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.
3. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. Van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. *Physiol Behav*. 2008 May 23;94(2):231-41. Review.
4. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Malhi H, Gores GJ. *Semin Liver Dis*. 2008 Nov;28(4):360-9. 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.
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 lipooptosis. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. *J Biol Chem*. 2006 Apr 28;281(17):12093-101.
  11. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. Day CP, James OF. *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):842-5.
  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. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. Larter CZ, Yeh MM. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Nov;23(11):1635-48.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.

20. 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.
21. 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.
22. 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. Review.
23. JNK signaling in apoptosis. Dhanasekaran DN, Reddy EP. *Oncogene*. 2008 Oct 20;27(48):6245-51. Review.
24. 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.
25. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Davis RJ. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):239-52. Review.
26. The JNK signal transduction pathway. Weston CR, Davis RJ. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Apr;19(2):142-9. Epub 2007 Feb 15. Review.
27. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. Malhi H, Gores GJ. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1641-54. 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. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Chang L, Karin M. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):37-40. Review.
31. 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.
32. 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.

33. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. Carini R, Albano E. *Gastroenterology*. 2003 Nov;125(5):1480-91. Review.
34. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpí E, Bulbena O, Roselló-Catafau J. *Hepatology*. 1997 Apr; 25(4):934-937.
35. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by the activation of adenosine A2 receptors. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Gelpi E, Xaus C, Rosello-Catafau J. *Hepatology*. 1999 Jan; 29(1):126-132.
36. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Ishikawa Y, Ozaki N, Shimahara Y, Yamaoka Y. *Surgery* 1999 Nov; 126(5):945-954.
37. Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase protects during murine hepatic ischemic preconditioning. Hart ML, Much C, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Kloor D, Stahl GL, Eltzhig HK. *Gastroenterology* 2008 Nov; 135(5):1739-1750.
38. Ischemic preconditioning reduces Na<sup>+</sup> 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):166-172.
39. 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):131-139.
40. 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):914-923.

41. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Cantley LC. *Science* 2002 May; 296(5573):1655-1657.
42. Hepatic targeting of transplanted liver sinusoidal endothelial cells in intact mice. Benten D, Follenzi A, Bhargava KK, Kuraman V, Palestro CJ, Gupta S. *Hepatology*. 2005 jul;42(1):140-148.
43. 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.
44. Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. Wei Y, Chen P, de Bruyn M, Zhang W, Bremer E, Helfrich W. *BMC Gastroenterology*. 2010 May 5;10:42.
45. 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.
46. A simplification of the protein assay method of Lowry, which is more generally applicable. Peterson GL. *Anal Biochem*. 1977 Dec;83(2):346-356.
47. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, Kirsch RE, Hall Pde L. *J Gastroenterol. Hepatol*. 2003 Nov;18(11):1272-82.
48. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. *Gut*. 2007 Aug;56(8):1124-31.
49. JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipoapoptosis. Cazanave SC, Mott JL, Elmi NA, Bronk SF, Werneburg NW, Akazawa Y, Kahraman A, Garrison SP, Zambetti GP, Charlton MR, Gores GJ. *J Biol Chem*. 2009 Sep 25;284(39):26591-602.
50. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S, Charlton MR, Gores GJ. *J Hepatol*. 2010 Apr; 52(4):586-93.

51. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(3):893-901.
52. Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. Barthwal MK, Sathyanarayana P, Kundu CN, Rana B, Pradeep A, Sharma C, Woodgett JR, Rana A. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):3897-902.
53. AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance. Yuan ZQ, Feldman RI, Sussman GE, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ. *J Biol Chem.* 2003 Jun 27;278(26):23432-40.
54. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. Hausenloy DJ, Yellon DM. *Atherosclerosis.* 2009 Jun;204(2):334-41.
55. Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. de Rougemont O, Lehmann K, Clavien PA. *Liver Transpl.* 2009 Oct;15(10):1172-82. Review.
56. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. Woodgett JR. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Apr;17(2):150-7. Review.
57. 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.
58. 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.
59. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P selectin up-regulation in the rat.. Peralta C, Fernandez L, Panes J,

- Prats N, Sans M, Pique´ JM, Gelpi E, Rosello`-Catafau J. *Hepatology*. 2001 Jan;33(1):100-113.
60. Contribution of adenosine A2 receptors to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat liver. Arai M et al. *Hepatology*. 2000 Aug; 32(2):297-302.
61. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. Yin DP et al. *Transplant* 1998 Jul; 66(2):152-157.