UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE

CORSO DI DOTTORATO IN METODOLOGIA CLINICA XXV Ciclo

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

UN' AUMENTATA ESPRESSIONE DEL SUBSTRATO DEL RECETTORE DELL'INSULINA 2 (IRS-2) È ASSOCIATA A STEATOEPATITE E A DISMETABOLISMO LIPIDICO IN PAZIENTI AFFETTI DA OBESITA' GRAVE

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE MED 09

Dr.ssa RAFFAELA RAMETTA

TUTOR
Chia.ma Prof.ssa SILVIA ROSSANA FARGION

COORDINATORE
Chia.mo Prof. MARCO CATTANEO

A.A. 2011-2012

INDICE

RIASSUNTO **4**

1. INTRODUZIONE **6**

1.1. NAFLD 7

1.1.1. Definizione ed epidemiologia 7

1.1.2. Aspetti clinici della NAFLD 8

1.1.3. Anatomopatologia della NAFLD 9

1.1.4. Patogenesi della NAFLD 10

1.2. Obesità 14

1.2.1. Definizione ed epidemiologia e comorbidità 14

1.3. Insulino resistenza *16*

1.3.1. L'insulina e le sue funzioni 16

1.3.2. Pathway insulinico 16

1.3.3. NAFLD e insulino resistenza 18

1.3.4. Obesità e insulino resistenza 19

2. BACKGROUND E SCOPO **21**

3. MATERIALI E METODI **24**

3.1. Soggetti 25

3.2. Analisi istologiche 26

3.3. Determinazione dei livelli di mRNA 26

3.4. Determinazione dei livelli proteici 27

3.5. Analisi statistiche 28

4. RISULTATI **29**

4.1. Caratteristiche cliniche e metaboliche associate alla NASH 30

4.2. L'espressione di IRS2 è associata alla NASH e alla dislipidemia. 30

4.3. Regolazione dell'attività di FOXO1 e AKT 31

4.4. Lipogenesi 33

4.5. Lipolisi ed export delle lipoproteine 34

5. DISCUSSIONE 35

6. FIGURE E TABELLE 40

7. BIBLIOGRAFIA 51

RINGRAZIAMENTI 64

RIASSUNTO

UN'AUMENTATA ESPRESSIONE DEL SUBSTRATO DEL RECETTORE DELL'INSULINA 2 (IRS-2) È ASSOCIATA A STEATOEPATITE E A DISMETABOLISMO LIPIDICO IN PAZIENTI AFFETTI DA OBESITÀ GRAVE

Obiettivo: Lo scopo di questo lavoro è stato di valutare se la deregolazione delle molecole coinvolte nel signalling insulinico dipendente da FOXO1 nel fegato sia associato alla de novo lipogenesi (DNL) ed ad un alterato metabolismo lipidico in pazienti gravemente obesi.

Design: Studio retrospettivo osservazionale.

Soggetti: Abbiamo considerato 71 soggetti obesi (età compresa tra 20 e 68 anni; BMI>40 kg/m2 or BMI>35 kg/m2 in presenza di complicazioni metaboliche) classificati in tre gruppi secondo l'istologia epatica: controlli (n=12), steatosi semplice(n=27), e steatoepatite non alcolica (NASH; n=32). Abbiamo valutato i punti chiave del signalling insulinico e l'espressione genica delle molecole implicate nel pathway glucoregolatorio e nella DNL insulino dipendenti mediante PCR quantitativa real-time e Western blotting.

Risultati: I pazienti con steatosi semplice mostrano una ridotta fosforilazione della chinasi AKT1, responsabile della trasduzione del signalling insulinico, con conseguente sostenuta attività del fattore di trascrizione FOXO1 che media l'insulino resistenza a livello trascrizionale. Nonostante nessuna variazione significativa dell'espressione di insulin receptor substrate 1 (IRS1), i livelli proteici e di mRNA di IRS2, target di FOXO1, aumentano progressivamente con la severità della steatosi dai controlli alla NASH. L'espressione di IRS2 è correlata con la severità della steatosi, l'insulino resistenza e la dislipidemia. Nei pazienti con NASH, l'upregolazione di IRS2 è associata alla preservata attività di AKT2, che è il mediatore gli effetti stimolanti di insulina sulla DNL, e all'overespressione del suo target sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c), che induce DNL a livello trascrizionale. L'overespressione sia di FOXO1 che di SREBP1c convergono sull'upregolazione della glucochinasi, che fornisce substrati alla DNL, nei pazienti con NASH.

Conclusioni: La regolazione differenziale di IRS1 e IRS2 e dei loro effettori a valle AKT1 e AKT2 è coerente con l'upregolazione di FOXO1 e potrebbe giustificare lo stato paradossale di insulino resistenza a carico del pathway glucoregolatorio e l'aumentata insulino sensibilità di quello liporegolatorio tipico della steatosi e della dislipidemia in pazienti obesi con sindrome metabolica.

INTRODUZIONE

1.1 NAFLD

1.1.2 Definizione ed epidemiologia

La steatosi epatica non alcolica o NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease), è la malattia epatica più comune nei paesi occidentali, con una prevalenza maggiore dell'epatite virale C e del danno epatico causato dall'abuso alcolico. La NAFLD comprende un ampio spettro di condizioni che vanno dalla steatosi semplice alla steatoepatite non alcolica (NASH, Non Alcoholic Steatohepatitis) in assenza di abuso alcolico o di altre cause di danno epatico come le infezioni virali, le intossicazioni da farmaci o tossine e carenze nutrizionali o patologie metaboliche genetiche.

La maggior parte dei soggetti presenta un'evoluzione benigna della malattia, tuttavia la presenza di NASH predispone all'evoluzione a stadi più gravi di epatopatia, in quanto, a causa della presenza di danno epatocellulare (ballooning), necroinfiammazione e fibrogenesi, può portare a cirrosi, epatocarcinoma ed insufficienza epatica. [1, 2, 3, 4]

Gli individui affetti da NAFLD non presentano sintomi clinici caratteristici, se non nelle fasi più avanzate della malattia quando possono comparire insufficienza epatica o sintomi neoplastici; difatti i soggetti affetti sono spesso "sani" e asintomatici e la diagnosi viene posta in seguito ad accertamenti strumentali o di laboratorio eseguiti per altri motivi. Per questa ragione in passato, i rischi correlati a questa malattia sono stati spesso sottovalutati. Ad oggi, tuttavia, la NAFLD è riconosciuta come una delle principali cause di aumento cronico degli enzimi epatici e di cirrosi, ed è stata indipendentemente associata all'insorgenza e allo sviluppo di malattie cardiovascolari [5]. Da un punto di vista epidemiologico si stima che la prevalenza della NAFLD nella popolazione generale sia del 20-30% nei paesi occidentali. Mentre

in Italia, secondo i dati riportati dallo studio Dionysos [6], è stata posta una diagnosi di NAFLD nel 25% della popolazione. I dati di prevalenza risultano ancora maggiori negli obesi dove si raggiungono valori tra il 50 e il 75%. Sebbene inizialmente la NAFLD fosse considerata una malattia dell'età adulta, recentemente si è riscontrato un aumento dei casi anche nella popolazione pediatrica con una prevalenza del 3-10% nei soggetti normopeso e fino al 53% nei bambini obesi [7].

1.1.2 Aspetti clinici della NAFLD

Come accennato, la maggior parte dei soggetti affetti da steatosi è asintomatica e non presenta sintomi o segni clinici della malattia al momento della diagnosi, in minima parte lamenta uno stato di malessere ed affaticabilità con senso di peso nel quadrante superiore destro dell'addome. Nella maggior parte dei pazienti si riscontra epatomegalia all'esame obiettivo. Le alterazioni più frequenti sono rappresentate da livelli ematici costantemente aumentati degli enzimi di citonecrosi epatica, alanina aminotransferasi (ALT) and aspartato aminotransferasi (AST), accompagnati in molti pazienti anche da valori alterati di gamma-glutamiltrasferasi (γGT). Tuttavia, l'ipertransaminasemia non può costituire da sola un marker surrogato di NAFLD poiché non si riscontra in tutti i soggetti affetti.

Ad oggi il "gold standard" per la diagnosi definitiva di NASH è rappresentato dalla biopsia epatica in quanto nessuna tecnica di imaging non invasiva, pur consentendo di riscontrare la presenza di steatosi anche con elevata sensibilità, è in grado fornire informazioni sull'eventuale grado di infiammazione e fibrosi.

1.1.3 Anatomopatologia della NAFLD

La principale caratteristica istologica della NAFLD è l'accumulo di grasso sottoforma di trigliceridi negli epatociti, definito appunto steatosi, in misura superiore al 5% del peso del fegato [8]. Nei casi di NAFLD la steatosi è generalmente macrovescicolare, ossia caratterizzata da grandi gocce lipidiche singole nel citoplasma delle cellule, ma è possibile riscontrare steatosi microvescicolare, caratterizzata da più gocce di dimensioni ridotte che spingono il nucleo verso la periferia del citoplasma degli epatociti. Oltre alla steatosi, altre caratteristiche istologiche osservate nella NAFLD sono: infiammazione lobulare focale, infiammazione portale moderata e lipogranulomi. La presenza di lesioni epatocellulari e fibrosi indicano invece una progressione verso la steatoepatite. La NASH risulta, infatti, caratterizzata da ballooning, ossia presenza di epatociti rigonfi con un citoplasma che appare chiaro e rarefatto e un nucleo ipercromatico, da infiammazione lobulare caratterizzata da infiltrato di cellule infiammatorie come linfociti, eosinofili e raramente neutrofili, e da fibrosi dovuta alla deposizione di collagene ed altri elementi della matrice extracellulare attorno agli epatociti (figura 1).

Nel 2003 il Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network [9] ha sviluppato e validato uno score istologico, valido per l'intero spettro delle malattie incluse nella NAFLD, che si basa su uno score di attività della NAFLD (NAS) ottenuto dalla somma delle tre caratteristiche: steatosi (0-3), infiammazione lobulare (0-3), degenerazione balloniforme (0-2). La maggior parte dei soggetti con diagnosi di NASH presentano uno score NAS uguale o superiore a 5, mentre uno score uguale o inferiore a 2 lo esclude con assoluta certezza. La definizione minima per NAFLD istologica risulta definita, arbitrariamente, dalla presenza di una steatosi almeno del 5%.

1.1.4 Patogenesi della NAFLD

I meccanismi che sono alla base della patogenesi della NAFLD e della NASH sono il complesso risultato dell'interazione tra predisposizione genica, fattori ambientali e stili di vita e non sono stati ancora completamente chiariti. Il punto di vista generalmente condiviso è che alla base della patogenesi della NAFLD vi sia l'accumulo intraepatocitario di trigliceridi facilitato da un'alterata regolazione del metabolismo lipidico, che determina l'insorgenza della steatosi e causa lipotossicità, rendendo il fegato più suscettibile a insulti successivi dovuti principalmente a infiammazione e stress ossidativo e di conseguenza allo sviluppo di steatosi, steatoepatite, fibrosi epatica progressiva e cirrosi.

L'accumulo di trigliceridi può essere dovuto a molti fattori: l'aumento della disponibilità nel sangue di acidi grassi provenienti dal tessuto adiposo, l'aumento della lipogenesi *de novo* (DNL), la ridotta ossidazione lipidica, e/o la riduzione della sintesi ed esportazione delle VLDL (very low density lipoproteins) [10]. È stato dimostrato infatti, che i pazienti affetti da NAFLD mostrano aumentati livelli di lipolisi e di acidi grassi liberi (FFA, free fatty acids) circolanti, così come un'aumentata secrezione di VLDL [11, 12].

L'accumulo di grasso nel fegato, che causa la steatosi, è strettamente correlato ad uno stato infiammatorio cronico indotto dagli stessi FFA, pertanto, il loro immagazzinamento in esteri di glicerolo, rappresenterebbe inizialmente un meccanismo protettivo per il fegato [10]. L'accumulo prolungato di FFA, tuttavia, causa un sovraccarico della via metabolica che porta alla loro β-ossidazione a livello mitocondriale, causando la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), con i relativi danni strutturali e funzionali dei mitocondri documentati nei pazienti con NASH [13], e quindi stress ossidativo che rappresenta uno dei principali fattori

responsabili della progressione della steatosi semplice a NASH. Lo stress ossidativo, infatti, causando danni a DNA e proteine e lipoperossidazione, un processo altamente degradativo nei confronti degli acidi grassi polinsaturi che costituiscono le membrane cellulari, è in grado di attivare e sostenere la risposta infiammatoria intracellulare attraverso la produzione di citochine proinfiammatorie, e di indurre necrosi epatocitaria. Oltre al danno mitocondriale, lo stress ossidativo, mediante la produzione di ROS, è responsabile della compromissione della funzionalità del reticolo endoplasmico [14, 15]. Lo stress del reticolo endoplasmico (ER stress) è una condizione di alterazione nell'equilibrio di questo organello dovuta all'accumulo intrareticolare delle proteine non correttamente ripiegate e denaturate (in conseguenza a stress fisici o chimici, come ipertermia e variazioni di pH, insulti tossici, infezioni virali, mutazioni genetiche e stress ossidativo) o alle alterazioni dell'omeostasi del calcio o dello stato redox del reticolo. L'ER stress attiva una risposta compensatoria (UPR, Unfolded Protein Response) volta inizialmente a ripristinarne la corretta omeostasi che: promuove l'espressione di fattori antiossidanti, di proteine chaperones, per facilitare il corretto processo di ripiegamento delle proteine già sintetizzate, e componenti dell'ERAD (endoplasmic reticulum associate protein degradation) per consentire la degradazione delle proteine non correttamente ripiegate, e da ultimo blocca la sintesi proteica cellulare, al fine di alleggerire il sovraccarico del reticolo gestendo la situazione di stress. Tuttavia se questa situazione persiste, l'ER stress attiva una cascata di segnale che induce infiammazione e apoptosi [16]. L'induzione dell'ER stress potrebbe avere un ruolo importante nella patogenesi della NAFLD. La risposta compensatoria attuata infatti, si ripercuote sul metabolismo lipidico, alterando la produzione e la secrezione delle

VLDL, e su quello glucidico, interferendo con l'espressione di fattori di trascrizione coinvolti nella sua regolazione [17].

La progressione della steatosi semplice a NASH è indicata dalla presenza di infiammazione e fibrosi; i meccanismi molecolari alla base dell'infiammazione sono ampiamente interconnessi con quelli responsabili del danno epatocellulare e della fibrosi.

I prodotti della perossidazione lipidica, causata dallo stress ossidativo iniziale, sono in grado di esercitare un'azione chemiotattica per i neutrofili e di attivare le cellule stellate epatiche [18, 19], cellule non parenchimali deputate alla sintesi di matrice extracellulare, che incrementano la produzione e la deposizione del tessuto fibroso. In corso di steatosi, la presenza di stress ossidativo e gli elevati livelli di TNFα (Tumor Necrosis Factor α), una citochina infiammatoria prodotta principalmente dal tessuto adiposo, attivano la cellule di Kupffer che sostengono il processo infiammatorio contribuendo all'attivazione di fattori trascrizionali nucleari come NF-kB che controllano la produzione proprio di TNFα, oltre che di altre citochine infiammatorie, aumentando il danno epatocellulare.

Recentemente è stata data rilevanza nella patogenesi della steatoepatite al ruolo di organo endocrino ricoperto dal tessuto adiposo che è in grado di integrare segnali provenienti da diversi organi, tra cui fegato, muscolo scheletrico e pancreas, rispondendo con la secrezione di importanti mediatori molecolari definiti adipochine, come adiponectina, resistina, leptina, visfatina, e di diverse citochine, incluse TNFα, le interleuchine (IL1, IL 6, IL18) e MCP1 (monocyte chemotactic protein-1). Alcune di queste molecole, come l'adiponectina e la leptina sono insulino sensibilizzanti ed hanno un'azione antinfiammatoria, mentre altre, come TNFα e la resistina, agiscono come antagonisti dell'insulina ed hanno attività proinfiammatoria. Si è riscontrato che

i livelli plasmatici di adiponectina in pazienti NAFLD, sono diminuiti, ed inversamente correlati all'insulino-resistenza epatica, al contenuto di grassi nel fegato [20], al grado di infiammazione [21] ed alla fibrosi [22]. Alti livelli plasmatici di TNFα, e bassi di adiponectina, sono stati indicati come fattori predittivi indipendenti di NASH in pazienti NAFLD. È quindi plausibile che lo squilibrio tra adipochine pro- ed anti-infiammatorie sia coinvolto inizialmente nello sviluppo di insulino resistenza e successivamente nella progressione del danno epatico in corso di NASH [23].

1.2 Obesità

1.2.1 Definizione ed epidemiologia e comorbidità

L'obesità è il disturbo nutrizionale più frequente nel mondo. Con questo termine si intende un aumento del peso corporeo dovuto ad un accumulo di grassi nel tessuto adiposo in quantità eccedente le necessità fisiologiche dell'organismo, tale da determinare un rischio per la salute. È una patologia molto frequente ed in costante aumento tanto da rappresentare un grave problema di salute pubblica che coinvolge i paesi sviluppati tanto quanto quelli in via di sviluppo, e minaccia di raggiungere livelli pandemici entro il 2030 [24].

La sua prevalenza varia notevolmente da un paese all'altro influenzata da fattori genetici, ambientali, socio-economici e culturali, ma è maggiormente diffusa nei paesi industrializzati. Negli USA ha raggiunto dimensioni epidemiche causando fino a 300,000 morti/anno ed è diventata la seconda causa prevenibile di morte dopo il fumo [25].

Colpisce sempre più bambini e adolescenti: nel mondo circa 155 milioni di bambini sono sovrappeso o obesi. La prevalenza dell'obesità si è triplicata nelle ultime due decadi in Europa. In Italia in particolare, la percentuale di soggetti obesi raggiunge il 35% della popolazione, con il 10% rappresentato da soggetti definiti "grandi" obesi.

La funzione principale del tessuto adiposo consiste nell'immagazzinare e all'occorrenza mobilitare scorte di energia. L'obesità deriva da alterazioni nell'assunzione, utilizzazione e deposito delle sostanze nutritive ed è quindi il

risultato di uno squilibrio tra eccessivo introito calorico e dispendio energetico, per cui l'energia in eccesso viene depositata nel tessuto adiposo causando l'eccesso ponderale.

L'attenzione della comunità scientifica, che ha mosso ingenti risorse economiche verso lo studio della fisiopatologia dell'obesità, è determinata proprio dal fatto che questa è quasi invariabilmente associata ad altri fattori di comorbidità che la rendono indirettamente una voce importante in termini di costi per la salute pubblica. L'eccesso di peso corporeo dovuto principalmente ad un aumento dei depositi viscerali di grasso ha, infatti, conseguenze deleterie sulla salute. Molti studi hanno associato l'eccessivo accumulo di grasso addominale ad un aumentato rischio di contrarre malattie quali diabete, osteoartriti, sindrome da apnee notturne, dislipidemia, ipertensione, disturbi cardiovascolari, infarto, ictus, insulino resistenza, sindrome metabolica, e ad alcune forme cancerose sia negli uomini che nelle donne.

1.3 Insulino resistenza

1.3.1 L'insulina e le sue funzioni

L'insulina è un ormone proteico prodotto dalle β cellule delle isole di Langerhans del pancreas e secreto nella circolazione portale in risposta all'ingestione di cibo e ai livelli plasmatici di glucosio.

L'insulina ha un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine. In condizioni fisiologiche infatti, questo ormone induce l'uptake di glucosio nei tessuti periferici, principalmente nel muscolo scheletrico e tessuto adiposo, blocca la produzione epatica di glucosio, inibendo gli enzimi della gluconeogenesi e quelli della glicogenolisi, e favorisce lo stoccaggio di glucosio sottoforma di glicogeno e di trigliceridi mantenendo complessivamente l'omeostasi glucidica. L'insulina inoltre, promuove l'accumulo di FFA nel tessuto adiposo e nel fegato stimolando la lipogenesi e inibendo la lipolisi. (Figura 2)

1.3.2 Pathway insulinico

L'azione di insulina coinvolge una serie di cascate di segnale che iniziano in seguito al legame di insulina con il suo recettore. Il legame innesca l'autofosforilazione e attivazione del recettore di insulina (InsR) che a sua volta fosforila i suoi substrati

(IRS1 e IRS2). Questo evento porta all'attivazione della fosfatidil inositolo 3 chinasi (PI3K) e da ultimo all'attivazione delle isoforme della chinasi AKT (AKT1 e AKT2), che a loro volta fosforilano inattivandolo, FOXO1, il principale fattore di trascrizione dei geni che codificano per gli enzimi limitanti della gluconeogenesi (glucosio-6-fosfatasi, G6Pc e la fosfoenolpiruvato carbossichinasi PEPCK). [26] Nel fegato, la fosforilazione di FOXO1 ne media l'esclusione dal nucleo e la conseguente degradazione causando lo spegnimento della gluconeogenesi [27, 28]. Parallelamente l'insulina, attraverso AKT, media la traslocazione in membrana del trasportatore di glucosio GLUT2, facilitando la captazione del glucosio circolante da parte dell'epatocita. AKT inoltre, fosforila GSK3β (Glucosio Sintasi Chinasi 3 β) inattivandola e causando la defosforilazione della GS (Glucosio Sintasi) e di conseguenza l'attivazione della sintesi di glicogeno (Figura 2).

D'altro canto il fegato converte gli FFA in trigliceridi, un processo noto come *de novo* lipogenesi (DNL) [21], per usarli come riserve intracellulari o per esportarli nel torrente circolatorio come VLDL (very low-density lipoprotein). [29] L'insulina controlla la DNL a diversi livelli: stimolando l'attivazione del fattore di trascrizione SREBP1c (sterol response binding protein-1c), che induce l'espressione dei geni della lipogenesi (ACC, acetyl-CoA carboxylase, FAS, Fatty Acid Synthase e SCD, stearoyl-CoA desaturase), e regolando la produzione e l'esportazione di VLDL attraverso AKT e FOXO1.

1.3.3 NAFLD e insulino resistenza

Nel fegato steatosico, l'insulina perde la sua capacità di espletare le funzioni di controllo del metabolismo. Questo stato, noto come insulino resistenza, è uno degli eventi chiave nella fisiopatologia della sindrome metabolica e della NAFLD. Tale patologia è infatti concordemente considerata la manifestazione epatica della sindrome metabolica che è caratterizzata da un insieme di alterazioni quali intolleranza glucidica (intesa come tutto lo spettro di manifestazioni che vanno dall'alterata glicemia a digiuno al diabete mellito di tipo II), insulino resistenza, obesità viscerale, dislipidemia aterogenica ed elevata pressione arteriosa.

I soggetti affetti da steatosi sono fortemente insulino resistenti sia a livello centrale, infatti non sono più in grado di inibire la produzione epatica di glucosio [30], che periferico infatti mostrano una riduzione della captazione di glucosio nel muscolo [31], e un aumentato tasso di lipolisi nel tessuto adiposo con conseguente aumento degli FFA circolanti [32].

La presenza concomitante di diabete e/o obesità aggrava ulteriormente la condizione della patologia in quanto in questi soggetti tendono ad accumulare maggiormente grasso a livello addominale inasprendo lo stato di insulino resistenza.

Se da un lato c'è consenso generale sul fatto che l'insulino resistenza sia il fattore comune nella patogenesi della NAFLD e della sindrome metabolica, dall'altro non è ancora stato chiarito se esista una relazione causale tra l'insulino resistenza e la steatosi epatica [33].

1.3.4 Obesità e insulino resistenza

Sebbene le conseguenze di un eccessivo peso corporeo siano note da tempo è solo nelle ultime decadi che è emersa la stretta relazione tra obesità ed in particolare l'obesità viscerale e l'insulino resistenza [34] , che sono strettamente associate alla sindrome metabolica. [35, 36]

Il tessuto adiposo svolge un ruolo chiave nello sviluppo della sindrome metabolica in quanto protagonista importante nella genesi e nel mantenimento dell'insulino resistenza. Quando normalmente funzionante, il tessuto adiposo assicura che la maggior parte degli acidi grassi liberi siano catturati in maniera efficiente dagli adipociti, prevenendo l'esposizione agli acidi grassi di altri tessuti insulino-sensibili come il fegato e il muscolo scheletrico. Nell'obesità tale fine regolazione dell'immagazzinamento degli acidi grassi da parte degli adipociti, in funzione dello stato nutrizionale, viene meno, rendendo il metabolismo lipidico relativamente insensibile alle fluttuazioni dello stato nutrizionale. Inoltre, è stato dimostrato che l'obesità è associata ad uno stato di minima infiammazione cronica [37, 38], caratterizzata da infiltrazione macrofagica, con conseguente overproduzione di citochine infiammatorie e deregolazione della produzione di adipochine, ed associata allo sviluppo dell'insulino resistenza indotta dall'obesità [39]. Questo fenomeno si traduce in una riduzione dell'uptake di acidi grassi e di glucosio insulino-mediato [10] e in una ridotta soppressione del rilascio di glicerolo e acidi grassi liberi (FFA) nella fase postprandiale a livello del tessuto adiposo [41]. Complessivamente quindi, l'insulino resistenza del tessuto adiposo è responsabile dell'incremento nel flusso di FFA verso gli altri organi e, come precedentemente descritto, può sostenere e

peggiorare lo stato di insulino resistenza epatica e contribuire allo sviluppo della steatosi.

BACKGROUND E SCOPO

Nel fegato, il metabolismo glucidico e quello lipidico risultano strettamente collegati poiché condividono molti metaboliti intermedi e molecole segnale, rendendo difficile la separazione netta dei due rami e di conseguenza il loro studio. Visto il ruolo centrale dell'insulina nella loro regolazione e la presenza dell'insulino resistenza quale comune denominatore nella NAFLD e nell'obesità, il pathway insulinico è stato fatto oggetto di numerosi studi volti a chiarire i meccanismi che stanno alla base dell'insulino resistenza selettiva a livello epatico che nei pazienti con steatosi causa la persistenza della produzione epatica di glucosio mentre sostiene la DNL.

Le singole molecole responsabili della trasduzione del segnale insulinico sono state profondamente studiate in diversi modelli animali.

Topi knockout (KO) per IRS1 mostrano ritardo nella crescita e insulino resistenza principalmente a livello periferico con un'iperplasia compensatoria delle β-cellule pancreatiche [42, 43]. Topi KO per IRS2 invece sviluppano diabete e un'insulino resistenza severa dovuta all'insufficienza delle β-cellule pancreatiche [44, 45]. Taniguchi e colleghi [46], hanno dimostrato che topi doppio KO fegato specifici di IRS1 e IRS2 mostrano un'omeostasi glucidica danneggiata. Silenziando solo IRS1, riscontrano sia un aumento dell'espressione dei geni gluconeogenici che una riduzione della glucochinasi, mentre silenziando IRS2 nello stesso modello, riscontrano un aumento dei livelli di SREBP1c e dei suoi target correlabili a livelli più elevati di trigliceridi sia a livello epatico che serico, a suggerire che i due substrati del recettore di insulina, possano avere un ruolo complementare nel controllo del metabolismo epatico con IRS1 principalmente coinvolto nella regolazione dell'omeostasi glucidica ed IRS2 responsabile del controllo del metabolismo lipidico. Dati più recenti suggeriscono che la regolazione differenziale di HGO e DNL in corso di insulino resistenza avviene anche a livello delle isoforme di AKT. Infatti, il knockout

di AKT2 nel modello murino mostra effetti drammatici sull'espressione dei geni lipogenici e sulla steatosi [47, 48], mentre la ridotta attività di AKT1 sarebbe responsabile della persistente attività di FOXO1 e di conseguenza della continua produzione epatica di glucosio [30].

È interessante notare che è stato suggerito che l'upregolazione di FOXO1 rappresenti il link che spiega la regolazione differenziale delle branche del signalling insulinico, poiché si attiva in condizione di insulino resistenza, ma induce IRS2 e downregola alcuni potenziali inibitori del pathway di AKT [49, 50, 51].

Comunque, la maggior parte di questi studi sono stati condotti su modelli animali con risultati contrastanti correlabili ai diversi background, condizioni nutrizionali, diete e metodiche attraverso cui è stato ottenuto il silenziamento dei geni di interesse, e non sono stati tuttora confermati nell'uomo.

Abbiamo dimostrato in precedenza che nei pazienti obesi il progressivo aumento dell'attività di FOXO1 correlato all'inibizione di AKT1 e allo stress ossidativo con un aumento della severità della steatosi e della NASH è associato con insulino resistenza e persistente produzione epatica di glucosio [30, 52]. Dato che FOXO1 è anche coinvolto nella regolazione del metabolismo lipidico lo scopo di questo lavoro è stato di valutare se la deregolazione della molecole coinvolte nel signaling insulinico FOXO1 dipendente sia associato alla DNL e se il metabolismo lipidico alterato in pazienti gravemente obesi con uno spettro completo di patologia epatica.

MATERIALI E METODI

3.1 Soggetti

Per questo lavoro sono stati presi in considerazione 71 soggetti di una serie più ampia di 89 pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica presso la Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, tra il 2006 e il 2008, con BMI>40 kg/m^2 o BMI>35 kg/m^2 in presenza di complicazioni metaboliche quali diabete di tipo II, ipertensione, dislipidemia severa e sindrome da apnee notturne. Abbiamo escluso dall'analisi i soggetti con diabete franco o che assumevano terapie che potessero influenzare i livelli di glucosio (14 soggetti), i soggetti con consumo alcolico superiore a 30/20 g/die per maschi/femmine (1 soggetto), e i soggetti con epatite virale cronica (3 soggetti).

Il giorno dell'intervento sono stati dosati i seguenti parametri ematici: glucosio, colesterolo totale, colesterolo HDL (High-Density lipoprotein), colesterolo LDL (Low-Density lipoprotein), trigliceridi, alanina aminotransferasi (ALT) e aspartato aminotransferasi (AST). In ciascun paziente è stata effettuata un'agobiopsia epatica percutanea per l'analisi istologica. Il tessuto in eccesso, non necessario per l'analisi istologica, è stato in parte immediatamente congelato in azoto liquido per l'analisi del RNA, mentre l'analisi proteica è stata effettuata in un sottogruppo di 24 soggetti di cui era disponibile materiale sufficiente (Tabella 1).

Lo studio è stato condotto in conformità alle linee guida della dichiarazione di Helsinki del 1975 ed è stato approvato dalla comitato etico della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano. Ciascun soggetto ha fornito il consenso informato.

3.2 Analisi istologiche

Tutte le biopsie epatiche sono state analizzate in cieco da un singolo anatomopatologo, che ha assegnato a ciascun campione uno score (NAS, NASH Activity Score) secondo la classificazione di Kleiner et al. [9], ottenuto sommando i punteggi assegnati a tre parametri: la severità della steatosi (0-3), la necro-infiammazione intralobulare (0-3) e il ballooning epatocitario (0-2). La percentuale di epatociti con steatosi è stata determinata in almeno 10 lobuli epatici per paziente.
I soggetti sono stati quindi classificati in tre gruppi in accordo con l'istologia epatica: 32 soggetti con NASH, 27 con steatosi semplice e 12 controlli. I dati demografici ed antropometrici dei soggetti inclusi nello studio sono riassunti nella tabella 1.

3.3 Determinazione dei livelli di mRNA.

I campioni bioptici necessari per gli studi di espressione genica sono stati raccolti in RNA later (Ambion, Carlsbad, CA), immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino all'analisi. L'RNA è stato isolato usando il Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. La qualità dell'RNA è stata valutata misurando il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e l'assorbanza a 280 nm e considerata accettabile quando questo rapporto risultava maggiore o uguale a 1,8, quindi mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%.

Ciascun campione è stato quindi retrotrascritto in cDNA utilizzando il Superscript Vilo^{TM} cDNA synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) a partire da 0,5 µg di RNA totale. L'espressione genica è stata valutata mediante PCR quantitativa in real time usando la SYBR Green FAST master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) e correndo ciascun campione in triplicato su ABI PRISM 7500 fast (Applied Biosystems, Foster City, CA). I livelli di espressione genica sono stati normalizzati usando come housekeeping la β-actina. In tabella 2 sono indicate le sequenze dei primers utilizzate nell'analisi.

3.4 Determinazione dei livelli proteici

In un sottogruppo di 24 pazienti, per i quali era disponibile tessuto sufficiente, sono state effettuate l'analisi dei livelli proteici e dello stato di attivazione delle molecole di interesse mediante Western blotting. I campioni di tessuto, provenienti dalle biopsie epatiche dei pazienti prelevate il giorno dell'intervento, sono stati lisati in RIPA buffer contenente 1 mmol/L di sodio ortovanadato, 200 mMol di PMSF, e 0.02 µg/µL di apoprotinina per l'estrazione delle proteine. La stessa quantità di lisato proteico (25 µg) è stata separata mediante SDS-PAGE e trasferita elettroforeticamente su membrane di nitrocellulosa (Biorad, Hercules, CA). I blot così ottenuti sono stati incubati con gli anticorpi di interesse (recettore di insulina (INSR), IRS2, AKT 1/2, TRB3 and β actin della Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA; PDK 1, phosphoSer241-PDK1, AKT tot, phosphoSer473-AKT, phosphoThr308-AKT and PP2A della Cell Signaling Technology, Danvers, MA). L'acquisizione delle immagini

rilevate dopo esposizione con ECL è stata effettuata mediante lo strumento Chemi doc™ XRS Imaging system e l'espressione proteica è stata quantificata mediante il software dello strumento (Biorad, Hercules, CA).

3.5 Analisi statistiche

I dati sono espressi come media ± deviazione standard. Le medie sono state comparate mediante ANOVA e post hoc test e le correlazioni sono state eseguite con il test di Pearson. Le differenze tra i gruppi sono state considerate significative quando $p<0.05$ (two-tailed).

RISULTATI

4.1 Caratteristiche cliniche e metaboliche associate alla NASH

Come indicato in tabella 1, i soggetti inclusi erano principalmente di sesso femminile (69%), ma si osserva una maggiore prevalenza di maschi nel gruppo della NASH (p=0.0065). La distribuzione dell'età non varia tra i gruppi in maniera significativa. Come atteso, il BMI e i livelli di glucosio sono più alti nei pazienti con steatosi semplice e NASH rispetto ai soggetti con fegato normale (rispettivamente: p=0.02 and p=0.05). I valori ematici delle aminotransferasi sono significativamente più alti nei pazienti con NASH rispetto agli altri gruppi (ALT p=0.00004 vs. fegato normale, e p=0.0001 vs. Steatosi semplice; AST p=0.0006 vs. controlli, e p=0.003 vs. Steatosi semplice), mentre i livelli di colesterolo HDL, un marker sensibile dell'insulino resistenza epatica e della dislipidemia aterogenica, variano in maniera significativa tra i gruppi con valori progressivamente decrescenti dai soggetti con fegato normale, alle steatosi semplici, alle NASH (p=0.00001 controlli vs. NASH; p=0.01 fegato normale vs. Steatosi semplice; p=0.0058 Steatosi semplice vs. NASH).

4.2 L'espressione di IRS2 è associata alla NASH e alla dislipidemia.

Abbiamo in primo luogo analizzato la porzione prossimale del pathway insulinico. I livelli di mRNA del recettore di insulina INSR sono risultati diminuiti nelle steatosi e nelle NASH rispetto ai soggetti con fegato normale (p=0.004 and p=0.006, rispettivamente), ma i livelli proteici non differivano tra i gruppi (tabella 3). Questa

discrepanza tra espressione genica e proteica può essere giustificata dal tipo di turnover della proteina; INSR è infatti regolato anche attraverso un processo di endocitosi ligando mediata, pertanto il lisato proteico totale non è in grado di discriminare tra la frazione di INSR espressa sulla superficie cellulare, e quindi biologicamente attiva, e quella internalizzata. Mentre i livelli di mRNA IRS1 non differivano tra i gruppi, quelli di IRS2 aumentavano progressivamente con la severità dell'istologia epatica (tabella 3), con valori più alti nella NASH rispetto al gruppo di controlli (p=0.005) e a quello delle Steatosi semplici (p=0.032). I livelli epatici di mRNA di IRS2 sono risultati correlati con i marker serici di danno epatico (AST, p=0.0003, ALT p=0.024, colesterolo HDL (p=0.005), e con la severità della steatosi non solo se misurata complessivamente come NASH activity score (NAS p=0.0002), ma anche con tutte le singole componenti del NAS (steatosi, p=0.0004, ballooning, p=0.03, necro-infiammazione, p=0.004, fibrosi p=0.008, percentuale di steatosi p=0.0009; figura 4). Inoltre, in linea con i risultati di espressione genica, anche i livelli proteici di IRS2 aumentavano progressivamente con la severità dell'istologia epatica (Figura 5).

4.3 Regolazione dell'attività di FOXO1 e AKT

Per valutare la rilevanza potenziale dell'aumento di IRS2 nella disregolazione del signaling insulinico e nella patogenesi della NASH, abbiamo analizzato l'espressione e l'attività delle due isoforme di AKT principalmente espresse nel fegato (tabella 3). A livello di espressione genica non sono state rilevate differenze significative tra i

gruppi in analisi né per AKT1, né per AKT2. Allo stesso modo i livelli proteici di AKT totale non mostravano differenze tra i gruppi [30], ma analizzando lo stato di fosforilazione delle due diverse isoforme di AKT abbiamo osservato una riduzione significativa della fosforilazione di AKT1 a livello della treonina 308 (pT308AKT1) nella NASH (p=0.021). I livelli di fosforilazione in pT308AKT2 tendevano ad aumentare anche se non in maniera significativa, mentre non si sono evidenziate variazioni significative nello stato di fosforilazione di AKT alla serina 473 (pS473AKT). Inoltre, si è riscontrato da un lato, una progressiva riduzione del rapporto pThr308AKT1/AKT1, che riflette lo stato di attivazione di AKT1, nelle steatosi semplici e nelle NASH rispetto ai soggetti con fegato normale (p=0.009 e p=0.03 rispettivamente), mentre dall'altro si rilevava una tendenza all'aumento dell'attività di AKT2 con il peggioramento della malattia epatica.

La riduzione dell'attivazione di AKT1 è coerente con l'upregolazione dei livelli proteici di FOXO1, un fattore trascrizionale che è stato dimostrato indurre IRS2 [49, 50, 51]. Infatti, come precedentemente riportato [30], abbiamo qui confermato un aumento progressivo dei livelli proteici di FOXO1 dai controlli alla NASH, mentre la sua forma fosforilata (pS256FOXO1) tendeva a diminuire con il peggioramento della malattia epatica. Il rapporto pS256FOXO1/FOXO1 totale, che riflette lo stato di attivazione della proteina, diminuiva con la severità della malattia epatica (p=0.0044 fegato sano vs. NASH, and p=0.017 Steatosi Semplice vs. NASH), coerentemente con lo stato di insulino resistenza (figura 5). I livelli di mRNA e proteici della pseudochinasi tribble3 (TRB3), un altro target di FOXO1 [49] che agisce come modulatore dell'attività di AKT, non venivano invece modulati dall'istologia epatica.

4.4 Lipogenesi

Poiché AKT2 media l'azione di insulina sulla *de novo* lipogenesi (DNL) inducendo l'attivazione di SREBP1c [47, 53, 54], abbiamo valutato il metabolismo lipidico al fine di verificare se la preservata attivazione dell'attività di AKT2 supporti la DNL nella NASH.

La DNL è stimolata da insulina inizialmente attraverso l'attivazione della glucochinasi (GCK) [54, 55]. I livelli epatici di mRNA della GCK sono risultati aumentati nella NASH rispetto a fegato sano e alle steatosi semplici ($p=0.01$ and $p=0.001$, rispettivamente; tabella 3). Allo stesso modo, i livelli di mRNA di SREBP1c risultavano aumentati nella NASH rispetto sia ai soggetti con fegato sano che alle steatosi semplici ($p=0.035$, and $p=0.02$ rispettivamente), e sono risultati correlati positivamente alla severità della steatosi ($p=0.013$), confermando dati precedenti che indicavano che SREBP1c è indotto da insulina anche durante gli stati di profonda insulino resistenza [56]. SREBP1c regola la DNL inducendo la trascrizione di Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), Fatty acid synthase (FAS) e Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), gli enzimi rate-limiting della sintesi di acidi grassi Tuttavia, non abbiamo rilevato differenze significative tra i vari gruppi nell'espressione genica di questi enzimi, ad eccezione di un trend all'aumento progressivo dei livelli di mRNA di FAS e SCD1 dai soggetti con fegato sano alla NASH. Inoltre i livelli di mRNA di FAS e SCD1 risultavano correlati con i livelli di espressione di GCK ($p=0.01$ e $p<0.0001$, rispettivamente; tabella 2).

4.5 Lipolisi ed export delle lipoproteine

Abbiamo successivamente valutato altri possibili meccanismi implicati nella patogenesi della steatosi, come la diminuita β-ossidazione e la secrezione delle VLDL. I livelli di mRNA di PPARα, che controlla l'espressione degli enzimi coinvolti nel catabolismo lipidico, come la carnitina palmitoil trasferasi (CPT1) sono risultati ridotti nella NASH rispetto ai soggetti con fegato sano e alle steatosi semplici (p=0.035 e p=0.05, rispettivamente; tabella 2). Parallelamente abbiamo rilevato un trend alla diminuzione dei livelli di espressione di CPT1 dal fegato sano alle steatosi semplici e NASH. Sia PPARα che CPT1 sono inversamente correlati al NAS (p=0.015 e p=0.032, rispettivamente), alla severità della steatosi (p=0.021 e p=0.044, rispettivamente) e ai livelli di espressione di IRS2 (p=0.045 e p=0.029, rispettivamente), suggerendo un ruolo della β-ossidazione degli acidi nella patogenesi della NAFLD.

Lo sbilanciamento metabolico tra la DNL e l'ossidazione degli acidi grassi, che è ben rappresentata dal rapporto tra i livelli di mRNA di SREBP-1c e quelli di PPARα [57], risultano incrementati nella NASH rispetto alle steatosi semplici (p=0.02). Anche la sintesi e la secrezione di VLDL sono controllate da PPARα e facilitate da microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) che è regolata da insulina attraverso FOXO1 [58]. I livelli di mRNA di MTTP diminuivano progressivamente dai controlli alle steatosi semplici e NASH (p=0.03), suggerendo che i ridotti livelli di MTTP possono contribuire ad un accumulo lipidico negli epatociti (tabella 3).

L'espressione di Apolipoprotein C3 (ApoC3), un altro target di FOXO1 coinvolto nel metabolismo lipoproteico [59], non mostrava invece variazioni significative in relazione all'istologia epatica.

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo valutato se in pazienti gravemente obesi la modulazione selettiva del signaling insulinico epatico dipendente da FOXO1 come conseguenza della diminuzione dell'attività di AKT1 e dell'insulino resistenza [30, 60] supporti la DNL. In linea con l'ipotesi sperimentale, l'espressione di IRS2 è risultata associata alla severità della steatosi epatica e della NASH, in presenza di una preservata attività di AKT2 e dell'induzione di SREBP1c e GCK.

La NAFLD e l'obesità sono caratterizzate da insulino resistenza [61], la cui manifestazione epatica è costituita da un HGO inappropriatamente elevato, che abbiamo precedentemente associato ad un incremento dell'attività di FOXO1 nella NASH [30], mentre l'induzione della DNL contribuendo alla steatosi e alla dislipidemia sembra indicare uno stato di aumentata insulino sensibilità. Questo potrebbe implicare che gli approcci terapeutici volti ad aumentare i livelli di insulina potrebbero paradossalmente favorire la dislipidemia aterogenica e il danno epatico correlati alla NAFLD.

In letteratura sono disponibili molti lavori che in cui è stato studiato il ruolo selettivo giocato dalle molecole del signaling insulinico nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico in diversi modelli animali con risultati tuttavia contrastanti e senza, per ora, nessuna conferma nell'uomo. Abbiamo quindi studiato la regolazione dei modulatori del signaling del recettore di insulina che dipendono da FOXO1 nel fegato di pazienti gravemente obesi con un ampio spettro di malattia epatica.

Abbiamo confermato in via preliminare che nei pazienti obesi con NASH la riduzione della fosforilazione di AKT1 alla Treonina 308 si associa alla riduzione della fosforilazione di FOXO1, con conseguente aumento della sua forma nucleare attiva [30, 60, 62].

L'osservazione più interessante e nuova consiste nell'evidenza di una progressiva upregolazione di IRS2 con l'aumento della severità della steatosi, del danno epatico e della dislipidemia [63], ed è risultata speculare alla progressiva upregolazione e ipofosforilazione di FOXO1 con l'aumentare del danno epatico [30]. E' interessante notare che il costrutto mutato di FOXO1 costitutivamente nucleare induce IRS2 [64], che la delezione fegato-specifica di INSR è stata associata all'induzione epatica dello stesso IRS2 [65], e che l'espressione epatica di IRS2 risulta upregolata da FOXO1 durante lunghi periodi di digiuno [50, 51]. Nel complesso, questi dati suggeriscono l'ipotesi che la sostenuta attività di FOXO1 potrebbe essere responsabile dell'induzione di IRS2.

IRS1 invece non ha mostrato variazioni di espressione genica con la steatosi. Questo pattern di regolazione ricorda l'upregolazione di IRS2 mediata da FOXO1, durante i periodi prolungati di digiuno, fornendo un meccanismo che consente la gestione del passaggio dallo stato di digiuno a quello postprandiale al fine di rispondere prontamente alle fluttuazioni dei livelli di insulina [66]. Di conseguenza, l'upregolazione di IRS2 mediata dall'aumento dell'attività di FOXO1 nella NAFLD potrebbe rappresentare un meccanismo che collega l'iperinsulinemia all'induzione della DNL anche in condizioni post-prandiali [67, 68]. Questa ipotesi è ulteriormente supportata dalla deregolazione a valle dell'attività di AKT. Infatti, benché come precedentemente riportato la fosforilazione pThr308AKT1, che ne riflette l'attività [69], diminuisce progressivamente con la severità dell'istologia epatica [30, 60], si riscontra anche un trend speculare all'upregolazione, o almeno alla preservazione dell'attività di AKT2. Si potrebbe ipotizzare che questa regolazione differenziale delle due isoforme di AKT sia responsabile degli effetti divergenti di insulina sul metabolismo glucidico e lipidico, ma al momento non è stato possibile dimostrare che

il signaling specifico di IRS2 avvenga attraverso AKT2. D'altro canto è stato dimostrato in modelli murini di insulino resistenza che AKT2 è richiesta per l'accumulo intraepatico di lipidi, dal momento che i topi knockout AKT2 specifico per il tessuto epatico non sviluppano steatosi a causa di una riduzione della DNL mediata da SREBP1c [47, 48, 53]. Altri gruppi hanno trovato che, sia *in vivo* nel modello murino di obesità e diabete che *in vitro* in linee cellulari di epatociti, una selettiva downregolazione dei livelli di pSer473AKT a fronte di una preservata fosforilazione di T308AKT potrebbero giustificare l'inibizione selettiva del signaling insulinico [70]. Comunque la fosforilazione sulle specifiche isoforme di AKT, così come l'espressione di IRS1 e IRS2, non è stata indagata nello studio in questione. È quindi possibile che i livelli di T308AKT mantenuti derivino dalla media dei livelli delle due isoforme della proteina.

Infatti, in linea con precedenti risultati [60], abbiamo anche osservato che la downregolazione di pT308AKT1 in pazienti obesi con NASH, mentre la progressiva diminuzione di pSer473AKT1 era meno marcata e non significativa nella stessa coorte di pazienti. È quindi poco probabile che la preservata attivazione di AKT1 alla Treonina 308 spieghi l'aumentata lipogenesi nei pazienti gravemente obesi con NASH.

Coerentemente con questi precedenti risultati, l'aumento dell'attività di AKT2 con la steatosi è rispecchiato da un aumento dei livelli di mRNA di SREBP1c nel fegato dei pazienti obesi, e dall'aumento parallelo del suo target GCK [55]. Inoltre, l'espressione genica di GCK è correlata a quella degli enzimi della DNL. L'aumentata disponibilità di zuccheri potrebbe stimolare la glicolisi e il pathway dei pentoso-fosfati, con il conseguente aumento di acetil-CoA e NADPH disponibile per la sintesi dei lipidi [71]. Inoltre il glucosio-6-fosfato è stato proposto come metabolita segnale per la

trascrizione di FAS [72, 73] e FAS e SCD1, geni che richiedono sia elevati livelli di insulina che di glucosio per essere espressi a livello massimale da parte degli epatociti [74, 75]. Questa ipotesi è corroborata dal fatto che l'assunzione di fruttosio tramite la dieta e un polimorfismo nel gene codificante per la proteina regolatoria di GCK che determinano la ridotta inibizione da substrato del fruttosio-6-fosfato rappresentano tra i principali fattori di rischio nello sviluppo della NAFLD [76]. Di conseguenza, sembra che il segnale derivante sia dall'insulino resistenza (ossia l'aumento di attività di FOXO1 mediato dalla ridotta attività di AKT1) [30, 60] e l'aumentato signaling insulinico sulla DNL (ottenuto attraverso l'induzione di SREBP1c associato all'aumento di IRS2 e alla preservata attività di AKT2) [77], convergano sulla GCK che fornisce substrati per la DNL.

Lo squilibrio tra DNL e β-ossidazione ed esportazione delle lipoproteine è un altro passibile meccanismo che contribuisce all'accumulo epatico di grasso. La compromissione della β-ossidazione è confermata dalla significativa riduzione dell'espressione di PPARα e del rapporto tra i livelli di mRNA SREBP-1c/PPARα [57], che è stato correlato sia con l'indice HOMA di insulino resistenza che con i livelli serici di insulina nei pazienti con NASH. Anche la downregolazione di MTTP, che è noto essere negativamente regolato da FOXO1 [77], è associato alla steatosi in questo gruppo di pazienti, suggerendo che l'aumento di FOXO1 possa favorire la steatosi anche riducendo l'esportazione di lipoproteine.

Questo studio soffre delle limitazioni inerenti alla valutazione dei campioni biologici umani, tra cui la variabilità inter-individuale, le variabili genetiche e ambientali che non possono essere misurate, la limitata quantità dei materiali di partenza che limita le analisi, e la mancanza della possibilità di indagare relazioni causali mediante esperimenti controllati. L'altro lato di questa medaglia è però rappresentato dalla

possibilità di acquisire una fotografia istantanea della situazione metabolica nel paziente obeso, che potrebbe aiutare a inquadrare nella giusta prospettiva gli studi precedenti sul modello animale, e a dare una visione di insieme preliminare da cui partire per spiegare il possibile meccanismo che è alla base della paradossale doppia risposta all'insulina del fegato steatosico nell'uomo.

In conclusione, abbiamo riportato una nuova regolazione differenziale di IRS1 e IRS2 e dei loro effettori a valle AKT1 e AKT2 in pazienti gravemente obesi con steatosi, che potrebbe giustificare lo stato paradossale di insulino resistenza del pathway glucidico e aumentata insulino sensibilità di quello lipidico tipico della NAFLD. Secondo questo modello (Figura 6), la ridotta inibizione di FOXO1 mediata da AKT1 dovuta all'insulino resistenza porterebbe all'aumento della HGO, inibirebbe l'esportazione della lipoproteine, e upregolerebbe IRS2. IRS2 trasdurrebbe il segnale di insulina attraverso AKT2 su SREBP1c, supportando la DNL. I pathway di FOXO1 e SREBP1c convergerebbero ulteriormente su GCK fornendo substrati per la DNL. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per valutare il possibile meccanismo di interazione e regolazione della DNL attraverso IRS2 e AKT2 in modelli sperimentali.

FIGURE E TABELLE

FIGURA 1

Lo spettro della Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.

(A) Progressione schematica della NAFLD. L'accumulo di TG sottoforma di gocce lipidiche negli epatociti causa la steatosi. La steatosi, quando si associa con infiammazione, morte cellulare e fibrosi viene definita NASH, che può progredire in cirrosi. I soggetti con cirrosi presentano un aumentato rischio di carcinoma epatocellulare. (B) Le sezioni istologiche illustrano: fegato normale, steatosi, NASH e cirrosi. Le fibre di collagene solo colorate con colorazione tricromica di Masson. Vengono evidenziate: la triade portale (PT), che comprende arteria epatica, vena porta e dotto biliare, e la vena centrale (CV). (Figura adattata da: *Cohen JC, et al. Human fatty liver disease: old questions and new insights. Science (2011) 332:1519-1523*).

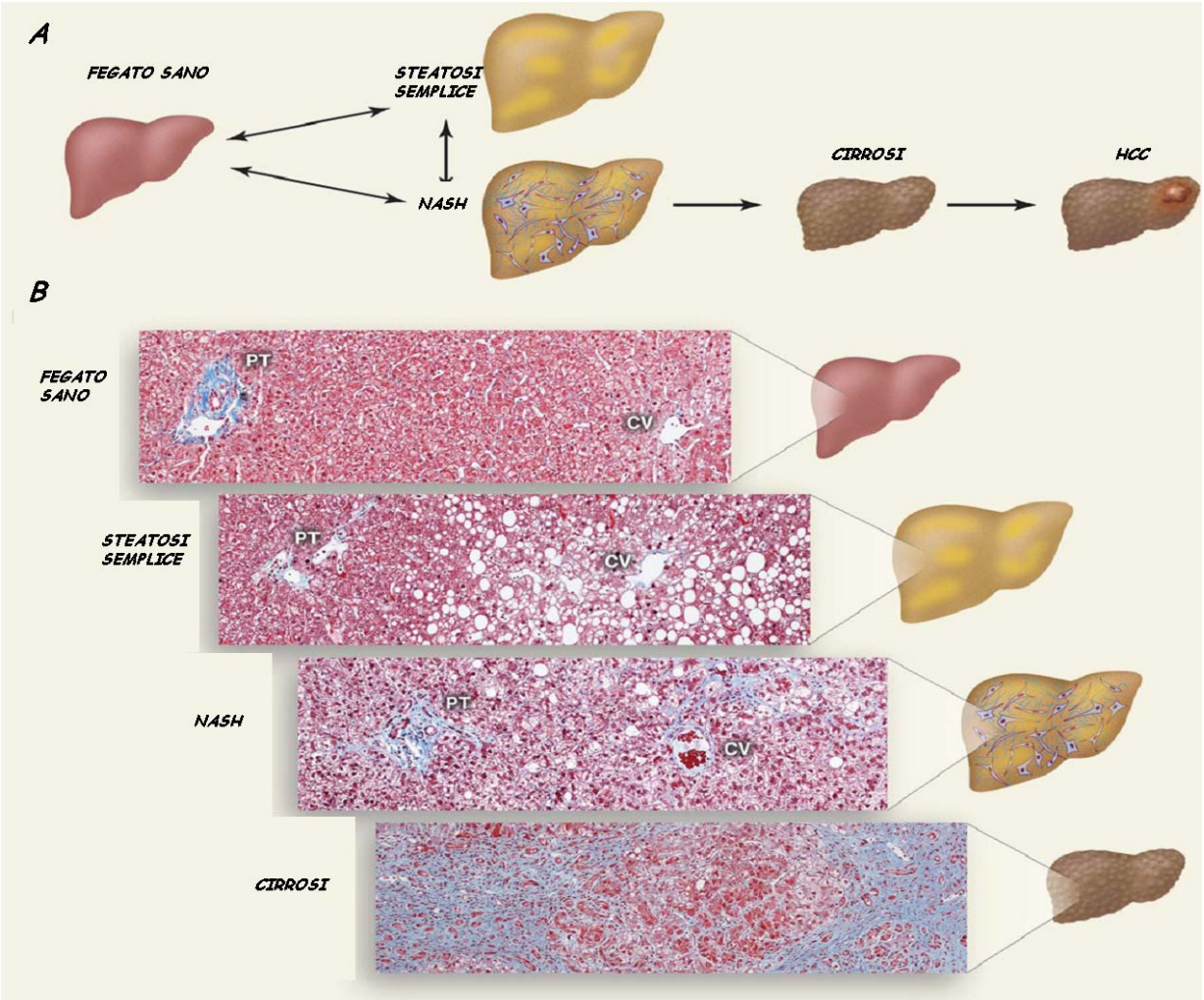

FIGURA 2 Rappresentazione schematica del pathway di segnale di insulina e principali effetti dell'ormone sul metabolismo dell'epatocita.

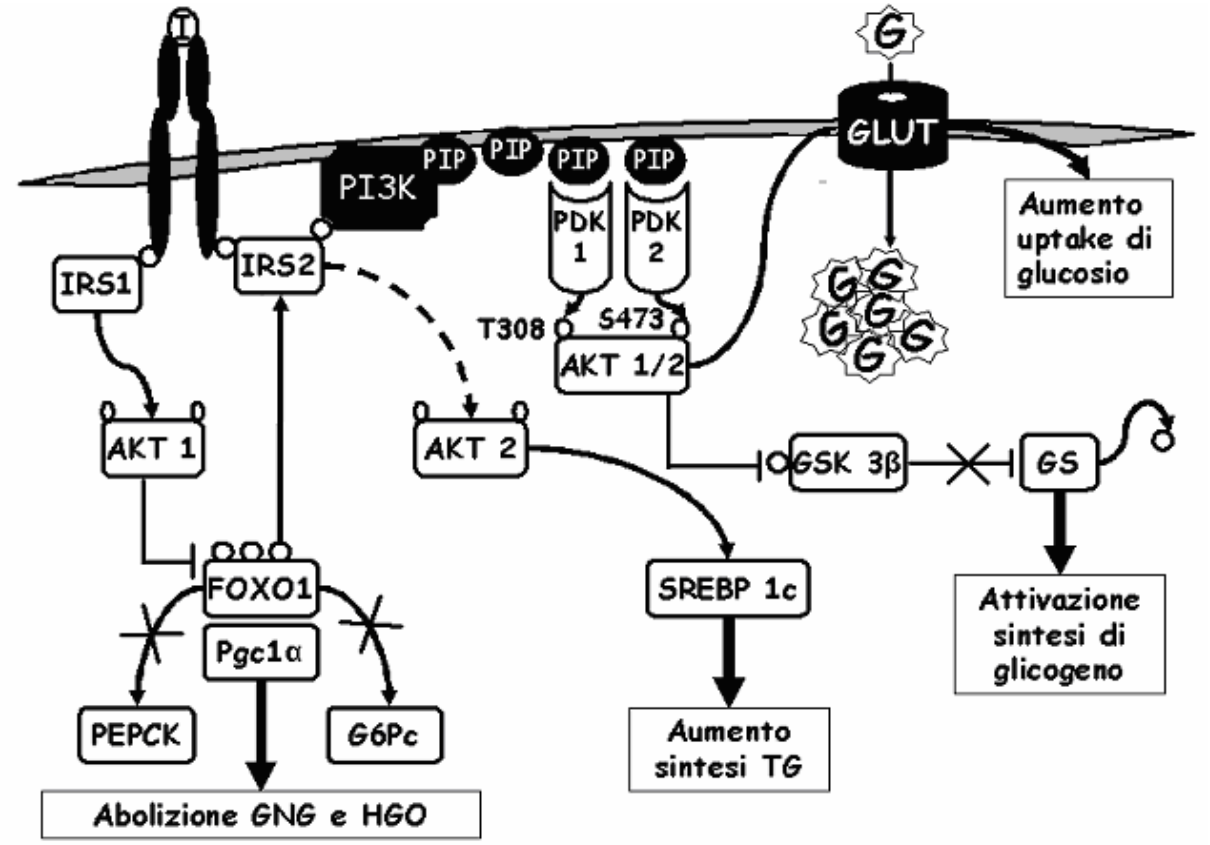

FIGURA 3 Rappresentazione schematica della glicolisi e della DNL epatica. Ruolo del fattore di trascrizione SREBP 1c nella regolazione del metabolismo lipidico.

(Adattato da: *Tessari P et al Hepatic lipid metabolism and Non alcoholic fatty liver disease Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases (2009) 19:291-302*).

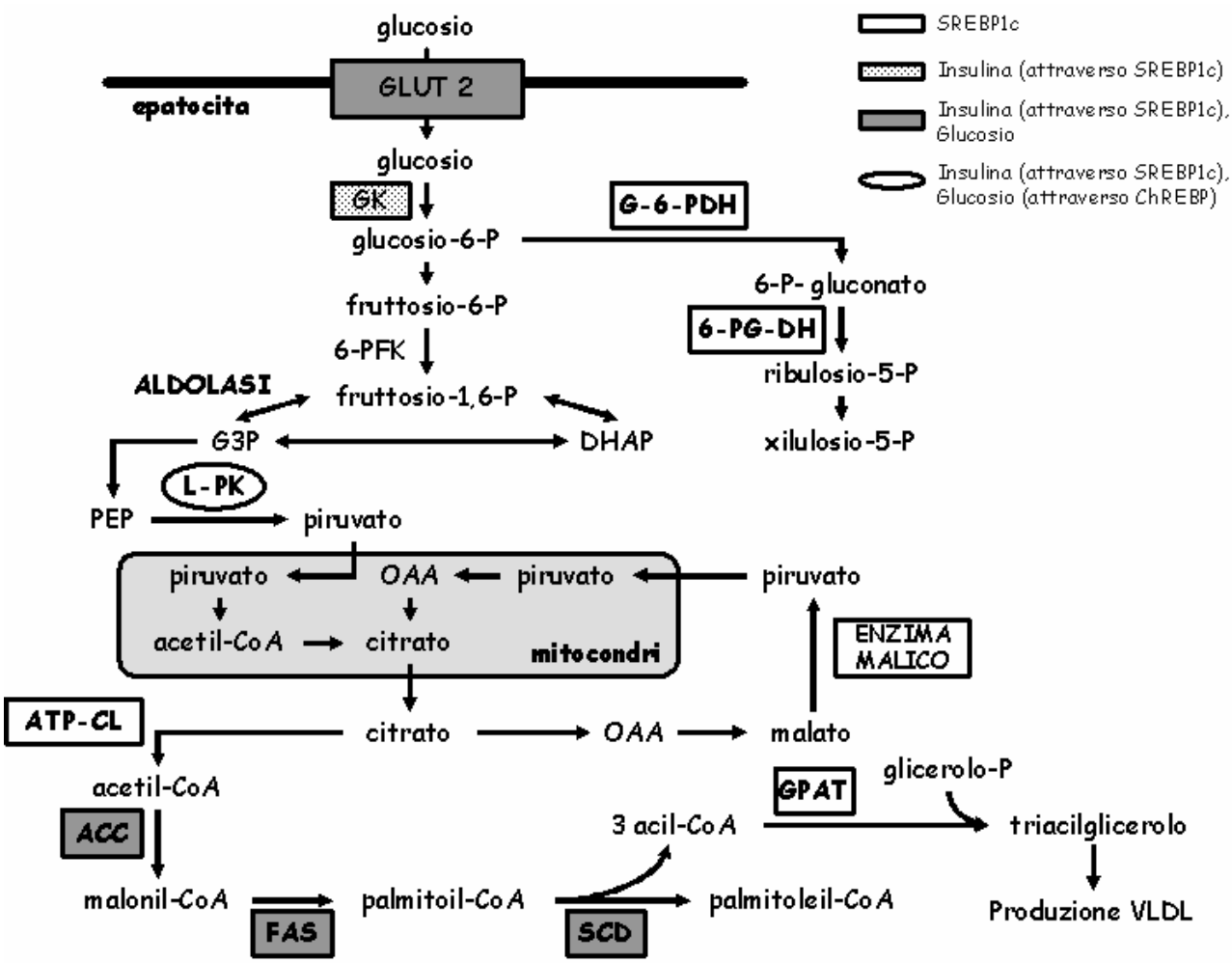

FIGURA 4 Correlazioni tra i livelli di espressione genica di IRS2 e severità del danno epatico.

I livelli epatici di mRNA di IRS2 sono significativamente correlati con la severità della steatosi rilevata all'istologia (A) NAS p=0.0002; (B) steatosi p=0.0004; (C) ballooning p=0.03; (D) necro-infiammazione p=0.004; (E) fibrosi p=0.008; (F) percentuale di steatosi p=0.0009; e con i marker serici di danno epatico (G) AST p=0.0003; (H) ALT p=0.024; (I) colesterolo HDL (p=0.005).

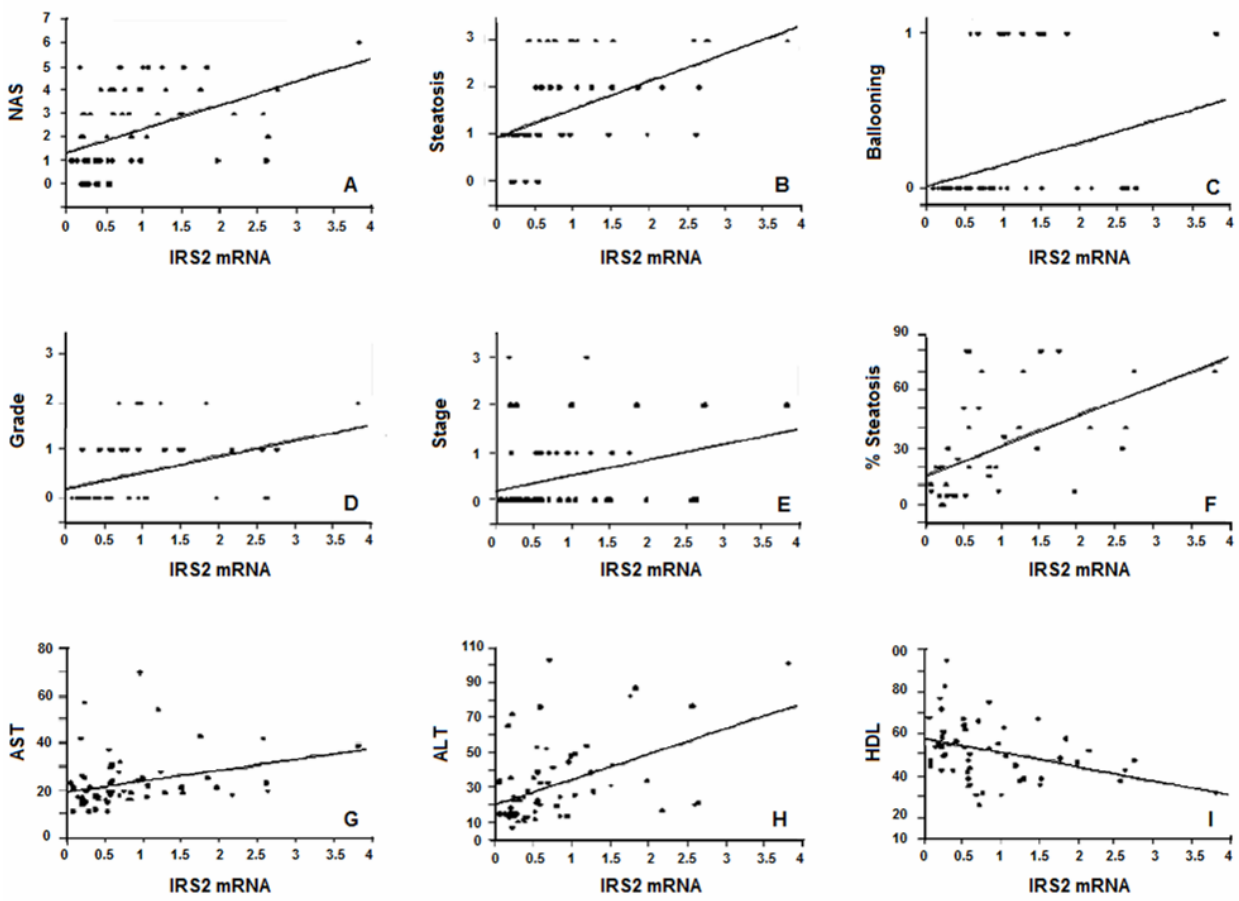

FIGURA 5 Valutazione dell'espressione genica e proteica di IRS2 e FOXO1 e del suo stato di attivazione.

L'espressione di IRS2 è stata valutata sia mediante western blotting (A) che mediante qRT-PCR (B) nei pazienti raggruppati a seconda dell'istologia epatica. L'espressione proteica di FOXO1 e la sua fosforilazione alla Ser256 è stata valutata mediante western blotting (C). I blot raffigurati sono rappresentativi di almeno 3 esperimenti. β-actina è rappresentata come controllo. Gli istogrammi rappresentano le quantificazioni delle membrane (D). Stato di attivazione della proteina FOXO1 calcolato come rapporto tra pSer256FOXO1 e FOXO1 (E) *p<0.05 in controlli vs. steatosi semplice; # p<0.05 in controlli vs. NASH; § p<0.05 in steatosi semplice vs. NASH.

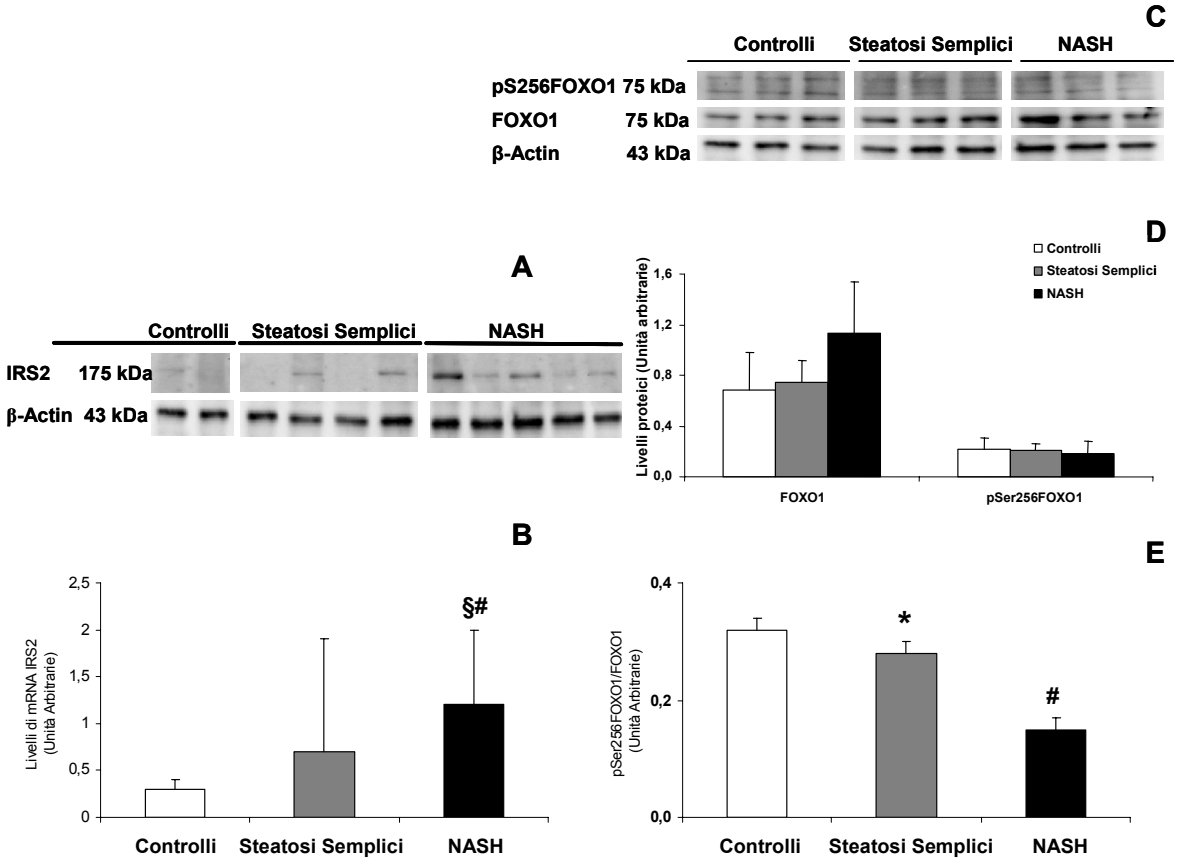

FIGURA 6 Rappresentazione schematica dei meccanismi dell'insulino resistenza epatica post recettoriale ipotizzati in base ai risultati del nostro studio.

Il pathway glucoregolatorio insulino resistente è rappresentato dalle frecce rosse. IRS1 non è in grado di trasdurre il ridotto segnale insulinico attraverso la down regolazione di FOXO1 mediata da AKT1, che in condizioni normali impedisce la fosforilazione e l'esclusione dal nucleo di questo fattore di trascrizione, causando di fatto la persistenza della gluconeogenesi. L'accumulo di glucosio e l'attivazione di FOXO1 e SREBP1c porta all'upregolazione di GCK che rende disponibile il glucosio-6-fosfato per la DNL. Le frecce verdi rappresentano il pathway liporegolatorio insulino sensibile. L'upregolazione di IRS2 trasduce il segnale insulinico, presumibilmente attraverso l'upregolazione di AKT2 (linea tratteggiata), su SREBP1c inducendo l'upregolazione della DNL e di GCK. Le frecce gialle indicano l'aumentata DNL e la ridotta β-ossidazione degli acidi grassi e della loro esportazione.

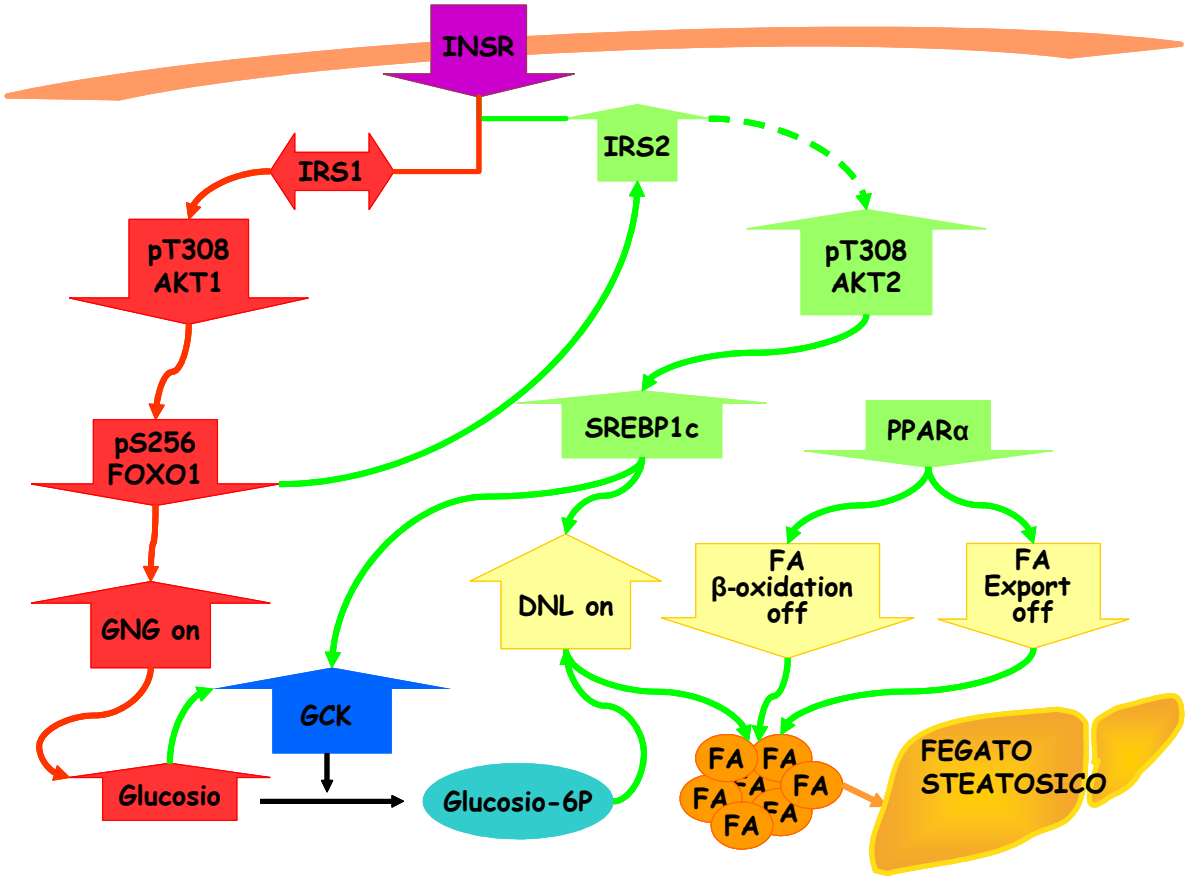

TABELLA 1 Caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio classificati secondo l'istologia epatica

I dati sono espressi come media ± deviazione standard. # $p<0.05$ in controlli vs NASH; * $p<0.05$ in controlli vs steatosi semplice; § $p<0.05$ in steatosi semplice vs NASH.

Caratteristiche demografiche ed antropometriche dei soggetti inclusi nello studio				
	Controlli	***Steatosi semplice***	***NASH***	***p***
Soggetti	12	27	32	
Sesso (F)	10 (83.3%)	23 (85.1%)	16 (50%)	n.s.
Età (anni)	39.6 ± 10.2	40.0 ± 8.8	41.7 ± 10.2	0.73
BMI (kg/m^2)	38.4 ± 7.9	40.8 ± 6.8	43.9 ± 6.3 #	0.04
Glucosio (mg/dl)	87.7 ± 13.7	92.6 ± 13.9	97.4 ± 13.6 #	0.11
Colesterolo totale (mg/dl)	195.1 ± 35.4	211.6 ± 46.9	199.6 ± 37.3	0.54
Colesterolo HDL (mg/dl)	68.2 ± 14.9	55.2 ± 11.8 *	44.8 ± 11.6 #§	0.0001
Colesterolo LDL (mg/dl)	116.7 ± 26.9	133.8 ± 34.7	123.5 ± 34.7	0.43
Trigliceridi (mg/dl)	105.0 ± 61.1	156.2 ± 93.8	174.4 ± 88.1	0.18
ALT (UI/ml)	15.1 ± 5.1	24.3 ± 13.5	47.6 ± 28.1 #§	0.0001
AST (UI/ml)	15.4 ± 3.2	20.4 ± 8.9	29.2 ± 13.6 #§	0.0006
Caratteristiche demografiche ed antropometriche dei soggetti analizzati in Western Blotting				
	Controlli	***Steatosi semplice***	***NASH***	***p***
Soggetti	4	10	10	
Sesso (F)	4 (100%)	9 (90%)	6 (60%)	0.16
Età (anni)	46.0 ± 5.3	37.3 ± 7.6	39.5 ± 7.8	0.14
BMI (kg/m^2)	37.2 ± 11.5	39.6 ± 5.7	50.4 ± 10.9 #§	0.03
Glucosio (mg/dl)	86.5 ± 12.8	87.4 ± 7.1	98.7 ± 15.1	0.11
Colesterolo totale (mg/dl)	192.5 ± 35.4	208.8 ± 39.5	186.4 ± 40.1	0.32
Colesterolo HDL (mg/dl)	59.3 ± 3.8	51.8 ± 10.3	46.4 ± 11.0	0.09
Colesterolo LDL (mg/dl)	119.7 ± 32.0	129.3 ± 39.1	117.4 ± 32.6	0.51
Trigliceridi (mg/dl)	80.5 ± 20.5	171.1 ± 122.2	127.5 ± 79.2	0.40
ALT (UI/ml)	16.5 ± 8.0	23.5 ± 7.9	27.7 ± 12.9	0.18
AST (UI/ml)	18.0 ± 2.8	19.0 ± 6.2	26.7 ± 17.7	0.12

TABELLA 2. Sequenze dei primers utilizzati in qRT-PCR.

	Primer Forward	***Primer Reverse***
IR	GCTGAAGTTCACACAGCGCC	TCAACGGGCAGTTTGTCGAA
IRS1	GCTCCGAGACTTTCTCCTCA	GAGGGCACTGTTTGAAGTCC
IRS2	ACCTACGCCAGCATTGACTT	CAAAACGCAAACAGCACAAT
p110	GTCAATCGGTGACTGTGTGG	TCCATCGTCTTTCACCATGA
AKT1	ATCACACCACCTGACCAAGAT	TCAAATGCACCCGAGAAATA
AKT2	AAGAAGGACCCCAAGCAGAG	GTGGGGACACAAACCAAAAA
TRB3	TGGTACCCAGCTCCTCTACG	GACAAAGCGACACAGCTTGA
Foxo1	CTTGGATGGCATGTTCATTG	CCTGCTCACTAACCCTCAGC
SREBP1c	TGCATTTTCTGACACGCTTC	CCAAGCTGTACAGGCTCTCC
PPARα	ATGGCATCCAGAACAAGGAG	TCCCGTCTTTGTTCATCACA
FAS	GCTGGGTGGAGTCTCTGAAG	TGCAACACCTTCTGCAGTTC
ACC	ACCACCAATGCCAAAGTAGC	CTGCAGGTTCTCAATGCAAA
CPT1	TCGTCACCTCTTCTGCCTTT	ACACACCATAGCCGTCATCA
SCD1	CTGCAGGACGATATCTCTAGC	CCCAAAGCCAGGTGTAGAAC
MTTP	ACCTCAGGACTGCGAAGAAA	TTGGGATGAGAAGCAAATCC
GCK	ACCCCAGAAGGCTCAGAAGT	AAGGATGCCCTTATCGATGTC
β-ACTIN	GGCATCCTCACCCTGAAGTA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA

TABELLA 3 Livelli di mRNA e proteine dei geni coinvolti nel signaling insulinico e nella lipogenesi secondo l'istologia epatica

I dati sono espressi come media ± deviazione standard. # p<0.05 in controlli vs NASH; * p<0.05 in controlli vs steatosi semplice; § p<0.05 in steatosi semplice vs NASH; ¤ p<0.05 in NASH e steatosi semplice vs controlli.

Espressione genica				
Gene	***Controlli (n=12)***	***Steatosi semplice (n=27)***	***NASH (n=32)***	***p***
Signaling insulinico				
INSR	1.9 ± 1.2	0.9 ± 0.8 #	0.9 ± 0.9*	0.01
IRS1	0.9 ± 1.2	1.2 ± 1.1	1.1 ± 1.3	0.93
IRS2	0.3 ± 0.1	0.7 ± 1.2	1.2 ± 0.8 *§	0.008
p110	0.9 ± 1.0	1.2 ± 0.6	1.6 ± 1.0	0.41
AKT1	3.4 ± 2.6	3.6 ± 4.9	3.4 ± 6.7	0.98
AKT2	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.6	1.2 ± 2.1	0.46
TRB3	0.7 ± 0.6	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.8	0.69
FOXO1	1.2 ± 0.9	1.4 ± 0.8	0.7 ± 0.7	0.12
Metabolismo Lipidico				
SREBP1C	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.5	2.0 ± 1.3 *§	0.02
ACC	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.88
FAS	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.32
SCD1	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.2	0.19
GCK	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.9 ± 0.8 *§	0.002
PPARα	4.7 ± 0.9	4.5 ± 0.7	2.3 ± 0.6 *§	0.05
CPT1	4.9 ± 3.5	2.6 ± 2.5	2.7 ± 2.4	0.25
MTTP	1.2 ± 1.0	1.2 ± 0.5	0.8 ± 0.2 §	0.03
ER Stress				
CHOP	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.90
GRP78	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.88
XBP-1 (attivo)	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.67

Quantificazione dei livelli proteici ottenuti in Western Blotting				
Gene	***Controlli (n=4)***	***Steatosi semplice (n=10)***	***NASH (n=10)***	***p***
INSR	0.9 ± 0.1	1.6 ± 1.3	1.0 ± 0.4	0.32
IRS2	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.7¤	1.1 ± 1.0 ¤	0.46
AKT1	1.4 ± 0.9	1.4 ± 1.2	1.2 ± 0.8	0.72
AKT2	8.6 ± 8.1	7.4 ± 9.0	6.0 ± 6.9	0.86
pT308AKT1/AKT1	1.0 ± 0.5	0.3 ± 0.3 #	0.4 ± 0.4 *	0.02
pT308AKT2/AKT2	0.7 ± 0.3	1.2 ± 1.1	2.0 ± 2.6	0.44
pS473AKT1/AKT1	4.16 ± 4.18	2.08 ± 1.44	3.45 ± 3.06	0.09
FOXO1	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.25
pS256FOXO1/FOXO1	0.32 ± 0.02	0.28 ± 0.02 #	0.15 ± 0.02 *	0.01
FOXO1 non fosforilato	0.48 ± 0.1	0.58 ± 0.1	9.4 ± 0.2 *§	0.006
SREBP1C	0.10 ± 0.02	0.22 ± 0.02 #	0.40 ± 0.10 *	0.01
TRB3	2.9 ± 0.7	3.0 ± 1.3	2.7 ± 0.9	0.86

BIBLIOGRAFIA

1. Adams LA. Non alcoholic Fatty Liver Disease. Ann Epidemiol (2007)17:863–869.

2. Bellentani S. Epidemiology and natural history of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Annals of hepatology (2009) 8(1): supplement: S4-8.

3. Neuschwander-Tetri BA. Non alcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. Hepatology (2003) 37: 1202-1219.

4. Kotronen A. Liver fat in the metabolic syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2007) 92: 3490-3497.

5. Targher G., Bertolini L., Poli F., Rodella S., Scala L., Tessari R., et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. Diabetes (2005) 54: 3541-3546.

6. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F et al Prevalence of and risk factors for non alcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. Hepatology (2005) 42: 44-52.

7. Franzese A, Vajro P, Argenziano A, Puzziello A, Iannucci MP, Saviano MC, Brunetti F, Rubino A. Liver involvment in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow up in an Italian population. Dig Dis Sci (1997) 42:1428-1432.

8. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol (2010)16: 5286-5296.

9. Kleiner D.E., Brunt EM., Van Natta M., et al. Design and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease Hepatology (2005) 41:1313-1321.

10. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non alcoholic fatty liver disease. QJM (2010) 103:71-83.

11. Bugianesi et al Insulin resistance in non-diabetic patients with non alcoholic fatty liver disease:sites and mechanisms. Diabetologia (2005) 48:634-642.

12. Musso, G. et al. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. Hepatology (2005) 42, 1175–1183.

13. Begriche, K. et al. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. Mitochondrion (2006) 6:1–28.

14. Borradaile NM, Buhman KK, Listenberger LL, Magee CJ, Morimoto ET, Ory DS, and Schaffer JE A critical role for eukaryotic elongation factor 1A-1 in lipotoxic cell death. Mol Biol Cell (2006) 17:770–778.

15. Borradaile NM, Han X, Harp JD, Gale SE, Ory DS, and Schaffer JE. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. J Lipid Res (2006) 47:2726–2737.

16. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. Nat. Cell Biol. (2011) 13:184–90.

17. Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, Clark R, et al. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER Stress-mediated suppression of transcriptional master regulators Developmental Cell (2009) 15, 829–840.

18. Curzio M., Esterbauer H., Dianzani MU. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. Int. J. Tissue React. (1985) 7: 137-142.

19. Svegliati-Baroni G., Saccomanno S., Van Goor H., Jansen P., Benedetti A., Moshage H. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. Liver (2001) 21: 1-12.

20. Bugianesi E., Pagotto U., Manini R., et al. Plasma adiponectin in non-alcoholic fatty liver disease is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2005) 90: 3498-3504.

21. Hui JM., Hodge A., Farrel GC. et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? Hepatology (2004) 40: 46-54.

22. Musso G., Gambino R., Biroli G., et al. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. Am. J. Gastroenterol. (2005) 100: 2438-2446.

23. Polyzos S.A. et al. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease, Diabetes, Obesity and Metabolism (2010) 12:365-83.

24. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: the Organization 2000. Technical report series n°894.

25. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US Adults, 1999-2000. JAMA (2002) 1723-1727.

26. Saltiel AR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature (2001) 414: 799-806.

27. Gross DN. The role of FoxO in the regulation of metabolism. Oncogene (2008) 27:2320–2336.

28. Matsumoto M. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor foxo1 in liver. Cell metab (2007) 6:208-216.

29. Postic C. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. Diabetes Metab (2008) 34:643–648.

30. Valenti L. Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in non alcoholic steatohepatitis. Diabetes (2008) 57:1355-1362.

31. Bugianesi, E. et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. Diabetologia (2005) 48:634–642.

32. Sanyal, A.J. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. Gastroenterology (2001) 120:1183–1192.

33. Farese RV, Zechner R, Newgard CB, Walther TC. The Problem of Establishing Relationships between Hepatic Steatosis and Hepatic Insulin Resistance Cell Metabolism (2012) 15:570-573.

34. Reaven GM. Banting lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. Diabetes (1988) 37:1595-1607.

35. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM; Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III); National Cholesterol Education Program (NCEP). NCEP defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. Diabetes (2003) 52:1210-1214.

36. Revisan M, Liu J, Bahsas FB, Menotti A. Syndrome X and mortality: a population-based study. Risk Factor and Life Expectancy Research Group. Am J Epidemiol. (1998) 148:958-966.

37. Berg AH, Scherer PE Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. Circ. Res. (2005) 96:939-949.

38. Hotamisligil GS. Inflammation and chronic disorders. Nature (2006) 444:860-867.

39. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J. Clin. Invest. (2003) 122:1821-1830.

40. Molina JM, Ciaraldi TP, Brady D, Olefsky JM. Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects. Diabetes. (1989) 38:991-5.

41. Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormonesensitive lipase and lipolysis. Annu Rev Nutr. (2000) 20:365-93. Review

42. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Yaburagi Y, Satoh S, Sekihara H, Yoshioka S, Horikoshi H, Furuta Y, Ikawa Y, Kasuga M, Yazaki Y, Aizawa S: Insulin resistance and growth retardation in mice made with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature (1994) 372:182–186.

43. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag BL III, Johnson RS, Kahn CR: Alternative pathway of insulin signaling in mice made with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature (1994) 372:186–190.

44. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF: Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature (1998) 391:900–904.

45. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T: Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β-cell hyperplasia. Diabetes (2000) 49:1880–1889.

46. Taniguchi CM, Ueki K Kahn CR. Complementary roles of IRS1 and IRS2 in the hepatic regulation of metabolism. J. Clin. Inv. (2005) 115:718-727.

47. Leavens KF, Easton RM, Shulman GI et al. AKT2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance. Cell Metab. (2009) 10:405-418.

48. Ono H, Shimano H, Katagiri H, Yahagi N, Sakoda H, Onishi Y, et al. Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement. Diabetes (2003) 52: 2905-2913.

49. Matsumoto M, Han S, Kitamura T, Accili D. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. J Clin Invest (2006) 116: 2464-2472.

50. Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, et al. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. Nat Cell Biol (2004) 6: 351-357.

51. Zhang J, Ou J, Bashmakov Y, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin inhibits transcription of IRS-2 gene in rat liver through an insulin response element (IRE) that resembles IREs of other insulin-repressed genes. Proc Natl Acad Sci U S A (2001) 98: 3756-3761.

52. Frescas D, Valenti L, Accili D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. J Biol Chem 2005; 280: 20589-20595.

53. Ono H, Shimano H, Katagiri H, Yahagi N, Sakoda H, Onishi Y, et al. Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement. Diabetes (2003) 52: 2905-2913.

54. Fleischmann M, Iynedjian PB. Regulation of sterol regulatory element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAKT. Biochem J (2000) 349:13-17.

55. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. Proc Natl Acad Sci U S A (1999) 96: 12737-12742.

56. Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab (2002) 282: E46-51.

57. Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G, et al. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain

polyunsaturated fatty acid depletion. Biochim Biophys Acta (2009)1792: 1080-1086.

58. Kamagate A, Qu S, Perdomo G, Su D, Kim DH, Slusher S, et al. FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. J Clin Invest (2008) 118: 2347-2364.

59. Altomonte J, Cong L, Harbaran S, Richter A, Xu J, Meseck M, et al. Foxo1 mediates insulin action on apoC-III and triglyceride metabolism. J Clin Invest (2004) 114: 1493-1503.

60. Dongiovanni P, Valenti L, Rametta R, Daly AK, Nobili V, Mozzi E, et al. Genetic variants regulating Insulin Receptor signaling are associated with the severity of liver damage in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Gut (2010) 59: 267-273.

61. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes (2001) 50: 1844-1850.

62. Nakae J, Biggs WH, Kitamura T, Cavanee WK, Wright CV, Arden KC et al. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by nutated alleles of gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. Nat. Genet. (2002) 32:245-253.

63. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R et al. Prospective study of the long term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. Gastroenterology (2009) 137:532-540.

64. Kamagate A, Kim DH, Zhang T, Slusher S, Gramignoli R, Strom SC, et al. FoxO1 links hepatic insulin action to endoplasmic reticulum stress. Endocrinology (2010) 151: 3521-3535.

65. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. Mol Cell (2000) 6: 87-97.

66. Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, et al. Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. Cell Metab (2008) 8: 49-64.

67. Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest (2005) 115: 1139-1142.

68. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest (2005) 115: 1343-1351.

69. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr Biol (1997) 7: 261-269.

70. Wu X, Williams KJ, NOX4 pathway as a source of selective insulin resistance and responsiveness. Arteroscler Thromb Vasc Biol (2012)32:1236-1245.

71. Girard J, Ferre P, Foufelle F. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. Annu Rev Nutr (1997) 17: 325-352.

72. Prip-Buus C, Perdereau D, Foufelle F, Maury J, Ferre P, Girard J. Induction of fatty-acid-synthase gene expression by glucose in primary culture of rat hepatocytes. Dependency upon glucokinase activity. Eur J Biochem (1995) 230: 309-315.

73. Foufelle F, Gouhot B, Pegorier JP, Perdereau D, Girard J, Ferre P. Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. A role for glucose 6-phosphate. J Biol Chem (1992) 267: 20543-20546.

74. Towle HC, Kaytor EN, Shih HM. Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. Annu Rev Nutr (1997) 17: 405-433.

75. Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A. Glucose regulation of gene transcription. J Biol Chem (2000) 275: 31555-31558.

76. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. PLoS Genet (2011) 7: e1001324.

77. Kim SY, Kim HI, Kim TH, Im SS, Park SK, Lee IK, et al. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. J Biol Chem (2004) 279: 30823-30829.

RINGRAZIAMENTI

La presente tesi è stata svolta presso il Dipartimento di Medicina Interna della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

Ringrazio la prof.ssa Silvia Fargion per avermi dato la possibilità di svolgere la tesi presso il suo laboratorio. Ringrazio i colleghi: Luca per la supervisione, la pazienza e il sostegno che mi ha costantemente dimostrato in questo percorso ("chi ci ferma?), Paola per il supporto tecnico e morale e i consigli sempre utili, Benedetta M., Marta e Benedetta D. per esserci state sempre ed avermi sopportato.... Ragazzi, grazie di cuore!

Ringrazio il prof. Cattaneo per la disponibilità e la gentilezza dimostrata.

In modo particolare voglio ringraziare i miei genitori e i miei nonni, Chiara ed Elio che mi sono stati vicino e mi hanno aiutato a portare a termine questo progetto.