



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Aspetti morfologici, ultrastrutturali e molecolari dell'interazione tra lipofagia, lipasi acida lisosomiale e colestasi nell'epatopatia steatosica non alcolica (NAFLD).

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Scienze Anatomiche Istologiche Medico Legali e
dell'Apparato Locomotore
Corso di Dottorato in Epatogastroenterologia sperimentale e clinica

Francesco Valentini
Matricola 2099681

Tutor
Prof. Antonio Franchitto
Prof. Simone Carotti

Abstract

Introduzione generale

Panoramica sulla lipogenesi de novo e sull'immagazzinamento dei lipidi nel fegato

Rimozione dei lipidi da parte delle lipasi neutre nel fegato

Rimozione dei lipidi mediante lipofagia nel fegato

Ruolo dei lisosomi nella lipofagia

Lal: funzione fisiologica ed effetti di una ridotta attività di lal

Prove di riduzione acquisita dell'attività lal in nafld

Colestasi e NAFLD

Parte sperimentale

Studio 1: Caratteristiche molecolari ed istologiche della riduzione dell'attività della lipasi acida lisosomiale nella NAFLD.

Pazienti

Risultati

L'attività di LAL è ridotta in un modello cellulare di NAFLD

La diminuzione dell'attività di LAL è mediata dall'ubiquitinazione

La localizzazione extralisosomiale di LAL aumenta con il trattamento HGHL

La LAL ubiquitinata/disfunzionale si accumula nel fegato di topi alimentati con HFD

La LAL ubiquitinata/disfunzionale si accumula nel fegato dei pazienti con NAFLD

Discussione

Bibliografia

Studio 2: La compromissione della lipofagia è associata ad una progressione della NAFLD

Introduzione

Materiali e metodi

Pazienti

Risultati

Progressiva compromissione della lipofagia in modelli cellulari e murini di steatosi epatica

Aumento dei lipolisosomi e alterazione del catabolismo lipidico nei pazienti con NAFLD

Autofagia compromessa nei pazienti con NAFLD

Discussione

Bibliografia

Studio 3. Interazioni tra colestasi e lipofagia nei pazienti NAFLD

Introduzione

Metodi

Analisi immunoistochimica

Risultati

L'impairment autofagico correla con l'aumento dei segni morfologici di colestasi ma non con quelli sierologici di colestasi

Il profilo colestatico sierologico correla con un aumento dell'espressione dei geni delle pompe di efflusso biliare.

Il compartimento biliare intraepatico risulta sovratteso nei casi di NAFLD più severa

Discussione

Conclusioni parte generale

Materiali e metodi parte generale

Cellule e trattamenti

Modello animale, trattamento e analisi biochimiche

Attività enzimatica

Saggio di immunoprecipitazione

Western blot

Istomorfologia epatica

Analisi immunoistochimica

Contenuto lipidico e analisi in microscopia a fluorescenza.

Analisi ultrastrutturale

Analisi dell'mRNA

Statistiche

Bibliografia parte generale

Publicazioni scientifiche

Partecipazione a congressi nazionali ed internazionali con Abstract e presentazioni

Abstract

Introduzione

La malattia epatica steatosica non alcolica (NAFLD) è caratterizzata da un eccessivo accumulo di lipidi all'interno degli epatociti che conduce ad infiammazione epatica e fibrosi. La disfunzione dell'autofagia ovvero del processo mediante il quale la cellula elimina i cataboliti attraverso i lisosomi, è uno dei meccanismi fisiopatologici che portano all'accumulo di lipidi nella NAFLD. La lipofagia è il meccanismo autofagico attraverso il quale la cellula elimina le goccioline lipidiche costituite da esteri del colesterolo e trigliceridi attraverso il catabolismo lisosomiale. Nel lisosoma la lipasi acida lisosomiale è l'enzima preposto al catabolismo degli esteri del colesterolo. Un altro percorso di eliminazione di colesterolo e fosfolipidi per l'epatocita è costituito dalla loro secrezione nella bile. Dati emergenti suggeriscono che la colestasi in pazienti NAFLD rappresenti un fattore predittivo di prognosi sfavorevole, indicando un ruolo potenziale dell'alterata secrezione biliare nella patogenesi e nella progressione della malattia. Recenti studi hanno evidenziato che la lipofagia può essere disregolata dagli acidi biliari che esercitano un effetto inibitorio (CholeSTOPhagy) in corso di patologie colestatiche.

Obiettivo dello studio: In una coorte di pazienti NAFLD abbiamo voluto valutare se fosse presente un impairment lipofagico e se questo fosse correlato a segni di colestasi e/o di disfunzione lisosomiale.

Metodi: Abbiamo innanzitutto valutato il contenuto e l'attività della LAL in modelli sperimentali in vitro e in vivo di NAFLD. In totale, sono stati inclusi nello studio 87 pazienti sottoposti a biopsia epatica. Tramite metodiche di immunoistochimica si sono valutate l'espressione di LAL, LAMP1 (marcatore lisosomiale), p62/SQSTM1 (marcatore di impairment autofagico), CK7 (per la valutazione della componente colestatica: cellule epatiche progenitrici HPC ed epatociti intermedi IH), CD-10 (per la valutazione dei canalicoli biliari). E' stata eseguita un'analisi al microscopio elettronico a trasmissione per la valutazione delle componenti autofagiche e i segni epatocellulari di colestasi. In un sottogruppo di 38 pazienti tramite la metodica di Nanostring nCounter si è analizzata l'espressione genica di 20 geni coinvolti implicati nel processo autofagico (compresa l'espressione di LAL) e nella secrezione biliare di colesterolo.

Risultati Abbiamo evidenziato una riduzione dell'attività di LAL nel modello cellulare di NAFLD. La diminuzione dell'attività di LAL è mediata dall'ubiquitinazione e la proteina ubiquitinata presenta una localizzazione extralisosomiale. In vivo il contenuto epatico di LAL totale è più elevata nei fegati dei pazienti con punteggio NAS 3-5 e 6-7 rispetto a quelli con punteggio NAS 0-2. L'espressione del gene di LAL è risultata lievemente aumentata nei pazienti con NAFLD rispetto ai controlli sani. Dallo studio è emerso un blocco della machinery autofagica con un aumento dell'espressione di p62/SQSTM1 che correla significativamente con fibrosi e NAS ($p=0.01$ $R=0.322$; $p=0.01$ $R=0.157$). Nei pazienti con NAFLD sono stati evidenziati lisosomi con lume visibile e sono stati identificati alla TEM come lipolisosomi. L'accumulo anomalo di LAL ubiquitinata correla con il NAS e con il numero di lipolisosomi ($p=0.04$, $R=0.128$). La compromissione dell'autofagia è stata associata ad alterazioni legate alla colestasi nel compartimento biliare: è stato osservato un aumento della reazione dutturale e l'espansione di epatociti intermedi. Si è infatti osservato un aumento parallelo del marcatore di compromissione dell'autofagia p62/SQSTM1 e delle cellule progenitrici epatiche (HPCs) e delle degli epatociti intermedi (IH) ($R=0.392$, $p=0.016$; $R=0.370$, $p=0.026$)

All'analisi ultrastrutturale con il microscopio elettronico a trasmissione si sono evidenziate significative differenze a livello dei canalicoli biliari tra pazienti con NAFLD lieve e severa. Inoltre abbiamo osservato una riduzione dell'espressione di ABCG5/8 con l'aumentare del ballooning nei pazienti con colestasi.

Conclusioni Nei pazienti NAFLD si assiste ad un impairment della lipofagia con aumento di lisosomi repleti di lipidi non catabolizzati chiamati lipolisosomi. La riduzione dell'attività di LAL sembra possa contribuire alla disfunzione lisosomiale. Inoltre una colestasi a livello istologico ma non sierologico correla con la disfunzione autofagica e con un fenotipo di malattia più severo.

Introduzione generale

Il fegato è il centro metabolico dei lipidi circolanti. Una ritenzione di lipidi all'interno degli epatociti, per lo più sotto forma di trigliceridi, è un prerequisito per lo sviluppo della malattia epatica più comune ad oggi, ovvero la malattia del fegato grasso non alcolica (NAFLD) (Benedict M World J Hepatol 2017). Sebbene le principali anomalie metaboliche che portano all'accumulo di grasso negli epatociti siano ancora da chiarire, esse includono alterazioni nelle vie che coinvolgono l'assorbimento dei lipidi (chilomicroni remnants e acidi grassi liberi-FFA derivati dal tessuto adiposo), la sintesi (lipogenesi), la degradazione (lipolisi e lipofagia) o la secrezione di lipoproteine epatiche (ad es, lipoproteine a bassissima densità VLDL) ed eliminazione di colesterolo e lipidi attraverso il flusso biliare. Pertanto, la NAFLD non deve più essere considerata solo un problema di afflusso dovuto all'aumento del carico di acidi grassi, ma deve anche essere collegata ad un'alterazione del compartimento di deflusso che coinvolge la secrezione biliare: recenti evidenze hanno infatti dimostrato che un pattern colestatico nei pazienti con NAFLD predice una prognosi sfavorevole ed è associato a specifici modelli morfologici e di espressione genica (Pennisi, Liver Int 2022).

L'accumulo di grasso negli epatociti può portare a infiammazione, sviluppo di steatoepatite non alcolica (NASH) e infine fibrosi (Ekstedt M Curr Hepatol Rep 2017). La lesione patognomonica della steatosi comporta l'accumulo di grasso in organelli subcellulari specializzati chiamati goccioline lipidiche o lipid droplets (LD). In precedenza, il catabolismo delle LD era attribuito alle sole lipasi citosoliche, ma la lipofagia è stata recentemente descritta come un meccanismo alternativo per la mobilizzazione delle LD epatiche (Singh R Nature 2009, Zechner R, Nat Rev Mol Cell Biol 2017) e la compromissione della lipofagia è stata fortemente associata alla patogenesi della NAFLD (Sinha RA, *Hepatology* 2014; Zhang Z, *Biomed Pharmacother*, 2018). Durante la lipofagia, i lipidi neutri (triacilgliceroli –TAG- ed esteri del colesterolo) immagazzinati nei LD sono parzialmente sequestrati negli autofagosomi e trasportati nei lisosomi, dove vengono catabolizzati. La lipasi acida lisosomiale (LAL), l'unico enzima noto in grado di idrolizzare gli esteri del colesterolo e i TAG e di rimanere attivo a un pH acido nel lisosoma, svolge un ruolo speciale in questo processo. I TAG, gli FFA e il colesterolo generati da queste vie sono incorporati nelle lipoproteine e trasportati nel sangue verso gli organi bersaglio. La Figura 1 illustra le fasi più importanti del metabolismo lipidico

intraepatico.

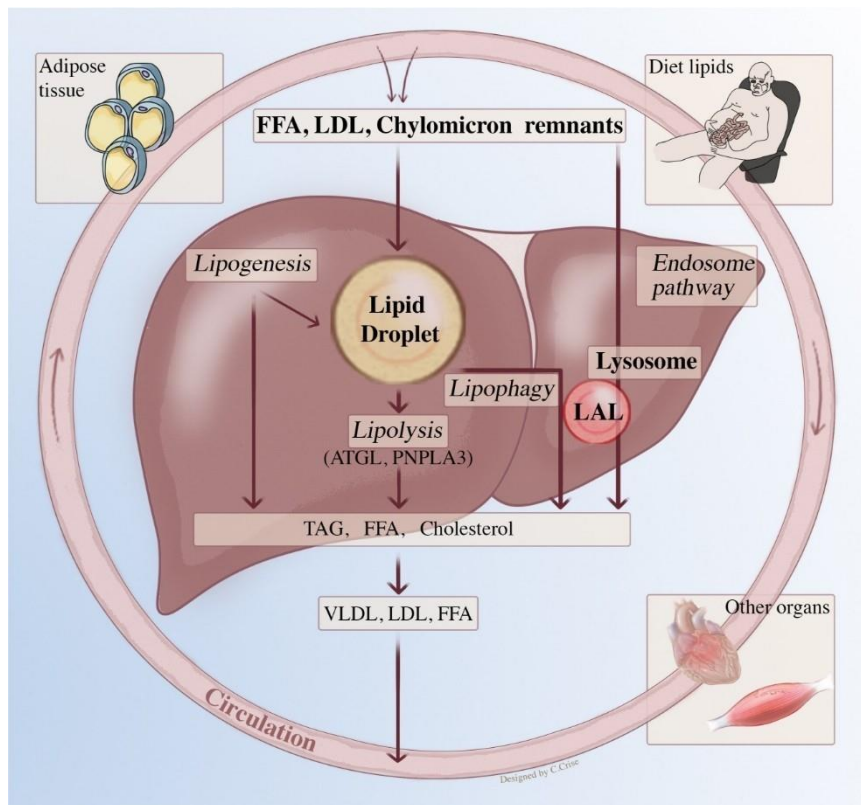


Figura 1. Ruolo del fegato nel metabolismo lipidico. L'immagazzinamento e lo smaltimento dei grassi negli epatociti comprendono l'assorbimento dei lipidi [resti di chilomicroni alimentari o acidi grassi liberi (FFA) derivati dal tessuto adiposo], la sintesi (lipogenesi), la degradazione (lipolisi e lipofagia) o la secrezione di lipoproteine epatiche [ad esempio, lipoproteine a bassissima densità (VLDL)]. ATGL, adipose triglyceride lipase; LAL, lysosomal acid lipase; LDL, low-density lipoprotein; PNPLA, patatin-like phospholipase domain-containing protein; TAG, triacylglycerol.

Nei seguenti paragrafi verranno riassunte la struttura e la fisiologia dei LD, nonché il loro catabolismo attraverso la lipolisi e la lipofagia. Inoltre, in ogni fase del metabolismo lipidico epatico, verranno descritte le potenziali alterazioni che contribuiscono allo sviluppo e/o alla progressione della NAFLD, con particolare attenzione alla lipofagia e alle recenti evidenze che dimostrano una riduzione acquisita dell'attività della LAL nei pazienti con NAFLD, che dovrebbe essere distinta dalla forma geneticamente determinata di deficit di LAL (LAL-D). Infine tratteremo il ruolo della colestasi nella NAFLD.

Panoramica sulla lipogenesi de novo e sull'immagazzinamento dei lipidi nel fegato

La lipogenesi de novo contribuisce a circa il 10-35% del pool totale di TAG nel fegato; tuttavia, questa percentuale è notevolmente aumentata nei pazienti con

steatosi epatica (Donnelly KL, J Clin Invest 2005). Tra gli enzimi biosintetici dei lipidi, la sintasi degli acidi grassi (FAS) è stata fortemente implicata nella patogenesi della NAFLD, per la sua capacità di aumentare la produzione intraepatica di TAG (Hodson L, Nat Rev Endocrinol 2019). In presenza di nicotinammideadeninucleotidofosfato (NADPH), la FAS sintetizza il palmitato dall'acetil-CoA e dal malonil-CoA e il palmitato può essere successivamente desaturato o allungato (Jensen-Urstad APL, Biochim Biophys Acta 2012). A livello molecolare, il FAS è indotto trascrizionalmente dalla proteina di risposta ai carboidrati (ChREBP) e dal fattore di trascrizione sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c. Va notato che SREBP-1c controlla direttamente la sintesi del colesterolo nel fegato, indirizzando la 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reduttasi. Infatti, sia SREBP-1c che ChREBP sono alterati in condizioni di insulino-resistenza; l'iperinsulinemia aumenta l'attività di SREBP-1c, mentre l'iperglicemia porta alla lipogenesi attraverso l'attivazione di ChREBP, che promuove la sintesi de novo di acidi grassi (Choi SH Trends Endocrinol Metab 2011; Hodson L, Nat Rev Endocrinol 2019). In modo notevole, in modelli murini di insulino-resistenza, l'abbattimento di *ChREBP* o *SREBP-1c* limita l'accumulo epatico di lipidi e lo sviluppo della NAFLD (Jensen-Urstad APL, Biochim Biophys Acta 2012; Horton JD, J Clin Invest 2002).

Gli acidi grassi sintetizzati si coniugano con il glicerolo-3-fosfato per produrre TAG attraverso le molecole intermedie di monoacilglicerolo e diacilglicerolo. Il glicerolo-3-fosfato deriva non solo dalla gliceroneogenesi, ma anche dal glicerolo ematico, mediato dall'attività della glicerocinasi, ed entrambe le vie sono indotte dall'insulina (42). Gli epatociti utilizzano principalmente il glicerolo derivato dalla gliceroneogenesi (>54%), mentre il glicerolo rimanente deriva dal glicerolo plasmatico (30%) o dal glucosio plasmatico attraverso la glicolisi (12%) (42). L'enzima che catalizza la sintesi dei TAG è la diacilglicerolo aciltransferasi (DGAT), che esiste in due isoforme, DGAT1 e DGAT2. La DGAT1 è espressa in modo ubiquitario, mentre la DGAT2 è espressa principalmente negli epatociti e negli adipociti. La compromissione di DGAT2 porta all'accumulo di diacilglicerolo nel fegato e rende gli epatociti più suscettibili all'infiammazione. Ciò indica un possibile contributo del diacilglicerolo allo sviluppo della NAFLD e alla progressione dalla semplice steatosi alla NASH.

Infine, i TAG epatici possono essere incorporati nelle VLDL per essere secreta nella circolazione sistemica o immagazzinata nelle LD. Sebbene la secrezione di VLDL non sia alterata nei modelli murini di NAFLD (9), nei pazienti con NAFLD è stata

descritta una secrezione di VLDL deregolata. Un tasso più elevato di secrezione di VLDL-triacilglicerolo è osservata in pazienti con NAFLD rispetto ad individui sani. Tuttavia, l'aumento osservato sembra raggiungere un plateau nei pazienti con un contenuto di trigliceridi intraepatici $\geq 10\%$, indicando così che questo meccanismo potrebbe essere insufficiente a compensare il sovraccarico lipidico epatico (Fabbrini E, *Gastroenterology* 2008).

Le LD sono organelli subcellulari caratterizzati da un nucleo di lipidi neutri circondato da un monostrato di fosfolipidi: essi sono buchi neri in cui gli acidi grassi e il colesterolo libero vengono trasformati in lipidi neutri, evitando così l'ossidazione nel citoplasma e il conseguente danno cellulare. Pertanto, le LD rappresentano uno dei meccanismi primari di accumulo di nutrienti per la sopravvivenza in assenza di substrati esogeni (Olzmann JA, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019). La biogenesi e la regolazione delle LD sono regolate dalle leggi della biofisica, ma sono sottoposte a una precisa regolazione da parte di meccanismi intracellulari mediati da numerosi enzimi e proteine, che rendono le LD organelli metabolicamente attivi piuttosto che semplici compartimenti di substrati energetici lipidici neutri (8, 77). La formazione di LD inizia con l'accumulo di lipidi neutri all'interno della membrana bilayer del reticolo endoplasmatico (ER), formando i lipidi della lente, che cresce e infine germoglia dall'ER (71). La gemmazione dei LD dalla membrana ER richiede il coinvolgimento di particolari fosfolipidi con specifiche caratteristiche geometriche. In sostanza, i lisofosfolipidi favoriscono la gemmazione, mentre i diacilgliceroli neutri, con la loro forma conica, la ostacolano (10). I fosfolipidi sono più comunemente localizzati nello strato esterno della membrana ER, dove promuovono la germinazione delle LD verso il citosol. Un altro importante promotore della biogenesi delle LD è la seipina, una proteina integrale oligomerica che regola l'interazione tra l'ER e le LD nascenti. L'assenza di seipina ritarda la formazione delle LD (52). Esperimenti condotti in cellule umane A431 con ablazione della seipina hanno dimostrato che la seipina favorisce la formazione di contatti strutturalmente uniformi tra l'ER e le LD e facilita il passaggio dei TAG dall'ER alle LD, contrastando così il restringimento delle piccole LD indotto dalla maturazione (72).

Dopo la gemmazione, le LD possono crescere attraverso la sintesi de novo di lipidi sulla loro superficie e attraverso lo scambio di lipidi con altre LD. Nelle cellule di mammifero, le LD possono fondersi in goccioline più grandi e questo meccanismo è mediato da proteine della famiglia degli effettori DFF45, che inducono la morte cellulare e permettono il passaggio dei TAG dalle LD più piccole a quelle più grandi

(32). Tuttavia, i LD interagiscono anche con altri organelli subcellulari, come mitocondri, perossisomi, Golgi e lisosomi (91). Durante la fame, gli acidi grassi rilasciati dalle LD sono utilizzati dai mitocondri e dai perossisomi per produrre energia attraverso la β -ossidazione e il ciclo dell'acido citrico (11, 48, 49, 64). Infatti, l'interazione delle LD con i mitocondri è utile per l'avvio della β -ossidazione e per la normale crescita delle LD. Infatti, gli enzimi presenti sulla membrana mitocondriale, come la fosfatidiletanolamina N- metiltransferasi, che converte la fosfatidiletanolamina in fosfatidilcolina per metilazione, e il DGAT2, che media l'acilazione del diacilglicerolo in TAG, sono entrambi fondamentali per la crescita delle LD (8). Inoltre, le LD interagiscono comunemente con altre LD (56). A seconda delle loro dimensioni, le LD consentono anche due vie cataboliche per i lipidi. Nelle LD di grandi dimensioni, il catabolismo dei lipidi è mediato principalmente dalle lipasi neutre citoplasmatiche, mentre nelle LD più piccole avviene attraverso la lipofagia, in cui la LAL svolge un ruolo enzimatico centrale (75).

Rimozione dei lipidi da parte delle lipasi neutre nel fegato

Le lipasi citoplasmatiche funzionano in un intervallo di pH citosolico normale e comprendono la lipasi dei trigliceridi adiposi (ATGL), chiamata anche patatina-like phospholipase domain-containing protein (PNPLA)-2 codificata da *PNPLA2*, la lipasi ormone-sensibile (HSL) e la mono- acilglicerolo lipasi (MAGL). L'ATGL degrada i TAG in acidi grassi e diacilgliceroli, mentre HSL e MAGL convertono ulteriormente il diacilglicerolo in acidi grassi e glicerolo. Le LD sono anche circondate da diverse proteine perilipiniche (PLIN) che regolano strettamente il processo lipolitico sulla membrana delle LD. In particolare, tutti questi enzimi sono espressi a livelli inferiori nel fegato rispetto al tessuto adiposo. In condizioni basali o dopo l'alimentazione, l'ATGL rimane nel citoplasma, con un accesso limitato alle LD. Inoltre, l'attività dell'ATGL è inibita dalla sua interazione con PLIN5 nelle cellule ossidative, come gli epatociti (33, 101). L'attività dell'ATGL può essere potenziata dal suo coattivatore essenziale Identificazione genica comparativa-58 (CGI-58) (47), che viene sequestrato da PLIN5 (100, 106), inibendo ulteriormente l'attività dell'ATGL lipasi. In condizioni di digiuno, l'attivazione della protein chinasi A porta alla fosforilazione di ATGL, CGI-58, HSL e PLIN; questa cascata di fosforilazione porta al rilascio di CGI-58, che interagisce con ATGL e lo attiva (84). Tuttavia, il ruolo di HSL e MAGL nel catabolismo dei TAG negli epatociti rimane poco conosciuto.

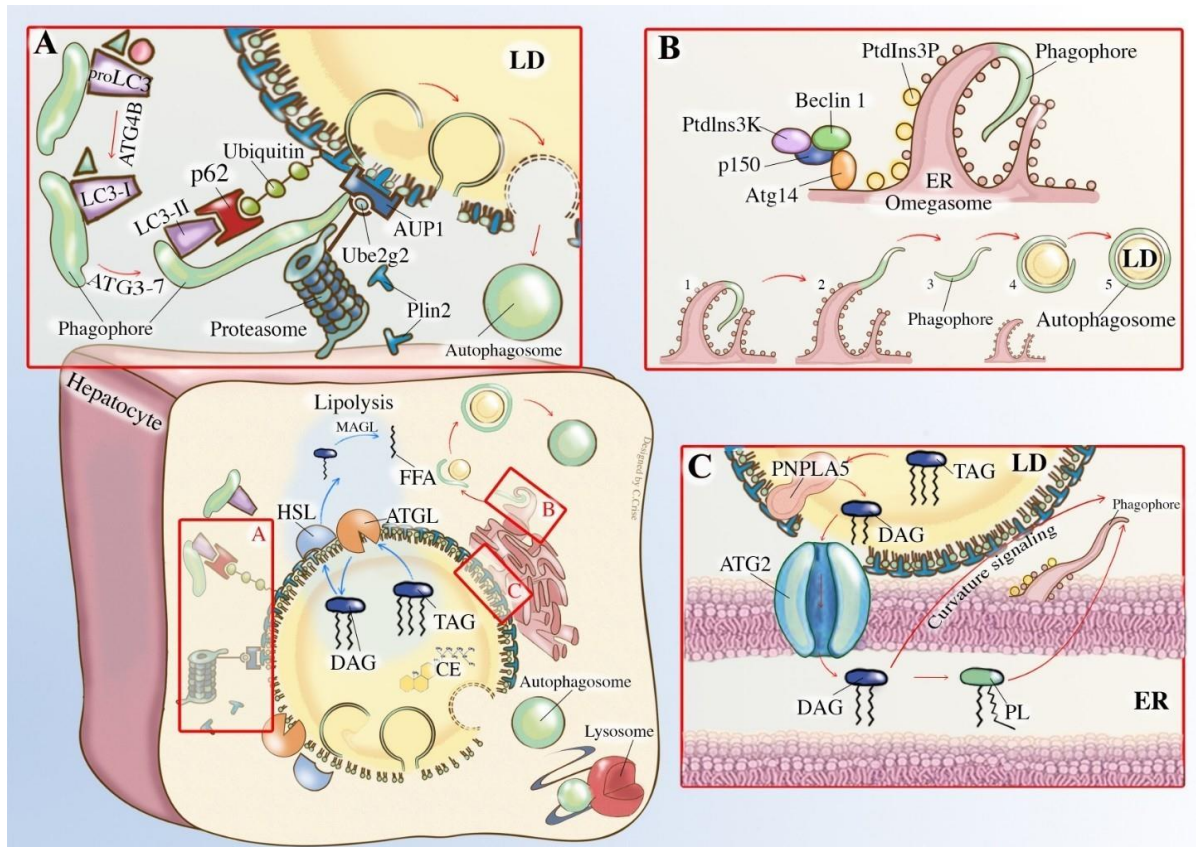


Fig. 2. Vie intraepatiche del metabolismo dei grassi: la lipofagia è il processo principale del catabolismo delle gocce lipidiche (LD). Le LD sono organelli subcellulari complessi che immagazzinano lipidi neutri [triacilgliceroli (TAG) ed esteri del colesterolo (CE)]. Il catabolismo dei LD avviene attraverso 2 vie distinte: la lipolisi e la lipofagia. La lipolisi utilizza le lipasi citosoliche, come la lipasi dei trigliceridi adiposi (ATGL), la lipasi ormonosensibile (HSL) e la lipasi del monoacilglicerolo (MAGL), che agiscono in sequenza sulla superficie dei LD per trasformare i TAG in acidi grassi liberi (FFA). Le lipasi citosoliche si legano alle perilipine (PLIN), proteine che ricoprono l'esterno delle LD e svolgono un ruolo fondamentale nella biogenesi delle LD e nella regolazione delle lipasi. Questa via catabolica si verifica principalmente nelle LD di grandi dimensioni. Al contrario, la lipofagia svolge un ruolo nella degradazione dei piccoli LD che vengono inclusi all'interno di una membrana chiamata fagoforo per generare l'autofagosoma, che si fonde con il lisosoma e il LD viene degradato dalla lipasi acida lisosomiale (LAL). Nell'autofagia delle LD sono coinvolti diversi meccanismi. *A*: nella microautofagia o autofagia frammentaria, il fagoforo, formato dall'omegasoma (*B*), si chiude sulla membrana del LD per sequestrarne il contenuto. La parte di LD che rappresenta il futuro carico autofagico viene marcata attraverso diversi meccanismi. PLIN2 si lega alle ubiquitine e a p62, che a sua volta lega LC3 sul fagoforo, avvicinandolo all'LD. Successivamente, il fagoforo ingloba i lipidi dal LD, trasportandoli al lisosoma per l'eliminazione. *B*: biogenesi della membrana del fagoforo dalla cisterna del reticolo endoplasmatico (ER). Il processo inizia con la formazione dell'omegasoma in un sito della membrana ER con livelli più elevati di fosfatidilinositolo 3-fosfato (PtdIns3P). Il PtdIns3P favorisce il rigonfiamento della membrana lipidica per formare il fagoforo, interagendo con il complesso della fosfatidilinositolo 3- chinasi (PtdIns3K) (Beclin1, p150 e ATG14). Dopo l'allungamento, la membrana del fagoforo si stacca dall'ER. Nella

macroautofagia, il fagoforo incorpora piccoli LD per formare l'autofagosoma. C: in alternativa, il contenuto lipidico del LD fuoriesce nell'ER attraverso un contatto diretto tra l'ER e il LD.

La PNPLA3 (Romeo S, Nat Genet 2008), nota anche come adiponutrina, è una delle lipasi citosoliche più studiate per il suo coinvolgimento nella patogenesi della NAFLD. Insieme al suo paralogo, ATGL, il PNPLA3 fa parte di un gruppo di enzimi che metabolizzano i lipidi che comprende nove PNPLA (PNPLA1-PNPLA9). Sebbene la struttura 3D di PNPLA3 non sia stata completamente chiarita, si propone che PNPLA3 contenga domini che attraversano la membrana e che favoriscono un'azione di tipo tight-junction con le membrane dell'ER e delle LD. La PNPLA3 presenta un'attività lipasica verso i TAG e gli esteri di retinile e un'attività aciltrasferasica verso i fosfolipidi. Nel fegato, la PNPLA3 è espressa principalmente negli epatociti e nelle cellule stellate epatiche, dove agisce come modulatore della dinamica e del turnover dei LD, anche se i meccanismi sottostanti devono ancora essere completamente descritti (61). Inoltre, l'espressione della PNPLA3 epatica è regolata dall'assunzione di cibo ed è ridotta dal digiuno, nonché indotta dall'alimentazione con carboidrati in un uomo insulino-dipendente. In particolare, il promotore di *PNPLA3* mostra due siti di consenso specifici per ChREBP e SREBP-1c che sono regolati da glucosio, insulina e acidi grassi (14).

Diversi studi condotti a partire dal 2008 hanno riportato che una comune variante missense di PNPLA3 (rs738409 C>G) è fortemente associata allo sviluppo e alla progressione della NAFLD (69, 70, 96). Il meccanismo con cui questo polimorfismo determina la steatosi rimane discutibile. Tuttavia, negli adipociti bruni, Wang et al. (103) hanno recentemente dimostrato che, rispetto alla variante non patologica, la variante di PNPLA3 legata alla NAFLD compete più efficacemente con la principale TAG lipasi intracellulare ATGL per il legame con il coattivatore CGI-58, sequestrando così CGI-58 e impedendo l'attivazione di ATGL. Questa scoperta solleva la possibilità che l'interazione PNPLA3/CGI-58 possa essere mirata a limitare l'eccessivo accumulo di TAG nella NAFLD.

Rimozione dei lipidi mediante lipofagia nel fegato

Singh et al. (Singh et al, Nature 2009) hanno introdotto il concetto di lipofagia, ovvero un processo autofagico specifico in cui le LD interagiscono con i lisosomi per degradare i lipidi. La lipofagia è generalmente attivata dalla restrizione dei nutrienti ed è definita dalla degradazione precisamente controllata delle LD da parte delle lipasi lisosomiali, che rappresentano un tipo specifico di autofagia. La lipofagia è

strettamente correlata alla lipolisi citosolica e i due processi sono modulati reciprocamente. *PNPLA2* contiene un motivo di interazione con la catena leggera 3 della tubulina (LC3); la delezione di questo motivo, la regione di interazione con LC3, porta a un'alterazione della lipolisi (53). Al contrario, la sovraespressione di *PNPLA2/ATGL* porta a un aumento della lipofagia attraverso un meccanismo dipendente dalla sirtuina 1 (73). Nel complesso, questi risultati indicano la *PNPLA2/ATGL* come la lipasi citosolica preponderante nel fegato e un importante mediatore a monte della lipofagia (73, 75).

Singh et al. Hanno inoltre dimostrato che il silenziamento di uno dei numerosi geni coinvolti nell'autofagia, come l'autophagy-related gene 5 (*ATG5*), determina un aumento dei TAG e porta a un'alterazione della β -ossidazione negli epatociti. Attualmente, si presume che l'autofagia sia compromessa nella NAFLD e che questa compromissione contribuisca all'accumulo di lipidi intraepatocitario (Kwanten WJ, *World J Gastroenterol* 2014).

La lipofagia comprende le seguenti fasi: 1) regolazione dell'up stream metabolico da parte degli induttori della lipofagia; 2) sequestro proteico del carico (una porzione o l'intera LD) all'interno del fagoforo, una vescicola citosolica a doppia membrana, e conseguente formazione dell'autofagosoma attraverso diversi meccanismi, come l'autofagia mediata da chaperoni (CMA), la microautofagia e la macroautofagia (65); 3) il tracciamento e il trasferimento dell'autofagosoma al lisosoma e la loro fusione; 4) la degradazione del carico da parte delle lipasi lisosomiali. Gli studi emergenti mostrano che per lo sviluppo della NAFLD le alterazioni possono coinvolgere una o più fasi di questo complesso processo. Altre vie alterate coinvolgono proteine che promuovono la formazione di autofagosomi (es, la serina/treonina chinasi mammalian target of rapamycin (mTOR), *ATG3-ATG7*, *ATG14* e *Beclin1*), proteine regolatrici e di trasporto (Rab GTPasi), proteine che permettono la fusione tra autofagosoma e lisosoma (lysosomal-associated membrane protein (LAMP) 1, LAMP2 e Rubicon), o altri meccanismi legati alla funzione lisosomiale (acidificazione e lipasi) (34, 45, 74, 86, 110).

Uno dei più importanti regolatori dell'autofagia è mTOR. La sua attivazione, regolata da nutrienti e ormoni, sopprime l'autofagia, portando all'accumulo di lipidi e alla steatosi epatica (45). Nei pazienti con NAFLD, l'insulino-resistenza determina l'attivazione di mTOR, con conseguente compromissione della lipofagia (110). Il passo preliminare dell'autofagia è la formazione del fagoforo, una doppia membrana fosfolipidica che si stacca dall'ER. Come mostrato nella Fig. 2B, la formazione del

fagoforo inizia in un sito specifico della membrana ER, dove la concentrazione di fosfatidilinositolo 3-fosfato (PtdIns3P) è più elevata. In condizioni di restrizione nutrizionale, viene attivato il complesso fosfatidilinositolo 3-kinasi (PtdIns3K), che comprende Beclin1, Vps34, p150 e la subunità ATG14, specifica per l'autofagia, che innesca la produzione di membrane autofagosomiali (13). Studi sull'inibizione del complesso PtdIns3K da parte della wortmannina hanno dimostrato il suo ruolo chiave nell'autofagia (63).

In questo complesso, ATG14 regola la produzione di PtdIns3P (88), che viene indotta ectopicamente in compartimenti cellulari, come l'ER. La localizzazione osservata di ATG14 nell'ER fornisce la prova che l'ER può essere il sito primario della formazione di fagofori e omegasomi. Si propone che l'omegasoma funga da piattaforma per la formazione dei fagofori, poiché il complesso ATG5 e LC3 sono reclutati in questa struttura dopo la restrizione dei nutrienti e le membrane ATG5- e LC3-positive sembrano emergere dall'omegasoma. L'omegasoma, attraverso la formazione del fagoforo, porta alla formazione di autofagosomi come risultato della coniugazione della proteina associata ai microtubuli 3 (pro-LC3-I), elaborata proteoliticamente, con la fosfatidiletanolamina da parte delle ligasi ATG7 e ATG3, portando alla formazione di LC3-II. L'incorporazione di LC3-II nel biogenere dell'autofagosoma e il reclutamento di proteine adattatrici del carico, come p62/sequestosoma 1 (SQSTM1), portano alla chiusura del carico nell'autofagosoma maturo (108). La PtdIns3P altera la membrana lipidica e ne promuove il ripiegamento attraverso l'interazione con Beclin1 e altre proteine coinvolte (34), come ATG3-ATG7. Singh et al (81) hanno dimostrato che, in presenza di una coltura di un stimolo lipidico esogeno o endogeno, gli epatociti di ratto RALA255-10G trattati con siRNA per inibire farmacologicamente *Atg5* accumulano TAG all'interno delle LD e che l'accumulo di TAG è causato da un'alterata lipofagia piuttosto che da un aumento della sintesi di TAG. Questi risultati sono stati confermati in vivo utilizzando topi *Atg7* knockdown con deficit di autofagia che sviluppano epatomegalia con un aumento dei TAG e del contenuto di colesterolo negli epatociti rispetto ai topi wild-type (81). Infine, dopo l'elongazione della membrana del fagoforo, questo si stacca dall'ER (107).

L'ancoraggio del fagoforo alle LD è un processo mediato da chaperoni. Nell'autofagia, il reclutamento dei chaperoni rappresenta solitamente una parte della CMA, un tipo di autofagia. Al contrario, nella lipofagia, l'attivazione del macchinario chaperone induce il contatto fagoforo-LD in preparazione dei successivi eventi

lipofagici. La CMA porta alla degradazione selettiva di singole proteine solubili con una specifica sequenza aminoacidica riconosciuta da una proteina simile alla heat shock protein 70 (HSC70). Le LD sono coperte da proteine PLIN, che contengono il motivo di legame per HSC70, e da pentapeptidi, come la serina/treonina-chinasi 25 simile a STE20, che è stata recentemente identificata come un regolatore critico dell'omeostasi energetica e della progressione della NAFLD (5). Quando la CMA è compromessa, le proteine PLIN si accumulano e la mobilizzazione degli acidi grassi attraverso la lipolisi e la lipofagia è ridotta, come si osserva nella NAFLD (74). Inoltre, mutazioni nel motivo CMA di *PLIN2* determinano l'accumulo di LD più grandi, che non sembrano interagire con i lisosomi (44). La proteina ubiquitaria antica 1 è una proteina LD altamente espressa che può reclutare la coniugasi di ubiquitina E2 G2 (Ube2g2) attraverso il suo dominio COOH-terminale conservato G2BR; Ube2g2 può ubiquitinare le proteine situate sulla superficie delle LD (1, 83). Le proteine PLIN sono degradate dal proteasoma nella CMA e si crea una via d'ingresso per il fagoforo. Kaushik et al. (43) hanno dimostrato che la degradazione tramite CMA corrisponde alla siti di *PLIN2* e *PLIN3*. Pertanto, la CMA si verifica in preparazione alla microautofagia (Fig. 2A).

Nella microautofagia o autofagia frammentaria, il fagoforo si chiude sulla membrana del LD per sequestrarne il contenuto. La parte della LD che rappresenta il futuro carico autofagico viene marcata attraverso diversi meccanismi. *PLIN2* si lega alle ubiquitine e a p62, che a sua volta lega LC3 sulla superficie del fagoforo, avvicinandoli alle LD. Successivamente, il fagoforo ingloba i lipidi dal LD, trasportandoli ai lisosomi per l'eliminazione (43, 74) (Fig. 2A).

A differenza della microautofagia, nella macroautofagia l'intero LD è avvolto dal fagoforo. Studi recenti hanno dimostrato che le LD coinvolte nella macroautofagia sono di dimensioni inferiori rispetto a quelle coinvolte nella microautofagia (75).

La migrazione dell'autofagosoma verso il lisosoma è un processo finemente regolato da diversi complessi proteici, come quelli della famiglia Rab (35). Ad esempio, Rab7 si trova sugli autofagosomi ed è coinvolta nel traffico di queste vescicole e nella formazione dei lisosomi (15). Durante il digiuno, Rab7 si accumula nelle LD e media la fusione delle LD con il lisosoma. Quando Rab7 viene silenziato mediante siRNA, si verifica un blocco della lipofagia con inattivazione della degradazione delle LD (76). Oltre a Rab7, altre Rab GTPasi sono state implicate nella lipofagia, come Rab10, coinvolta nel reclutamento degli adattatori necessari per l'inglobamento delle LD da parte dell'autofagosoma in crescita (51), e forse

Rab32, come dimostrato da esperimenti condotti in *Drosophila*, dove l'ablazione di Rab32 determina il blocco dell'autofagia in concomitanza con un alterato immagazzinamento dei lipidi (99).

L'ultima fase cruciale regolata nella lipofagia è la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma, che è alterata in diversi modelli steatogeni. L'assunzione di acidi grassi saturi provoca una rigidità della membrana ER mediata dalla lipotossicità e l'innalzamento dei livelli di calcio citosolico, con conseguente inibizione della fusione autofagosoma-lisosoma e arresto dell'autofagia, che può essere parzialmente annullato dai calcio-antagonisti (58). Inoltre, p62/SQSTM1 si trova sulla membrana dell'autofagosoma e interagisce con LAMP2A e altre proteine, consentendo il riconoscimento dell'autofagosoma e la fusione con il lisosoma. I topi privi di LAMP2A sviluppano steatosi epatica con accumulo di LD, riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi e aumento dei livelli di TAG totali (74). Uno studio recente ha dimostrato che il sovraccarico di lipidi nelle cellule di epatoma HepG2 è accompagnato dalla fosforilazione di p62/SQSTM1 attraverso la chinasi 1 che lega TANK. La fosforilazione di p62/SQSTM1 è associata a un'alterata autofagia e alla formazione di corpi di Mallory-Denk associati alla NASH (19). Il difetto della clearance lisosomiale degli autofagosomi determina l'accumulo citoplasmatico di p62/SQSTM1 in modelli murini di NAFLD e in pazienti con NAFLD (102). Inoltre, è stata riportata una correlazione diretta tra p62/SQSTM1 e i punteggi dell'attività della NAFLD e/o delle transaminasi (30). Il Rubicon inibisce la fusione autofagosoma-lisosoma regolando in modo significativo Rab7, che è coinvolto nel complesso delle proteine di fusione. In un modello di steatosi, la coltura di cellule HepG2 con supplemento di acidi grassi saturi, come l'acido palmitico, determina un aumento dell'espressione di Rubicon (86). Inoltre, le LD possono partecipare attivamente alla biogenesi degli autofagosomi dall'ER (25, 92, 93). In questo processo, PNPLA5, una lipasi localizzata sulla superficie delle LD, fornisce i mattoni per la formazione delle membrane degli autofagosomi a partire dall'ER (25). ATG2 risiede sia sulle LD che sulle membrane dell'ER ed è necessario per il trasferimento dei lipidi dalle LD all'ER (92, 93) per la formazione degli autofagosomi (Fig.2C). A livello dell'ER, i diacilgliceroli vengono trasformati in fosfolipidi che servono a formare le membrane dell'omegasoma nascente. Inoltre, i diacilgliceroli permettono la corretta curva dell'omegasoma (2).

Le principali vie di degradazione delle LD, ovvero la lipolisi citosolica e la lipofagia, sono illustrate nella Fig. 2.

Ruolo dei lisosomi nella lipofagia

Le normali funzioni dei lisosomi, il loro ambiente acido e le lipasi funzionali al loro interno sono necessarie per l'integrità della lipofagia. I lisosomi sono uno dei molti regolatori metabolici della cellula, che intrattengono diverse reti con il nucleo, la membrana cellulare e altri organelli, come i LD e i mitocondri (79). Il complesso di proteine lisosomiali sensibili al nutrimento, recentemente identificato, comprende la pompa protonica V-ATPasi, la pompa LysNa e mTOR; mTOR si lega alla membrana lisosomiale durante il normale apporto calorico e fosforila il fattore di trascrizione EB (TFEB), che regola i geni coinvolti nell'autofagia, nonché quelli che codificano per i componenti lisosomiali e per il recettore associato al proliferatore del perossisoma (PPAR)- α e - γ (79). Una volta fosforilato, TFEB non può più raggiungere il nucleo per esercitare funzioni di regolazione trascrizionale. Durante il digiuno, TFEB è libero di spostarsi nel nucleo e, quindi, il numero di lisosomi, la funzionalità dell'autofagia e l'ossidazione mitocondriale possono aumentare (79). Il contenuto lisosomiale può anche regolare il legame di mTOR alla membrana lisosomiale. La pompa LysNa regola il potenziale di membrana lisosomiale in base alla presenza di substrati nel lume lisosomiale. Inizialmente, l'aumento dell'assunzione di acidi grassi stimola la lipofagia e il catabolismo attuato dai lisosomi; tuttavia, a lungo andare, un carico eccessivo di lipidi sopprime l'autofagia, probabilmente a causa di cambiamenti nella membrana lisosomiale in condizioni di eccesso di lipidi all'interno di questi organi (67, 68). Il flusso autofagico, l'acidità lisosomiale e la funzionalità degli enzimi lisosomiali sono stati studiati in topi ob/ob (39). In questo modello, nonostante la presenza di una normale fusione tra gli autofagosomi e i lisosomi, l'attività lisosomiale è diminuita, i livelli di espressione delle catepsine B e L sono stati ridotti e l'acidità lisosomiale compromessa è stata accompagnata da enzimi lisosomiali difettosi (39). In uno studio che ha esaminato i livelli di espressione delle catepsine D, B e L nei tessuti epatici di pazienti con NAFLD, epatite B, epatite C e cirrosi biliare primaria, è stata osservata una diminuzione significativa dei livelli di catepsine nei pazienti con NAFLD rispetto a quelli dei pazienti con altre patologie epatiche(30).

L'acidificazione degli autolisosomi è decisiva per l'attivazione delle lipasi e influisce sulla degradazione dei substrati. Inoltre, è stato recentemente riportato che un'acidificazione lisosomiale difettosa compromette l'autofagia nella NAFLD (102).

Lal: funzione fisiologica ed effetti di una ridotta attività di lal

LAL è un enzima lisosomiale che catalizza l'idrolisi degli esteri del colesterolo e dei TAG che sono stati internalizzati attraverso l'endocitosi mediata da recettori delle particelle di lipoproteine a bassa densità (LDL). I prodotti dell'idrolisi della LAL vengono esportati attivamente dalla proteina Niemann- Pick di tipo C, nel caso del colesterolo libero, oppure diffondono nel citosol come FFA. Il colesterolo libero e gli FFA presenti nel citosol downregolano l'espressione di

SREBP e riducono la trascrizione delle proteine coinvolte nella biosintesi e nell'assorbimento del colesterolo e degli acidi grassi. La LAL, presente praticamente in tutti i tipi di cellule, è codificata dalla *LIPA* sul cromosoma 10. Strutturalmente, LAL ha un dominio core e un dominio cap. Dopo la sua sintesi, LAL subisce una scissione del peptide segnale e della glicosilazione *N-linked* nell'ER, seguita dal trasporto all'apparato di Golgi per l'aggiunta di mannosio 6-fosfato, importante per il targeting lisosomiale dell'idrolasi. Infine, la proteina viene trasportata al lisosoma (50).

L'attività conservata della LAL è necessaria per lo smaltimento dei lipidi neutri dopo l'internalizzazione mediata dai recettori delle lipoproteine o dopo la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma durante la lipofagia. La LAL-D è una malattia autosomica recessiva multiorgano causata da mutazioni nella *LIPA* (57). Ad oggi, sono state descritte più di 59 mutazioni associate alla LAL-D; tuttavia, la variante patogena più frequente della *LIPA* è una mutazione di splicing, c.894G>A, con una frequenza allelica che varia da 0,0005 nelle popolazioni asiatiche a 0,0017 nelle popolazioni caucasiche e ispaniche, riflettendo frequenze di portatori di 1 su 1.000 e ~1 su 300, rispettivamente (78). Poiché la LAL è coinvolta nella degradazione degli esteri lisosomiali del colesterolo e dei TAG, in caso di LAL mutata si verifica un accumulo di lipidi nel fegato, nella milza, nelle ghiandole surrenali, nel midollo osseo, nei linfonodi, nei macrofagi di tutto l'organismo e, in particolare, nei villi intestinali. È noto che la LAL-D si presenta in due fenotipi patologici, la malattia di Wolman e la sindrome da accumulo di colesterolo (CESD), la cui insorgenza e gravità dipendono dalla quantità di attività residua della LAL, che a sua volta è determinata dal tipo di mutazioni e dal loro effetto sulla funzione della proteina (21, 97). Dal punto di vista clinico, come ampiamente rivisto altrove (18, 60, 66, 85), la malattia di Wolman è una malattia rapidamente progressiva con una mortalità quasi universale entro i primi 6 mesi di vita, mentre la CESD è spesso diagnosticata più tardi nella vita o addirittura

confusa e sottovalutata a causa della presentazione clinica aspecifica che assomiglia a quella della sindrome metabolica. In particolare, l'interessamento epatico, universale nella LAL-D, si presenta come una grave steatosi microvescicolare che progredisce fino alla cirrosi e all'insufficienza epatica (3), perché l'accumulo di lipidi lisosomiali agisce come un fattore infiammatorio scatenante che induce la fibrogenesi e la cirrosi nel tempo attraverso unidenti meccanismi di sicurezza (98).

Gli approcci terapeutici per la LAL-D sono cambiati completamente alla fine del 2015, quando la sebelipasi alfa, una proteina LAL umana ricombinante, è stata utilizzata in una terapia enzimatica sostitutiva con ottimi risultati (16). Nello studio ARISE, la sebelipasi alfa ha determinato un grande miglioramento della funzionalità epatica. Inoltre, in 12 pazienti su 20 è stata osservata una regressione della fibrosi di più di uno stadio, mentre in 6 pazienti non si è verificata alcuna variazione della gravità della fibrosi e solo in 2 pazienti si è verificato un peggioramento (17). Più recentemente, Jones et al. (41) hanno dimostrato l'efficacia della sebelipasi alfa specificamente nei neonati con malattia di Wolman, che hanno mostrato una sopravvivenza nettamente migliore e miglioramenti clinicamente significativi nella crescita e in altre manifestazioni chiave della malattia.

Prove di riduzione acquisita dell'attività lal in nafld

Sebbene la malattia di Wolman e la CESD siano entrambe malattie genetiche, studi recenti hanno riportato che, rispetto agli individui sani, i pazienti con NAFLD e quelli con cirrosi dovuta a NASH presentano una riduzione più lieve e probabilmente acquisita dell'attività LAL, come valutato dal test del sangue secco (DBS). Nel 2015, Baratta et al. (6) hanno riportato per la prima volta un'associazione tra la riduzione dell'attività LAL e il danno epatico nei pazienti con NAFLD. Gli autori hanno riferito che, rispetto ai controlli, 200 pazienti con NAFLD (età, $55,4 \pm 11,0$ anni) hanno mostrato una riduzione di circa il 30% dell'attività LAL nel sangue insieme a un aumento degli enzimi epatici sierici. Questo risultato è stato confermato dall'ulteriore riduzione dell'attività LAL (~40%) osservata nei pazienti con NASH istologicamente provata rispetto ai controlli. Questi risultati sono in linea con quelli riportati da Shteyer et al. (80), che hanno riscontrato che l'attività LAL nel sangue prediceva in modo significativo la gravità della malattia epatica nei pazienti con steatosi microvescicolare, cirrosi criptogenetica e NAFLD diagnosticata sulla base di biopsie epatiche. In uno studio successivo, abbiamo riscontrato che, rispetto ai

soggetti sani, i pazienti con cirrosi criptogenetica, la maggior parte dei quali aveva una cirrosi post-NASH, mostravano una riduzione del ~35% dell'attività LAL nel sangue (95). Tuttavia, nello stesso studio, abbiamo anche osservato che i pazienti con cirrosi di eziologia nota presentavano un'attività LAL significativamente ridotta, paragonabile a quella osservata nei pazienti con cirrosi criptogenetica; inoltre, abbiamo determinato che l'attività LAL era fortemente associata alla conta dei leucociti e delle piastrine. Pertanto, abbiamo ipotizzato che, nel contesto della cirrosi, il test DBS possa essere influenzato da leucopenia e trombocitopenia, tipiche anomalie ematologiche dell'ipertensione portale. Inoltre, sebbene fosse già noto che la maggior parte dell'attività LAL del sangue misurata con il test DBS riflettesse l'attività LAL leucocitaria, abbiamo riportato che anche le frazioni di piastrine nel sangue presentavano un'attività LAL significativa, strettamente correlata all'attività LAL totale del sangue misurata con il test DBS (94). In questo contesto, in una coorte di pazienti con NAFLD non cirrotica, Polimeni et al. (62) ha descritto che l'attività della LAL era ridotta del ~20% in pazienti con splenomegalia, rispetto a quelli senza, suggerendo che la ridotta attività della LAL abbia di per sé un ruolo nella fisiopatologia della splenomegalia. In particolare, i livelli ematici di LAL in diverse fasi dell'evoluzione della NAFLD sono stati ricapitolati in due studi recenti (7, 29). Il primo studio era uno studio trasversale che comprendeva 575 pazienti, la maggior parte dei quali è stata valutata con l'ecografia (le biopsie epatiche sono state valutate solo in un sottogruppo di pazienti) e la fibrosi è stata stratificata in base al Fibrosis-4 e al punteggio di fibrosi della NAFLD. In questo studio, Baratta et al. (7) hanno riportato che l'attività LAL nel sangue era ridotta rispettivamente del 10%, 20% e 50% nell'intero gruppo di pazienti con fegato grasso, nel sottogruppo di pazienti con NASH e nel sottogruppo di pazienti con cirrosi criptogenetica, rispetto ai controlli. Nel secondo studio, che comprendeva 118 pazienti con NAFLD, i pazienti con NAFLD non cirrotica e cirrotica presentavano una riduzione dell'attività LAL rispettivamente del 30% e del 50% rispetto ai controlli (29). In quest'ultimo studio, l'attività LAL è stata determinata anche nelle frazioni leucocitarie e piastriniche del sangue. L'attività LAL intracellulare delle piastrine, ma non quella intracellulare dei leucociti, è risultata significativamente ridotta nei pazienti con NAFLD non cirrotica rispetto ai controlli e una riduzione simile è stata osservata nei pazienti con cirrosi NASH rispetto ai controlli e ai pazienti con NAFLD non cirrotica.

Complessivamente, questi studi recenti indicano che la LAL ematica è ridotta del 20-40% nei pazienti con NAFLD non cirrotica e del 35-50% in quelli con cirrosi NASH rispetto ai controlli (6, 7, 29, 95). Una riduzione del 10-20% dell'attività LAL nel sangue nei pazienti con NASH rispetto a quelli con NAFLD non NASH è stata riportata anche in alcuni studi (6, 7), ma non all'unanimità (31). Una correlazione significativa tra l'attività LAL del sangue e la conta delle piastrine è sempre stata evidenziata e gli studi più recenti hanno dimostrato che l'attività LAL determinata nella frazione piastrinica è strettamente correlata a quella dei campioni di DBS (51) e che si riduce progressivamente nei pazienti con NAFLD non cirrotica e cirrosi NASH. Questo dato suggerisce che l'attività LAL piastrinica è un importante determinante dell'attività LAL totale del sangue; tuttavia, è anche evidente che la riduzione osservata nella malattia epatica cronica non dipende solo dalla trombocitopenia. Inoltre, nel contesto della malattia epatica, la compromissione dell'attività LAL sembra essere piuttosto specifica della NAFLD. Infatti, sebbene non abbiamo osservato alcuna differenza significativa nel tasso di riduzione dell'attività LAL tra cirrosi di eziologia nota e cirrosi criptogenetica, studi che hanno utilizzato campioni più ampi hanno riportato che, a parità di stadio della malattia epatica, la riduzione dell'attività LAL nella NAFLD è maggiore rispetto a quella nelle malattie epatiche di altra eziologia (29, 89).

Possibili determinanti della ridotta attività di LAL nella NAFLD: spunti per ulteriori indagini

A causa della bassissima prevalenza di varianti genetiche responsabili dell'alterazione dell'attività LAL, la maggior parte, se non la totalità, della ridotta attività LAL osservata nella NAFLD deve essere considerata acquisita attraverso un meccanismo epigenetico. Recentemente abbiamo riportato che nessuno dei 66 pazienti con cirrosi criptogenetica che presentavano una riduzione significativa dell'attività LAL era portatore della mutazione c.894G>A in *LIPA*, responsabile di circa il 60% di tutti i casi di LAL-D (6).

Sulla base di studi sperimentali, nemmeno i bassi livelli di espressione della proteina *LIPA* o LAL sembrano essere responsabili della ridotta attività LAL osservata nei pazienti con NAFLD con LDL ossidate; Infatti, in vitro, il trattamento di macrofagi peritoneali con cristalli di colesterile, specie lipidiche comunemente presenti nel sangue di pazienti dismetabolici, induce la traslocazione nucleare di TFEB e la conseguente induzione di un gruppo di bersagli genici lisosomiali e

autofagici di TFEB, tra cui LAL (27). Tuttavia, nello stesso modello, i macrofagi aterosclerotici mostrano lisosomi morfologicamente anormali, disfunzionali a causa dell'aumento del pH e della permeabilità della membrana (27). Questi risultati sono coerenti con quelli osservati negli epatociti isolati in coltura di topi ob/ob, dove l'aumento del numero di autofagosomi si accompagna a una ridotta acidificazione e all'attivazione della catepsina negli autolisosomi (39). Pertanto, in condizioni di sovraccarico lipidico, la ridotta lipofagia può essere attribuita a un'alterata acidificazione lisosomiale piuttosto che a una carenza assoluta di espressione di LAL. Una panoramica dello smaltimento lisosomiale dei grassi normale e patologico, che dipende anche dall'attività di LAL, è rappresentata nella Fig. 3.

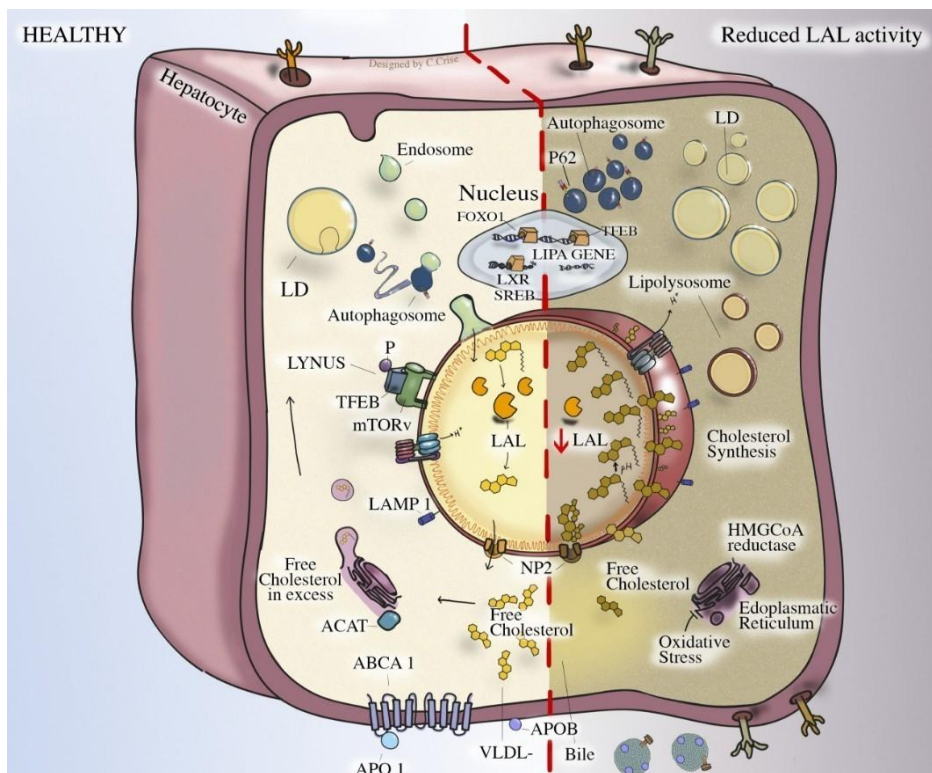


Fig. 3. Funzione del lisosoma nel contesto fisiologico e in condizioni dismetaboliche con ridotta attività della lipasi acida lisosomiale (LAL), come la malattia del fegato grasso non alcolico (NAFLD). La via endosomiale e la lipofagia convergono nel lisosoma per il catabolismo delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e delle gocce lipidiche (LD), rispettivamente. In condizioni fisiologiche (lato sinistro), il lisosoma è finemente regolato da una fitta rete di segnali che coinvolgono recettori cellulari, fattori nucleari e diversi metaboliti. Il cosiddetto complesso proteico LYNUS (lysosomal nutrient sensing) regola il fattore di trascrizione EB (TFEB), che attiva i geni coinvolti nell'autofagia e costituisce i componenti lisosomiali. In presenza di un adeguato apporto calorico, il mammalian target of rapamycin (mTOR) si lega al lisosoma per fosforilare e disattivare TFEB. Un altro meccanismo di controllo metabolico è attuato dal lisosoma attraverso il pool di colesterolo. In condizioni fisiologiche, la quantità di colesterolo libero regola il fattore di trascrizione sterol regulatory element-binding protein (SREBP). Se il colesterolo libero è abbondante, SREBP non si sposta nel

nucleo; altrimenti, SREBP entra nel nucleo e trascrive il gene per la 3- idrossi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reduttasi, un enzima chiave nella sintesi del colesterolo. Inoltre, in presenza di colesterolo libero, SREBP trasloca il fattore di trascrizione liver X receptor (LXR), che trascrive la proteina ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1), permettendo la formazione di lipoproteine ad alta densità (HDL) e rappresentando quindi il trasporto del colesterolo fuori dalla cellula. L'acil-CoA:colesterolo aciltransferasi (ACAT), situata nel reticolo endoplasmatico (ER), è in grado di riesterificare il colesterolo libero e di rimandarlo alla LD. LAL è l'idrolasi acida responsabile dell'idrolisi degli esteri del colesterolo e dei trigliceridi. Quando la LAL è assente o ha una funzionalità ridotta (lato destro), quest'ultima osservata nella NAFLD, gli esteri del colesterolo e i trigliceridi si accumulano nel lisosoma. La struttura del lisosoma e la funzionalità delle sue pompe di membrana, compresa la V-ATPasi, sono compromesse; di conseguenza, l'acidificazione del lume lisosomiale, essenziale per la funzione degli enzimi lisosomiali, è compromessa. I lisosomi inglobati in modo disfunzionale si ingrandiscono, formando un lipolisosoma, e la lipofagia è di conseguenza compromessa, con uno smaltimento insufficiente delle LD citoplasmatiche. Infine, la mancanza di colesterolo libero induce SREBP a entrare nel nucleo e a trascrivere HMG-CoA, aumentando ulteriormente la sintesi di colesterolo. APO, apolipoproteina; FOXO1, forkhead box O1; LAMP, lysosomal-associated membrane protein; VLDL, very low- density lipoprotein.

Il primo passo della ricerca futura dovrebbe essere la conferma che l'attività LAL rilevata nei campioni di DBS riflette quella delle cellule di tutto il corpo, in particolare del fegato. Finora questo punto è stato ipotizzato piuttosto che aspetto sono stati riportati molto recentemente da Gomaraschi et al. (31), che hanno scoperto che l'attività LAL misurata direttamente nel fegato di pazienti con NAFLD era significativamente correlata con quella misurata nel sangue mediante test DBS, ma non con l'espressione LAL epatica. Inoltre, l'attività LAL epatica dimostrato a tal fine, l'espressione di LAL e, soprattutto, l'attività di LAL nel fegato dovrebbero essere confrontate tra pazienti con NAFLD e individui sani. Gli unici dati su questo dovrebbe essere esaminata per verificare la correlazione con i segni istologici della LAL-D, tra cui la steatosi microvescicolare, i lipolisosomi, le cellule schiumose di Kupffer e i segni di disfunzione lisosomiale, che possono essere riscontrati, anche se in misura minore, nei pazienti con NAFLD (55, 104), nonché con il grado di necroinfiammazione, palloncino e fibrosi.

Infine, studi futuri dovrebbero verificare se la stimolazione dell'attività epatica della LAL eserciti effetti benefici sull'istologia epatica nella NAFLD sia nei modelli sperimentali che nei pazienti. Nei topi LIPA-knockout, è stato dimostrato che l'espressione di LAL umana specifica per gli epatociti riduce le dimensioni del fegato a livelli normali, riducendo l'accumulo di lipidi sia negli epatociti che nelle cellule di

Kupffer (24). . In questo contesto, la potenziale modulazione dell'attività della LAL da parte della dieta e dell'esercizio fisico e l'effetto dei trattamenti farmacologici dovrebbero essere ulteriormente esplorati. Sulla base della correlazione positiva tra l'uso di statine e l'attività della LAL, è stata suggerita anche una modulazione epigenetica dell'espressione *della LIPA* da parte delle statine o un potenziamento della funzione dell'enzima (6). Più recentemente, anche la terapia con fibrati è stata associata a un aumento dell'attività della LAL (59). Infine, si è tentati di ipotizzare che, essendo una terapia enzimatica sostitutiva già disponibile per il trattamento della LAL-D genetica, questo stesso approccio potrebbe rivelarsi efficace nei pazienti con NAFLD che presentano un'attività LAL gravemente ridotta e una malattia epatica più avanzata e progressiva.

Colestasi e NAFLD

Già da due decenni si è posta l'attenzione sull'impronta colestatica nell'epatopatia steatosica non alcolica, tuttavia solo recentemente alcuni studi hanno nuovamente sottolineato questo aspetto dimostrando come il pattern colestatico dei pazienti NAFLD potesse in qualche modo alterare la prognosi di questi pazienti e presenti delle basi biochimiche che potrebbero dare qualche spiraglio terapeutico.

Infatti già nel 2005 Sorrentino et al mostravano come i pazienti NAFLD con una colestasi avessero sempre un danno istologico grave e ipotizzavano quindi che la colestasi biochimica nei pazienti con NAFLD potesse predire in modo significativo anomalie più gravi all'istologia epatica. Questo studio metteva a confronto il gruppo colestatico NAFLD con pazienti con un grado di infiammazione e fibrosi identiche ma senza segni di colestasi sierologica: i pazienti senza colestasi sierologica, nonostante un grado di fibrosi comparabile non presentava segni di compromissione del comparto biliare, inoltre, questo gruppo era effettivamente caratterizzato da un'età più avanzata. Evidentemente il quadro di danno biliare è assente nei pazienti senza colestasi biochimica e la gravità istologica della malattia non sembra indicare la presenza di questa condizione. Questi dati potevano suggerire un ruolo prognostico della colestasi nella storia naturale della NAFLD. Tale sospetto è stato confermato recentemente dallo studio di Pennisi et al (Pennisi Liver Int 2022).

In questo studio hanno analizzato 582 pazienti NAFLD suddivisi in tre gruppi in base al quadro degli enzimi epatici elevati: quadro prevalentemente colestatico (C), quadro prevalentemente epatocellulare (H) e quadro misto (M). Il pattern di enzimi epatici elevati è stato calcolato utilizzando la seguente formula: $R = (ALT/ALT \text{ limite superiore di normalità}) / (ALP/ALP \text{ limite superiore di normalità})$. Hanno quindi

valutato prospettivamente l'impatto dello sviluppo di eventi avversi maggiori correlati alla patologia epatica sottostante (major liver-related outcomes (MALO)). La presenza di un pattern colestatico sierologico era correlato ad un aumentato rischio di MALO indipendentemente da altre caratteristiche della malattia epatica.

La lesione dell'epatocita è il principale fattore scatenante la reazione duttulare DR, che comprende non solo la proliferazione dei dotti biliari, ma anche un ampio spettro di reazioni del tessuto epatico, compresa l'attivazione di diverse vie infiammatorie. Le lesioni epatiche croniche attivano le cellule progenitrici epatiche (HPC), quiescenti nel fegato normale, con una conseguente DR che si manifesta in diversi modi. In primo luogo, le HPCs si differenziano in cellule intermedie e verso i lineages degli epatociti o dei colangiociti, a seconda della patogenesi del danno epatico; viceversa, le HPCs possono dedifferenziare, portando alla metaplasia. Inoltre, il sovraccarico relativo di acidi biliari potrebbe essere un fattore scatenante precoce della metaplasia duttulare degli epatociti, esercitando un effetto primario sulle stesse cellule parenchimali che, a loro volta, stimolano le CSE. Recentemente alcuni studi hanno evidenziato come un sovraccarico di acidi biliari a livello intraepatocitario possa svolgere un ruolo nell'impairment dell'autofagia, bloccando questo importante processo cellulare. Tale blocco avverrebbe in diversi punti del processo autofagico: gli acidi biliari riducono la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma e, attraverso una transrepressione genica, riducono la trascrizione di importanti geni che regolano l'autofagia come mostrato in figura 4 (Panzitt K, Biochimica et Biophysica Acta 2021). Il significato biologico della DR e dell'attivazione delle CSE è stato esplorato anche nella NAFLD.

Inoltre nello studio di Pennisi et al è stata condotta un'analisi di un piccolo sottogruppo di pazienti stratificato per i pattern C e H, ed è stata riscontrata una significativa down-espressione dei geni NR1H3, RXR α e VCAM-1 nei pazienti con il pattern C rispetto a quelli con il pattern H. I recettori retinoidi X α (RXR α) appartengono ai recettori nucleari che mediano gli effetti biologici dei retinoidi attraverso il loro coinvolgimento nell'attivazione genica mediata dall'acido retinoico. Questo recettore funziona come fattore di trascrizione legandosi come omodimero o eterodimero a sequenze specifiche nei promotori dei geni bersaglio. RXR α crea un eterodimero funzionale con il recettore epatico X α (LXR α alias NR1H3), che rappresenta la subunità di legame con il ligando. L'eterodimero rappresenta un regolatore chiave della funzione dei macrofagi, controllando i programmi trascrizionali coinvolti nell'omeostasi dei lipidi e del colesterolo e nell'infiammazione.

Le vie attivate da LXR α hanno una duplice funzione: da un lato, sono coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi del colesterolo e degli acidi biliari aumentando il catabolismo del colesterolo e, dall'altro, possono prevenire la tossicit  derivante dall'accumulo di acidi biliari.(Uppal H, Hepatology 2007). In questo scenario, la bassa espressione di RXR α e LXR α nei pazienti NAFLD con il pattern C, e la conseguente mancanza dei loro effetti benefici,   coerente con il legame osservato tra il pattern C e gli esiti clinici negativi. D'altra parte, la molecola di adesione delle cellule vascolari1 (VCAM-1)   una proteina di superficie che, inducendo la disfunzione dell'endotelio vascolare, l'adesione e lo stravasamento dei monociti nei vasi sanguigni e determinando uno stato proinfiammatorio in diversi contesti, agisce come fattore scatenante e peggiora l'infiammazione epatica nella NAFLD, con la conseguenza di un possibile impegno verso un modello epatocellulare citolitico.

In definitiva questi studi suggeriscono che la presenza di un pattern biochimico colestatico identifica un sottogruppo di pazienti a maggior rischio di MALO.

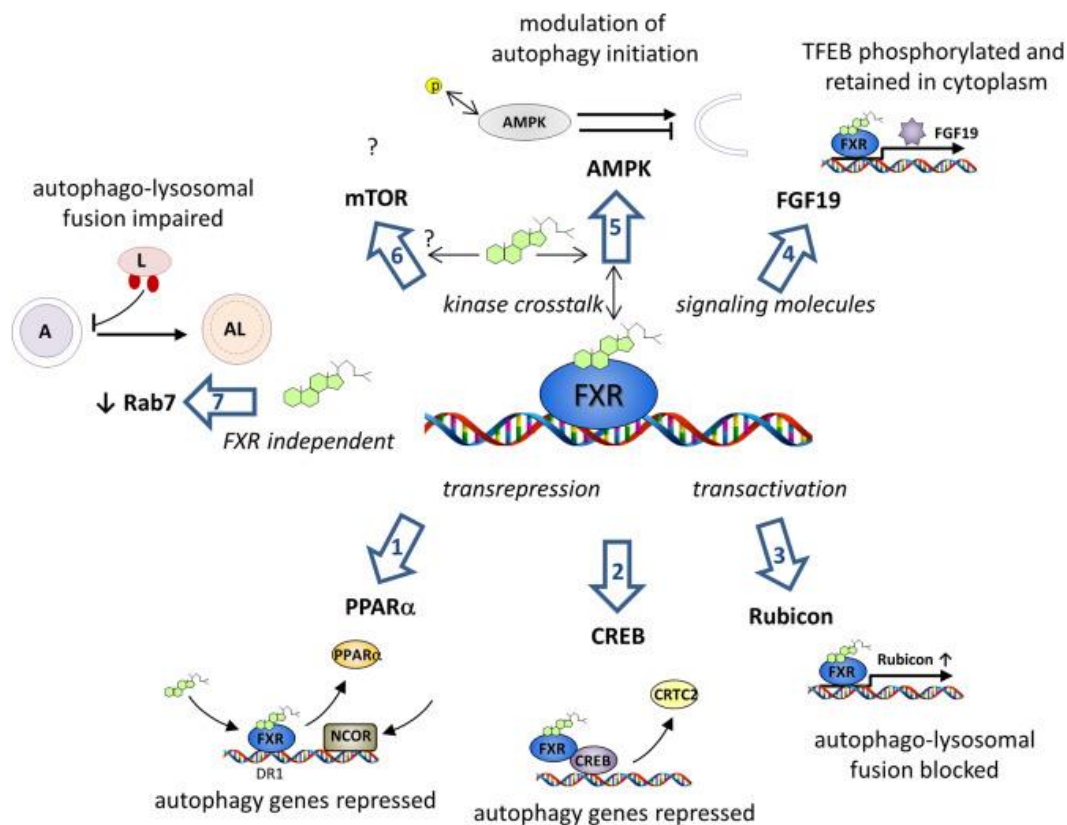


Fig 4 Il ruolo degli acidi biliari liberi a livello epatocitario sul processo autofagico.

Parte sperimentale

Nelle successive sezioni andremo ad affrontare i principali 3 studi effettuati dal nostro gruppo per quanto pertiene il ruolo di LAL, Lipofagia e della colestasi nella NAFLD. Dal momento che numerose delle metodiche di immunomorfologia e biologia molecolare si sovrappongono nei tre studi seguenti, tratteremo una sezione di materiali e metodi univoca in calce agli studi suddetti. Invece per quanto riguarda la popolazione oggetto di studio verrà indicata per i singoli studi in quanto non è univoca.

Studio 1: Caratteristiche molecolari ed istologiche della riduzione dell'attività della lipasi acida lisosomiale nella NAFLD.

Sulla base del ruolo di LAL come effettore ultimo della degradazione degli esteri del colesterolo dell'epatocita, nel seguente studio abbiamo esplorato il contenuto proteico e l'attività della LAL sia in vitro che in vivo in modelli sperimentali di NAFLD, al fine di chiarire i meccanismi alla base della compromissione dell'attività della LAL nella NAFLD.

Abbiamo riscontrato un accumulo di LAL disfunzionale ed extralisosomiale dovuto all'ubiquitinazione della sua regione N-terminale. Questi risultati sono stati confermati nel fegato di un'ampia coorte di pazienti con NAFLD diagnosticata istologicamente. In particolare, l'accumulo anomalo di LAL ubiquitinata è stato osservato nei pazienti con NAFLD diagnosticata istologicamente, nei quali era correlato con la gravità della malattia e con alcuni dei segni distintivi dell'alterata funzione di LAL, ossia la steatosi microvescicolare e i lipolisosomi.

Pazienti

In totale, sono stati inclusi nello studio 87 pazienti sottoposti a biopsia epatica per il grading e la stadiazione della NAFLD presso l'Unità di Epatologia del Policlinico Universitario Campus Bio- Medico di Roma e il cui tessuto epatico incluso in paraffina era disponibile per ulteriori analisi. È stata confermata l'assenza di un'anamnesi di assunzione di alcolici >20 g/die se donna e >30 g/die se uomo o di uso di farmaci noti per indurre danno epatico, e sono stati ottenuti i seguenti risultati: anticorpi anti-HCV e HBsAg negativi; anticorpi antinucleari (ANA) < 1:80 e anticorpi anti- mitocondriali (AMA), anti-muscolo liscio (ASMA) e anti-microsomiali di fegato e reni (anti-LKM) negativi; saturazione della transferrina e livelli sierici di ceruloplasmina e alfa-1 antitripsina normali. Tutti i pazienti avevano firmato un consenso informato in cui veniva specificato il possibile utilizzo di parte del loro tessuto epatico a scopo di ricerca. Un campione conveniente di dieci pazienti con transaminasi normali, test negativo per HBsAg e anticorpi anti-HCV, e che presentavano istologicamente fegato

normale con meno del 5% di steatosi è stato incluso nello studio come gruppo di controllo per le valutazioni istologiche e immunohistochimiche (IHC). Si trattava di cinque donatori di fegato da cadavere e di cinque pazienti sottoposti a chirurgia epatica per tumori metastatici (due tumori del colon, due cistoadenomi biliari, un tumore gastrico, un tumore endocrino). Nei pazienti metastatici, il tessuto epatico per l'immunohistochimica (IHC) era ad almeno 0,5 cm dalla lesione metastatica.

Il protocollo dello studio era conforme alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki del 1975 ed è stato approvato dal Comitato Etico dell' Università Campus Bio-Medico di Roma.

Risultati

L'attività di LAL è ridotta in un modello cellulare di NAFLD

Abbiamo innanzitutto valutato il contenuto e l'attività della LAL in modelli sperimentali in vitro e in vivo di NAFLD. Per innescare il sovraccarico lipidico, gli epatociti umani Huh7 sono stati coltivati in DMEM ad alto contenuto di glucosio integrato con 400 μ M di acido palmitico (high glucose/high lipid, HGHL) per 2, 4 e 8 giorni. Un aumento significativo dei lipidi intracellulari è stato ottenuto a partire dal quarto giorno di trattamento (Fig. 1A), parallelamente a una diminuzione significativa dell'attività di LAL (Fig. 1B). L'analisi dei livelli di mRNA ha mostrato che l'espressione del gene LIPA era solo leggermente aumentata dopo 4 giorni di trattamento con HGHL (Fig. 1C). Inaspettatamente, mediante analisi in western blotting con due diversi anticorpi LAL C-terminali (da 150 a 300 e da 164 a 399 aminoacidi), è stato osservato un marcato accumulo di proteine LAL ai giorni 2 e 4 nelle cellule HGHL (Fig. 1D). Al contrario, utilizzando un anticorpo che riconosce la regione N- terminale della proteina (da 15 a 200 aminoacidi), è stata rilevata una significativa diminuzione della proteina LAL in queste stesse cellule, coerente con il calo dell'attività LAL (Fig. 1D). Complessivamente, questi dati suggeriscono che, in presenza di una supplementazione di HGHL, nelle cellule Huh7 si verifica una modifica post-traduzionale della proteina LAL a livello della regione N- terminale che maschera l'epitopo dell'anticorpo e che tale modifica determina l'accumulo di un enzima ubiquitinato/disfunzionale.

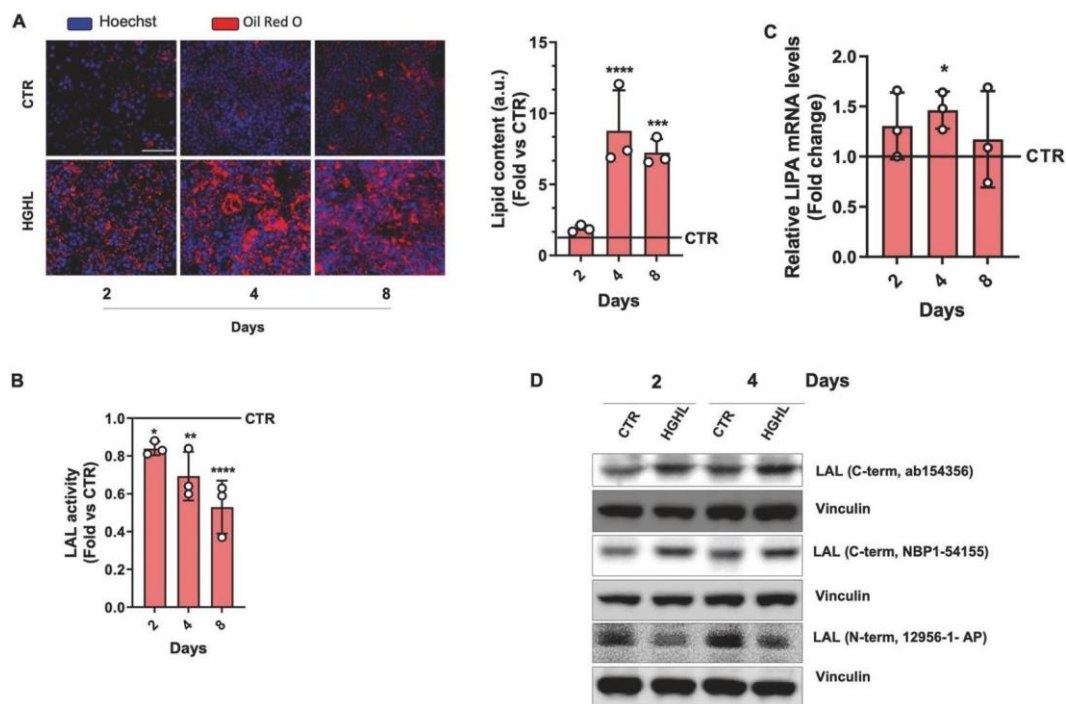


Fig. 1 Il contenuto e l'attività della proteina LAL sono influenzati in un modello in vitro di NAFLD. Le cellule Huh7 sono state coltivate in terreno ad alto contenuto di glucosio/alto contenuto di lipidi (HGHL) per 2, 4 e 8 giorni. A Colorazione con Oil Red O per determinare i lipidi intracellulari mediante microscopia a fluorescenza (pannello di sinistra) o con un metodo colorimetrico dopo eluizione di Oil Red O (pannello di destra). Per la colorazione dei nuclei è stato utilizzato Hoechst 33342. B Attività LAL determinata mediante saggio enzimatico spettrofotometrico. C Analisi dei livelli di mRNA di *LIPA* mediante qPCR. D Valutazione del contenuto proteico di LAL mediante analisi western blot utilizzando diversi anticorpi diretti contro l'epitopo N-term o C-term. La vinculina è stata utilizzata come controllo di carico. Gli immunoblots sono rappresentativi di un esperimento su tre che ha dato risultati simili. I dati sono espressi come media \pm SD (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, vs CTR; $n = 3$).

La diminuzione dell'attività di LAL è mediata dall'ubiquitinazione

Per verificare se l'ubiquitinazione delle proteine fosse aumentata nelle cellule HGHL, abbiamo effettuato un'analisi western blot con un anticorpo anti-ubiquitina. È stato osservato un aumento significativo delle proteine ubiquitinate, in concomitanza con l'accumulo di LAL evidenziato con l'anticorpo LAL C-terminale, indicando LAL come possibile bersaglio dell'ubiquitinazione (Fig. 2A). In particolare, anche l'espressione di un altro enzima lisosomiale, la catepsina, è aumentata con la supplementazione di HGHL, anche se in misura molto ridotta (Fig. 2A). Pertanto, abbiamo effettuato un'analisi immunocitochimica fluorescente utilizzando gli anticorpi LAL e ubiquitina a C-term. L'aumento delle proteine totali LAL e ubiquitina è stato confermato dopo 4 (dati non mostrati) e 8 giorni di trattamento con HGHL attraverso la microscopia confocale (Fig. 2B, C) e si è osservata una maggiore colocalizzazione tra i segnali

LAL e ubiquitina nelle cellule HGHL rispetto alle cellule di controllo (Fig. 2D). Per corroborare ulteriormente questi risultati, abbiamo cercato di verificare se la proteina LAL subisce l'ubiquitinazione e la degradazione mediata dal proteasoma in condizioni fisiologiche. Le cellule Huh7 sono state trattate per 6 ore con l'inibitore del proteasoma MG132. Come rilevato nella Fig. 2E, MG132 è stato efficace nel ridurre la degradazione delle proteine ubiquitinate. In particolare, l'analisi western blot effettuata con l'anticorpo N-term ha rivelato una diminuzione del contenuto di LAL nelle cellule trattate con MG132 (Fig. 2E), coerentemente con l'ipotesi che l'ubiquitinazione mascheri l'epitopo riconosciuto dall'anticorpo N-term e che MG132 abbia aumentato la LAL ubiquitinata. Al contrario, i due anticorpi C-term hanno rivelato un accumulo di LAL al trattamento con MG132 (Fig. 2E), suggerendo che tali anticorpi riconoscono la LAL totale, cioè sia l'enzima ubiquitinato/disfunzionale che quello non ubiquitinato/funzionale. Coerentemente, l'inibizione dell'attività del proteasoma da parte di MG132 ha portato a una significativa diminuzione dell'attività di LAL (Fig. 2F). La specificità dei due anticorpi utilizzati contro le regioni C e N è stata confermata nel fegato di topi LAL knockout (KO) (Fig. 1 supplementare). Infine, per dimostrare l'aumento dell'ubiquitinazione di LAL in seguito al trattamento con HGHL, abbiamo sovraespresso una HA- ubiquitina ed eseguito un saggio di immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo anti-HA. Come previsto, l'analisi western blot sui lisati cellulari totali ha rivelato un accumulo di proteine HA-ubiquitina nelle cellule trattate con HGHL per 4 giorni (Fig. 2G). L'immunoprecipitazione delle proteine HA- ubiquitinate, seguita dall'analisi western blot di LAL con l'anticorpo C-term, ha rivelato che questa proteina era ubiquitinata nelle cellule trattate con HGHL per 4 giorni (Fig. 2H). Al contrario, la colorazione con l'anticorpo N-term non ha rivelato alcun segnale, confermando che l'ubiquitinazione maschera l'epitopo dell'anticorpo nella regione N-terminale della proteina LAL (Fig. 2H).

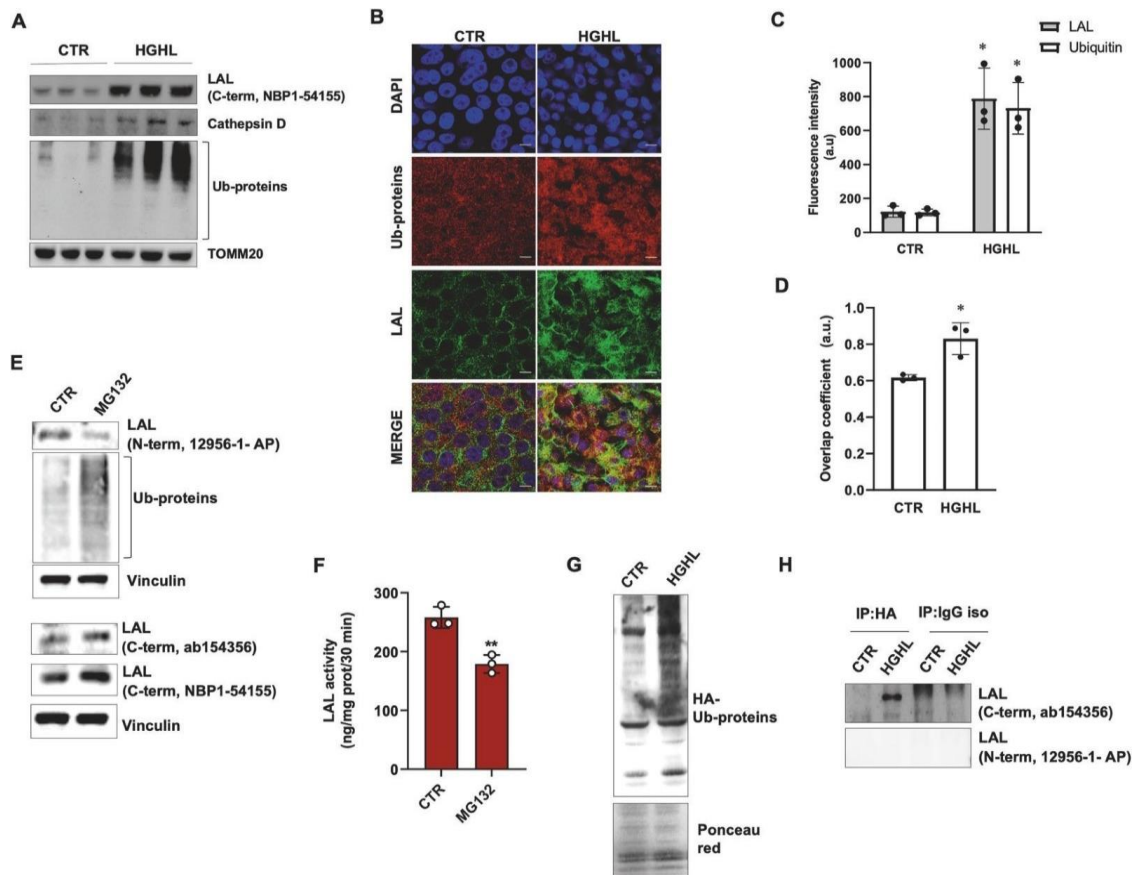


Fig. 2 La proteina LAL subisce un'inattivazione mediata dall'ubiquitinazione in un modello in vitro di NAFLD. Le cellule Huh7 sono state coltivate in terreno ad alto contenuto di glucosio/alto contenuto di lipidi (HGHL) per 4 (A) o 8 giorni (B-D) o con l'inibitore del proteasoma MG132 (10 μ M) per 6 ore (E, F). A Valutazione della proteina LAL, delle proteine ubiquitinate (Ub-prot) e della cathepsina D mediante analisi western blot. TOMM20 è stato utilizzato come controllo di carico. B-D Analisi dell'ubiquitinazione di LAL mediante microscopia confocale. Sono state mostrate le proteine ubiquitinate (rosso) e la proteina LAL totale (individuata dall'anticorpo contro il termine C) (verde) (B) e sono state valutate la loro abbondanza (C) e la colocalizzazione (D). E Valutazione di LAL (mediante diversi anticorpi anti-LAL contro il C-term o l'N-term) e delle proteine ubiquitinate (Ub-prot). La vinculina è stata utilizzata come controllo di carico. F Attività di LAL determinata mediante saggio enzimatico spettrofotometrico. G Western blot rappresentativo di cellule Huh7 che esprimono ubiquitina marcata con HA. L'anticorpo anti-HA è stato utilizzato per rivelare le proteine ubiquitinate in 4 giorni di trattamento con HGHL. La colorazione con rosso Ponceau è stata utilizzata come controllo di carico. H Analisi Western blot di LAL utilizzando l'anticorpo C-term o N-term sulle proteine ubiquitinate HA immunoprecipitate in 4 giorni di trattamento con HGHL. Gli immunoblots sono rappresentativi di un esperimento su tre che ha dato risultati simili. I dati sono espressi come media \pm SD (* p < 0,05, ** p < 0,01, vs CTR; n = 3). Barra di scala 25 μ m.

La localizzazione extralisosomiale di LAL aumenta con il trattamento HGHL

Sulla base di questi dati, abbiamo ipotizzato che la LAL ubiquitinata/disfunzionale fosse meno in grado di localizzarsi nel compartimento lisosomiale. Abbiamo quindi analizzato la distribuzione subcellulare di LAL determinando la colocalizzazione tra LAL e LAMP1, una proteina di membrana lisosomiale. Sono stati eseguiti saggi di immunofluorescenza in cellule HGHL utilizzando gli anticorpi C-term LAL e LAMP1. L'accumulo di LAL è stato confermato sia al giorno 4 (dati non mostrati) che al giorno 8 nelle cellule HGHL (Fig. 3A, B). Questo evento è stato accompagnato dall'aumento del marcatore lisosomiale LAMP1 rispetto alle cellule di controllo (Fig. 3A, B), indicando un aumento della massa lisosomiale. È interessante notare che, in caso di trattamento con HGHL, la colocalizzazione fra LAL e LAMP1 erano significativamente diminuiti (Fig. 3C), suggerendo che LAL si accumula anche nel compartimento extralisosomiale. Come previsto, rispetto alla LAL totale, la LAL non ubiquitinata/funzionale rilevata con l'anticorpo N-term ha mostrato livelli di colocalizzazione più elevati con il segnale di LAMP1 (Fig. 2 supplementare). Abbiamo isolato la frazione citosolica e determinato il contenuto di LAL mediante western blot per confermare i dati ottenuti con la microscopia confocale. Abbiamo riscontrato un aumento dell'abbondanza di LAL nel citosol, in linea con l'idea che con il trattamento HGHL LAL si accumuli n e l citosol (Fig. 3D, E).

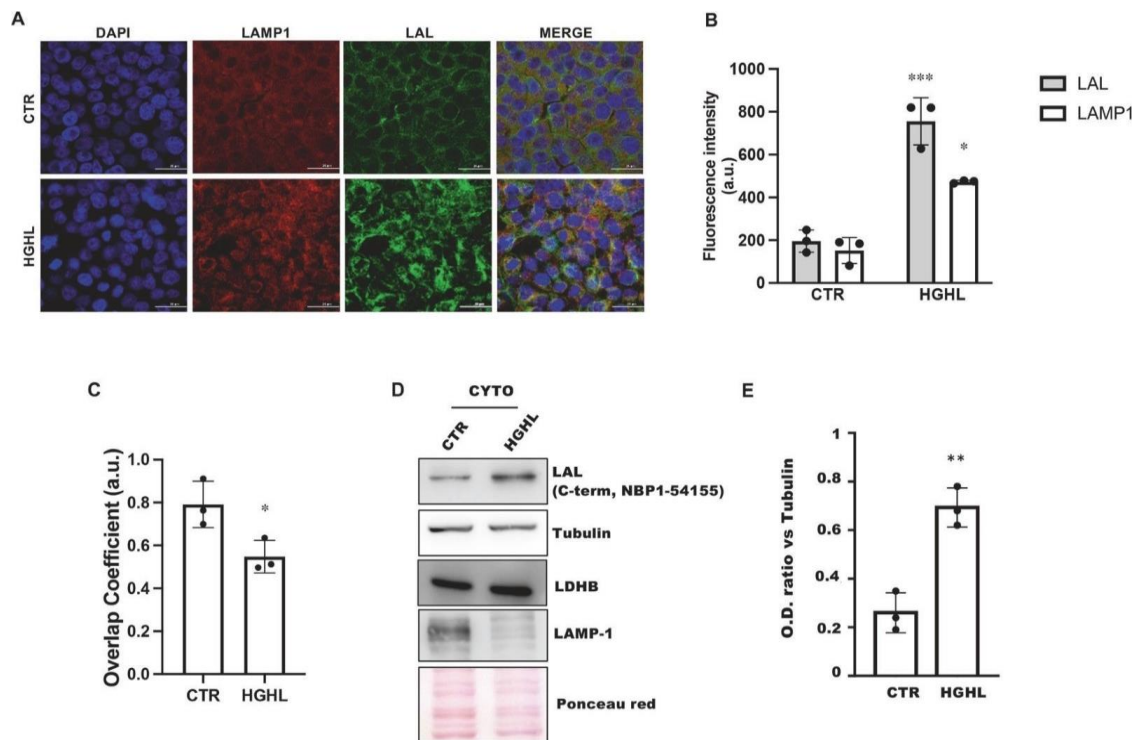


Fig. 3 La proteina LAL si accumula nel compartimento extralisosomiale in un modello in vitro di NAFLD. Le cellule Huh7 sono state coltivate in terreno ad alto contenuto di glucosio/alto contenuto di lipidi (HGHL) per 8 giorni. A-C Analisi della localizzazione di LAL mediante

microscopia confocale. Sono stati mostrati il marcatore lisosomiale LAMP1 (rosso) e la proteina LAL totale (individuata dall'anticorpo contro il termine C) (verde) (A) e sono state valutate la loro abbondanza (B) e colocalizzazione (C). Barra di scala 25 μ m. D, E Analisi in Western blot del dominio C-terminale di LAL, LDHB, tubulina e LAMP-1 nella frazione citosolica (D) e valutazione del contenuto di LAL nella frazione citosolica calcolando il rapporto LAL/tubulina mediante analisi densitometrica (E). Sono riportate le immagini rappresentative di un esperimento su tre che ha dato risultati simili. I dati sono espressi come media \pm SD (* p < 0,05, ** p < 0,01 *** p < 0,001, vs CTR; n = 3).

La LAL ubiquitinata/disfunzionale si accumula nel fegato di topi alimentati con HFD

Abbiamo poi cercato di confermare questi risultati in un modello in vivo di NAFLD costituito da topi adulti maschi C57BL/6J alimentati con HFD per 4 o 8 mesi. I topi alimentati con ND sono serviti da controllo. L'alimentazione con HFD è stata associata a un aumento significativo della steatosi istologica, del peso del fegato e dell'elevazione dei livelli di alanina aminotransferasi (ALT), glucosio e colesterolo sia a 4 che a 8 mesi [18, 19]. In linea con i dati in vitro, l'IHC effettuata utilizzando gli anticorpi C-term e N-term ha mostrato un aumento della LAL totale e una diminuzione della LAL non ubiquitinata/funzionale nel fegato dei topi alimentati con HFD rispetto a ND, soprattutto a 8 mesi (Fig. 4A). Coerentemente, il western blot effettuato con un anticorpo C-term ha rivelato che il contenuto di proteina LAL totale era più elevato nel fegato dei topi alimentati con HFD in entrambi i momenti (Fig. 4B). Inoltre, come previsto, l'attività LAL epatica è risultata significativamente ridotta nei topi HFD rispetto a quelli ND (Fig. 4C). In particolare, l'espressione genica della LIPA epatica era simile tra i gruppi di topi HFD e ND (Fig. 4D). Nel complesso, questi risultati indicano un accumulo di enzima ubiquitinato/disfunzionale nel fegato di topi HFD. La localizzazione della proteina LAL è stata analizzata mediante saggi di immunofluorescenza a doppia marcatura per LAL totale e LAMP1 (Fig. 4E). L'HFD è stato associato a un aumento del marcatore lisosomiale LAMP1 e dell'espressione di LAL totale (Fig. 4F), con una ridotta colocalizzazione tra i segnali di LAMP1 e LAL a 4 e 8 mesi nel fegato di topo HFD rispetto a quello ND (Fig. 4G). Questi risultati suggeriscono che LAL ubiquitinata/disfunzionale si accumula nel compartimento extralisosomiale nel fegato di topi HFD.

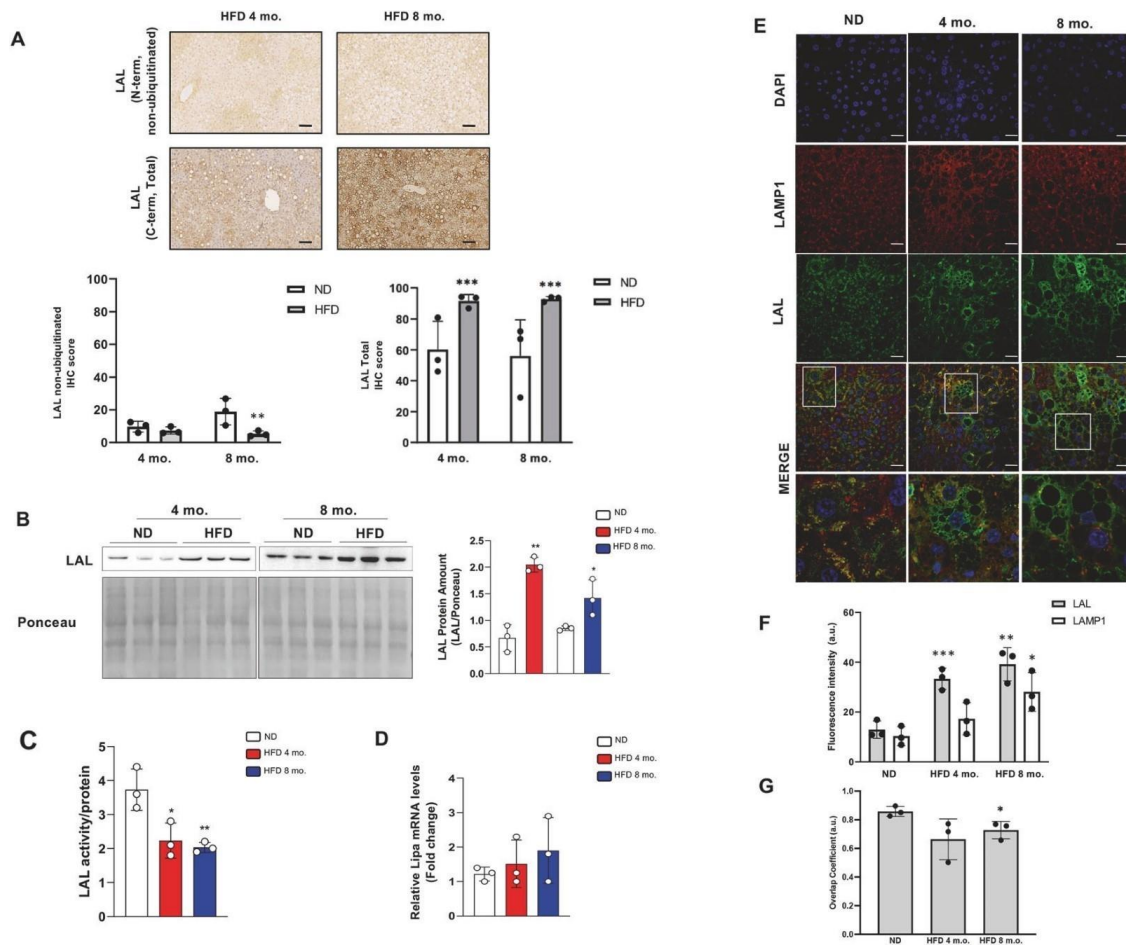


Fig. 4 Il contenuto e l'attività della proteina LAL sono influenzati in un modello in vivo di NAFLD. Topi C57BL/6J sono stati alimentati per 4 e 8 mesi con dieta ad alto contenuto di grassi (HFD) o dieta normale (ND). A Analisi immunohistochemica di LAL nel fegato mediante l'uso di diversi anticorpi che riconoscono LAL totale (C-term) o LAL non ubiquitinato (N-term) e la quantificazione relativa rispetto a ND. B Valutazione della proteina LAL totale negli omogenati di fegato mediante analisi western blot (pannello di sinistra) e analisi densitometrica relativa (pannello di destra). La colorazione con rosso Ponceau è stata utilizzata come controllo di carico. C Attività LAL determinata mediante saggio enzimatico spettrofotometrico. D Analisi dei livelli di mRNA di LIPA mediante qPCR. E-G Analisi della localizzazione di LAL mediante microscopia confocale. Sono stati mostrati il marcatore lisosomiale LAMP1 (rosso) e la proteina LAL totale (C-term) (verde) (E) e sono state valutate la loro abbondanza (F) e la colocalizzazione (G). Sono riportate immagini rappresentative di immunohistochemica e immunofluorescenza relative a un topo su 3 per ciascun gruppo. I dati sono espressi come media \pm SD ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$, $***p < 0,005$, vs ND; $n = 3$ per gruppo). Ingrandimento originale X100 (A); X400 (E), campo ad alta potenza X600 (E). Barra di scala 250 μ m (A); 25 μ m (E).

La LAL ubiquitinata/disfunzionale si accumula nel fegato dei pazienti con

NAFLD

Le caratteristiche epidemiologiche, cliniche, biochimiche e istologiche dei pazienti con NAFLD inclusi nello studio sono riportate in tabella 1. L'età media era di poco superiore ai 50 anni e la maggior parte dei pazienti era di sesso maschile (60%). Come previsto, il BMI era nell'intervallo dell'obesità e si è osservata un'alta prevalenza di diabete e ipertensione. Secondo i criteri di Brunt, la NASH è stata diagnosticata in 50 pazienti (57,5%) e tutti gli stadi della fibrosi epatica erano rappresentati. In un sottogruppo di 20 pazienti con NAFLD, il contenuto epatico di LAL non ubiquitinata/funzionale e totale è stato valutato contemporaneamente utilizzando gli anticorpi LAL N-term e C-term, rispettivamente. La LAL totale era più elevata nei fegati dei pazienti con punteggio NAS 3-5 e 6-7 rispetto a quelli con punteggio NAS 0-2 (Fig. 5A). Inoltre, nei pazienti con punteggio NAS 3-5 e 6-7, il livello epatico della proteina LAL totale era superiore a quello della LAL non ubiquitinata/funzionale (Fig. 5A), suggerendo che l'accumulo di proteina ubiquitinata/disfunzionale è correlato alla gravità della NAFLD. Sulla base del diverso andamento dell'espressione IHC ottenuto con gli anticorpi LAL C-term e N-term in questo sottogruppo di pazienti, l'analisi è stata estesa a una coorte di 87 pazienti con NAFLD, che sono stati studiati mediante IHC con l'anticorpo che riconosce la LAL N-term non ubiquitinata/funzionale. La proteina LAL non ubiquitinata/funzionale era significativamente più bassa nei pazienti NAFLD con NAS 3-5 e 6-7 rispetto a quelli con NAS 0-2 (Fig. 5B). La LAL non ubiquitinata/funzionale era anche più bassa nei pazienti con NAFLD con una maggiore percentuale di steatosi microvescicolare e con un numero più elevato di lisosomi inglobati nel grasso, meglio denominati liposomi (Fig. 5C, D).

L'espressione di alcuni geni rilevanti è stata infine valutata mediante il sistema di analisi Nanostring nCounter in una sottocoorte di 32 pazienti con NAFLD e in sei controlli sani. L'espressione del gene LIPA è risultata lievemente aumentata nei pazienti con NAFLD rispetto ai controlli sani. Inoltre, l'espressione di LIPA e grado di malattia con alcune differenze significative tra i gruppi quando i casi di NAFLD sono stati stratificati in base al punteggio NAS (Fig. 5E).

Tabella 1. Caratteristiche epidemiologiche, cliniche, biochimiche ed istologiche dei pazienti NAFLD.(dati espressi con media \pm deviazione standard)

Variable	Result
Age	51.3 ± 15.3
Sex (M (%)/F (%))	52 (60%)/35 (40%)
BMI (kg/m ²)	30.4 ± 5.4
AST (IU/l)	48.0 ± 25.7
ALT (IU/l)	88.6 ± 69.3
GGT (IU/l)	83.5 ± 67.3
Glycemia (mg/dl)	102.5 ± 26
Diabetes (no (%)/yes (%))	56 (64.4%)/31 (35.6%)
Hypertension (no (%)/yes (%))	46 (52.9%)/41 (47.1%)
Total cholesterol (mg/dl)	203.8 ± 41.6
HDL cholesterol (mg/dl)	48.6 ± 14.0
Triglycerides (mg/dl)	162.4 ± 94.6
Steatosis (0/1/2/3)	0/32/24/31
Lobular inflammation (0/1/2/3)	11/43/33/0
Ballooning (0/1/2)	11/43/33
NASH (no (%)/yes (%))	37 (42.5%)/50 (57.5%)
Fibrosis (0/1/2/3/4)	14/31/17/15/10

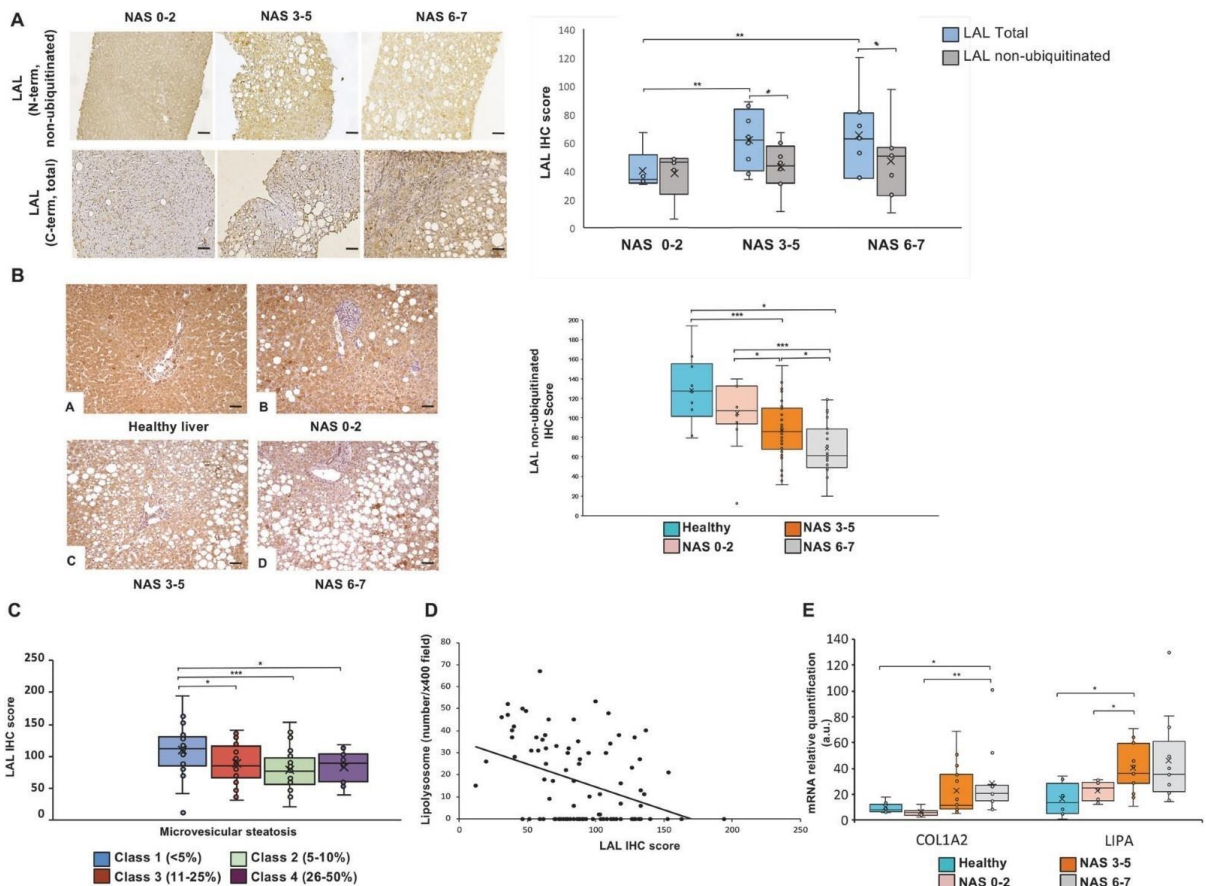


Fig. 5 Il contenuto proteico di LAL è alterato nei pazienti con NAFLD. A Analisi immunoistochimica (IHC) di LAL in 20 pazienti con NAFLD mediante l'uso di diversi anticorpi che riconoscono LAL totale (C-term) o LAL non ubiquitinata (N-term) (pannello di sinistra) e la relativa quantificazione (pannello di destra). B L'espressione IHC di LAL nonubiquitinata è stata valutata in soggetti sani (A) e in pazienti con NAFLD con attività di malattia lieve (NAS 0-2) (B), moderata (NAS 3-5) (C) e grave (NAS 6-7) (D) in base alla NAS. Il punteggio LAL IHC era più basso nei pazienti con NAFLD rispetto ai fegati sani e nei NAS moderati-gravi rispetto

ai NAS lievi (pannello di destra). C, D È stata

Discussione

Nel presente studio abbiamo analizzato in modo esaustivo, in modelli sperimentali in vitro e in vivo di NAFLD e in una coorte di pazienti con diagnosi istologica di NAFLD, l'espressione del gene LAL (LIPA), nonché il contenuto proteico e l'attività enzimatica. Per quanto ne sappiamo, i risultati ottenuti dimostrano per la prima volta che il sovraccarico di grassi negli epatociti determina l'ubiquitinazione di LAL e la sua ridotta localizzazione nel compartimento lisosomiale, con accumulo citoplasmatico di un enzima disfunzionale e conseguente compromissione della sua funzione. Nei pazienti affetti da NAFLD, il grado di riduzione della LAL funzionale è stato associato ad alcuni dei segni distintivi dell'alterata attività della LAL, ossia steatosi microvescicolare e lipolisosomi, e alla gravità della malattia in termini di attività necroinfiammatoria. Nel complesso, questi risultati indicano il possibile contributo di un'alterazione acquisita dell'integrità e della funzione della proteina LAL alla patogenesi della NAFLD. La LAL è l'enzima responsabile dell'idrolisi degli esteri del colesterolo e dei trigliceridi negli epatociti. Pertanto, in condizioni normali, LAL svolge un ruolo centrale nell'omeostasi del colesterolo, prevenendo il sovraccarico lipidico intracellulare. Pertanto, la riduzione dell'attività di LAL è causata dall'aumento dell'accumulo di esteri di colesterolo nei lisosomi. Inoltre, poiché la via lisosomiale-autofagia è strettamente coinvolta nella degradazione dei lipidi epatici [20], la carenza di LAL può compromettere l'efficienza di questo processo e limitare lo smaltimento degli acidi grassi. In effetti, la WD e la CESD sono caratterizzate da una grave steatosi microvescicolare e da una rapida progressione verso l'insufficienza epatica [4].

Sulla base di questo background e grazie alla disponibilità di un nuovo test su DBS per lo screening della carenza di LAL, l'attività LAL nel sangue è stata recentemente esplorata in diverse coorti di pazienti con NAFLD e cirrosi post-NASH, dove è risultata generalmente ridotta [6-10]. Tuttavia, il grado di riduzione dell'attività LAL osservato in questi studi era più lieve di quello osservato nella WD e nella CESD. Inoltre, quando si è indagato [7- 10], non sono state rivelate mutazioni responsabili di una compromissione geneticamente determinata dell'attività della LAL, suggerendo che la funzione della LAL è compromessa su base acquisita, probabilmente associata o determinata dal sovraccarico di grasso epatico. Tuttavia, poiché la maggior parte delle attività lisosomiali testate nella DBS sono di origine leucocitaria, la riduzione dei

globuli bianchi tipica della malattia epatica avanzata potrebbe aver influenzato i risultati. In realtà, una forte correlazione tra attività LAL e conta leucocitaria è stata osservata in tutti gli studi precedenti su pazienti cirrotici [7-9]. Inoltre, nei pazienti cirrotici è stata riscontrata un'associazione ancora più forte tra la funzione LAL e la conta delle piastrine (PLT) [7-9], e recentemente è stata descritta una stretta correlazione tra l'attività LAL nel DBS e quella determinata nella frazione PLT del sangue [11]. Pertanto, nei pazienti con malattia epatica, la verifica dell'espressione e dell'attività della LAL a livello epatico è emersa come essenziale.

Nel presente studio, il sovraccarico di grassi negli epatociti ha indotto una significativa compromissione dell'attività della LAL. Mentre è stato osservato un lieve e transitorio aumento dell'espressione genica di LIPA, i risultati relativi alla quantità di proteina LAL sono stati dicotomici e strettamente dipendenti dall'anticorpo utilizzato. In particolare, l'espressione di LAL è risultata significativamente aumentata se analizzata con anticorpi che riconoscono il termine C della proteina, mentre l'opposto è stato osservato con l'anticorpo diretto verso il termine N dell'enzima. Abbiamo quindi ipotizzato che l'ubiquitinazione di LAL fosse responsabile di questi risultati, mascherando l'epitopo sul termine N dell'enzima e siamo andati oltre, dimostrando un aumento dell'ubiquitinazione della proteina e una maggiore colocalizzazione tra i segnali di LAL e ubiquitina nelle cellule sovraccariche di grasso. In accordo con la nostra ipotesi, il trattamento delle cellule Huh7 con l'inibitore del proteasoma MG132 ha portato a una riduzione dell'attività di LAL e ai risultati dicotomici precedentemente descritti utilizzando gli anticorpi N-term e C-term, suggerendo che il turnover di LAL è sotto il controllo del sistema ubiquitina/proteasoma anche in condizioni fisiologiche. Questa interpretazione è stata ulteriormente corroborata dal saggio di immunoprecipitazione in cellule trattate con HGHL, seguito da un'analisi western blot per la proteina LAL utilizzando l'anticorpo C-term. Le proteine danneggiate possono essere impegnate nell'ubiquitinazione, una modificazione post-traduzionale del gruppo ϵ -amino dei residui di lisina al termine N della proteina, mediata dal legame covalente di una o più proteine ubiquitina [21]. Le proteine ubiquitinate possono poi essere degradate dal sistema del proteasoma [22]. Per comprendere i possibili effetti dell'ubiquitinazione di LAL sulla funzione dell'enzima, è fondamentale ricordare il traffico intracellulare di LAL, tipico degli enzimi lisosomiali. Dopo il clivaggio del peptide segnale nel reticolo endoplasmatico (ER), la LAL nascente nell'ER/Golgi è un pro-peptide di 56 kDa, che può essere secreto o indirizzato al lisosoma attraverso il sistema di traffico del recettore del mannosio-6-fosfato [23]. Nel lisosoma, l'acidità e

le proteasi determinano il clivaggio del pro-peptide per ottenere un peptide maturo e attivo di ≈ 41 kDa [23-26]. L'ubiquitinazione e il targeting al proteasoma possono in qualche modo alterare il normale traffico dell'enzima e questo è coerente con l'aumento della proteina LAL nella frazione citosolica che abbiamo osservato in condizioni di trattamento con HGHL. In particolare, compromettere la localizzazione lisosomiale di LAL significa comprometterne la funzione; infatti, LAL è attiva solo a pH acido, con un'attività massima a pH 4 e un'attività molto ridotta al di sopra di pH 4,5. I risultati ottenuti in vitro sono stati sostanzialmente riprodotti nel modello sperimentale in vivo di topi alimentati con HFD. Inoltre, il

I risultati più rilevanti del modello in vitro e preclinico di NAFLD sono stati confermati nel fegato di pazienti con NAFLD. In particolare, l'espressione di LAL non ubiquitinata/funzionale è risultata inversamente associata ai segni distintivi di una ridotta funzione di LAL e, soprattutto, all'attività della NAFLD.

I nostri risultati sono in gran parte in accordo con quelli riportati da l'unico studio precedente che ha valutato l'espressione e l'attività di LAL nelle cellule epatiche e nel fegato di pazienti con NAFLD [10]. Infatti, utilizzando un anticorpo verso il termine C della proteina, anche Gomaraschi et al. hanno osservato che la diminuzione dell'attività di LAL non era correlata alla diminuzione della proteina LAL sia in cellule HepG2 caricate di grasso che in pazienti con NAFLD. In quello studio, la riduzione dell'attività enzimatica è stata genericamente attribuita al sovraccarico di acidi grassi, senza approfondire i possibili meccanismi. In realtà, Gomaraschi et al. non hanno rilevato alcuna differenza nell'attività LAL epatica tra i pazienti con NASH e quelli con fegato grasso, ma il campione per questa sottoanalisi era limitato a 24 soggetti.

Il presente studio presenta alcune limitazioni. Innanzitutto, non è stato possibile misurare l'attività LAL nel fegato dei pazienti con NAFLD ed è stato possibile analizzare l'espressione genica di LIPA solo in un sottogruppo di essi. Inoltre, l'attività LAL del sangue non era disponibile nei nostri pazienti con NAFLD e non era quindi possibile una correlazione con l'espressione LAL epatica. Nonostante la posizione, questo studio ha alcuni importanti punti di forza. È stato il primo a valutare i possibili meccanismi di compromissione acquisita dell'attività di LAL in condizioni dismetaboliche. Include dati provenienti da modelli sperimentali in vitro e preclinici che sono stati ben ricapitolati in un'ampia coorte di pazienti affetti da NAFLD che comprende tutto lo spettro della malattia, dalla semplice steatosi alla NASH e fino alla cirrosi epatica.

In conclusione, i dati presentati suggeriscono che disturbi nella distribuzione epatica

e nell'attività di LAL, che è un enzima chiave per lo smaltimento del grasso intracellulare, possono svolgere un ruolo nella patogenesi della NAFLD. Si attendono ulteriori studi per confermare i nostri risultati e verificare se l'inibizione dell'ubiquitinazione di LAL o la sostituzione dell'attività di LAL possano avere effetti benefici nel trattamento della NAFLD.

Bibliografia

1. Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, Soran H, Hovingh K, Bertolini S, et al. Lysosomal acid lipase deficiency—an underrecognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis* 2014;235:21–30.
2. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009;458:1131–5.
3. Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR. FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment. *Cell Death Dis.* 2013;4:e861.
4. Porto AF. Lysosomal acid lipase deficiency: diagnosis and treatment of Wolman and cholesteryl ester storage diseases. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014;12:125–32.
5. Hamilton J, Jones I, Srivastava R, Galloway P. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalstat 2. *Clin Chim Acta.* 2012;413:1207–10.
6. Baratta F, Pastori D, Del Ben M, Polimeni L, Labbadia G, Di Santo S, et al. Reduced lysosomal acid lipase activity in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *EBioMedicine* 2015;2:750–4.
7. Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, Piemonte F, Riva E, Porcari A, Vorini F, et al. Lysosomal acid lipase activity is reduced both in cryptogenic cirrhosis and in cirrhosis of known etiology. *PLoS ONE.* 2016;11:e0156113.
8. Tovoli F, Napoli L, Negrini G, D'Addato S, Tozzi G, D'Amico J, et al. A relative deficiency of lysosomal acid lipase activity characterizes non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1134.
9. Angelico F, Corradini SG, Pastori D, Fargion S, Fracanzani AL, Angelico M, et al. Severe reduction of blood lysosomal acid lipase activity in cryptogenic cirrhosis: a nationwide multicentre cohort study. *Atherosclerosis* 2017;262:179–84.
10. Gomaschi M, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Pavanello C, Giorgio E, Da Dalt L, et al. Lipid accumulation impairs lysosomal acid lipase activity in hepatocytes: evidence in NAFLD patients and cell cultures. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2019;1864:158523.
11. Vespasiani-Gentilucci U, D'Amico J, De Vincentis A, Tozzi G, Vorini F, Gallo P, et al. Platelet count may impact on lysosomal acid lipase activity determination in dried blood spot. *Clin Biochem.* 2017;50:726–8.
12. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41:1313–21.
13. Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic

steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:2467–74.

14. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese RV. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14:343–55.

15. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol.* 2008;14:193–9.

16. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS ONE.* 2014;9:e96801.

17. Potts SJ, Krueger JS, Landis ND, Eberhard DA, David Young G, Schmechel SC, et al. Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue. *Lab Invest.* 2012;92:1342–57.

18. Lettieri-Barbato D, Cannata SM, Casagrande V, Ciriolo MR, Aquilano K. Timecontrolled fasting prevents aging-like mitochondrial changes induced by persistent dietary fat overload in skeletal muscle. *PLoS ONE.* 2018;13:e0195912.

19. Carotti S, Aquilano K, Zalfa F, Ruggiero S, Valentini F, Zingariello M, et al. Lipophagy Impairment Is Associated With Disease Progression in NAFLD. *Front Physiol.* 2020;11:850.

20. Carotti S, Aquilano K, Valentini F, Ruggiero S, Alletto F, Morini S, et al. An overview of deregulated lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease with special focus on lysosomal acid lipase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2020;319: G469–80.

21. Ciechanover A. N-terminal ubiquitination. *Methods Mol Biol.* 2005;301:255–70.

22. Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitinproteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:679–90.

23. Zschenker O, Oezden D, Ameis D. Lysosomal acid lipase as a preproprotein. *J Biochem.* 2004;136:65–72.

24. Braulke T, Bonifacino JS. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:605–14.

25. Sando GN, Rosenbaum LM. Human lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase. Purification and properties of the form secreted by fibroblasts in microcarrier culture. *J Biol Chem.* 1985;260:15186–93.

26. Ameis D, Merkel M, Eckerskorn C, Greten H. Purification, characterization and molecular cloning of human hepatic lysosomal acid lipase. *Eur J Biochem.* 1994;219:905–14.

27. Burton BK, Emery D, Mueller HW. Lysosomal acid lipase in cultivated fibroblasts: characterization of enzyme activity in normal and enzymatically deficient cell lines. *Clin Chim Acta.* 1980;101:25–32.

Studio 2: La compromissione della lipofagia è associata ad una progressione della NAFLD

Introduzione

Nel presente studio abbiamo valutato l'autofagia sia in modelli *in vitro* e *in vivo* di NAFLD sia nel fegato di pazienti NAFLD. I risultati presentati confermano l'idea che la lipofagia/autofagia sia compromessa nella NAFLD in misura strettamente correlata alla gravità e alla progressione della malattia.

Materiali e metodi

Per quanto riguarda i materiali e metodi consultare la sezione “materiali e metodi generale”

Pazienti

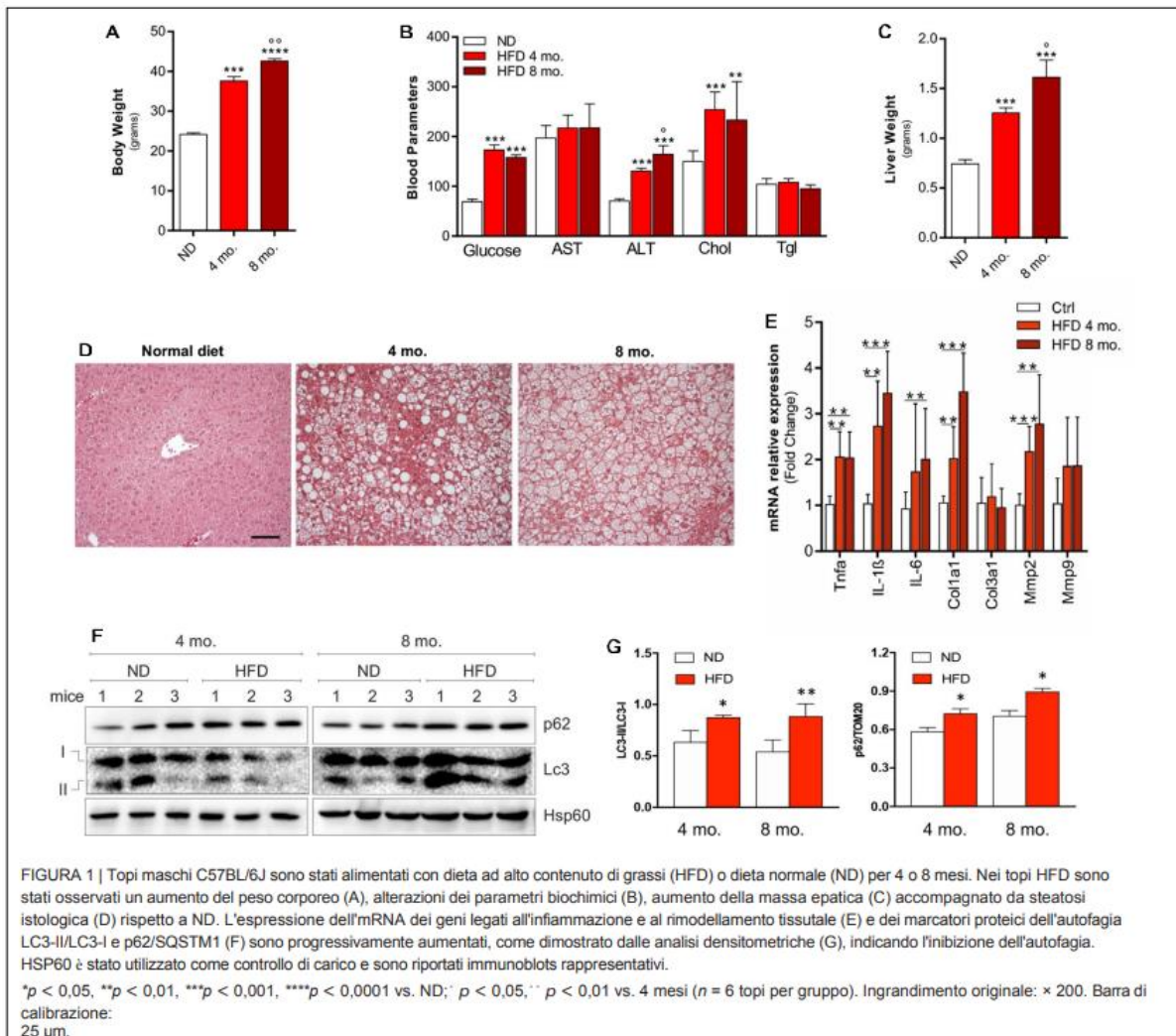
Sono stati inclusi nello studio 59 pazienti sottoposti a biopsia epatica per sospetta NASH presso l'Unità di Epatologia del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma e il cui tessuto epatico incluso in paraffina era disponibile per ulteriori analisi. È stata confermata l'assenza di anamnesi di assunzione di alcolici >20 gr/die se donna e >30 gr/die se uomo o di uso di farmaci noti per indurre danno epatico, e che siano stati ottenuti i seguenti risultati: anticorpi anti-HCV e HBsAg negativi; anticorpi antinucleo (ANA) < 1:80 e anticorpi anti- mitocondrio (AMA), anti-muscolo liscio (ASMA) e anti- microsomiali epatici e renali (anti-LKM) negativi; saturazione della transferrina e livelli sierici di ceruloplasmina e alfa-1 antitripsina normali. Tutti i pazienti avevano firmato un consenso informato in cui veniva specificato il possibile utilizzo di parte del loro tessuto epatico a scopo di ricerca. Il protocollo dello studio era conforme alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki del 1975 ed è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università Campus Bio-Medico di Roma. Le biopsie epatiche di dieci pazienti con transaminasi normali, negativi ai test per HBsAg e anticorpi anti-HCV e che presentavano un fegato istologicamente normale con meno del 5% di steatosi sono state incluse nello studio come gruppo di controllo per le valutazioni istologiche e immunoistochimiche. Questi campioni provenivano da pazienti sottoposti a chirurgia epatica per tumori metastatici (il tessuto epatico per l'immunoistochimica era ad almeno 0,5 cm dalla lesione metastatica).

Risultati

Progressiva compromissione della lipofagia in modelli cellulari e murini di steatosi epatica

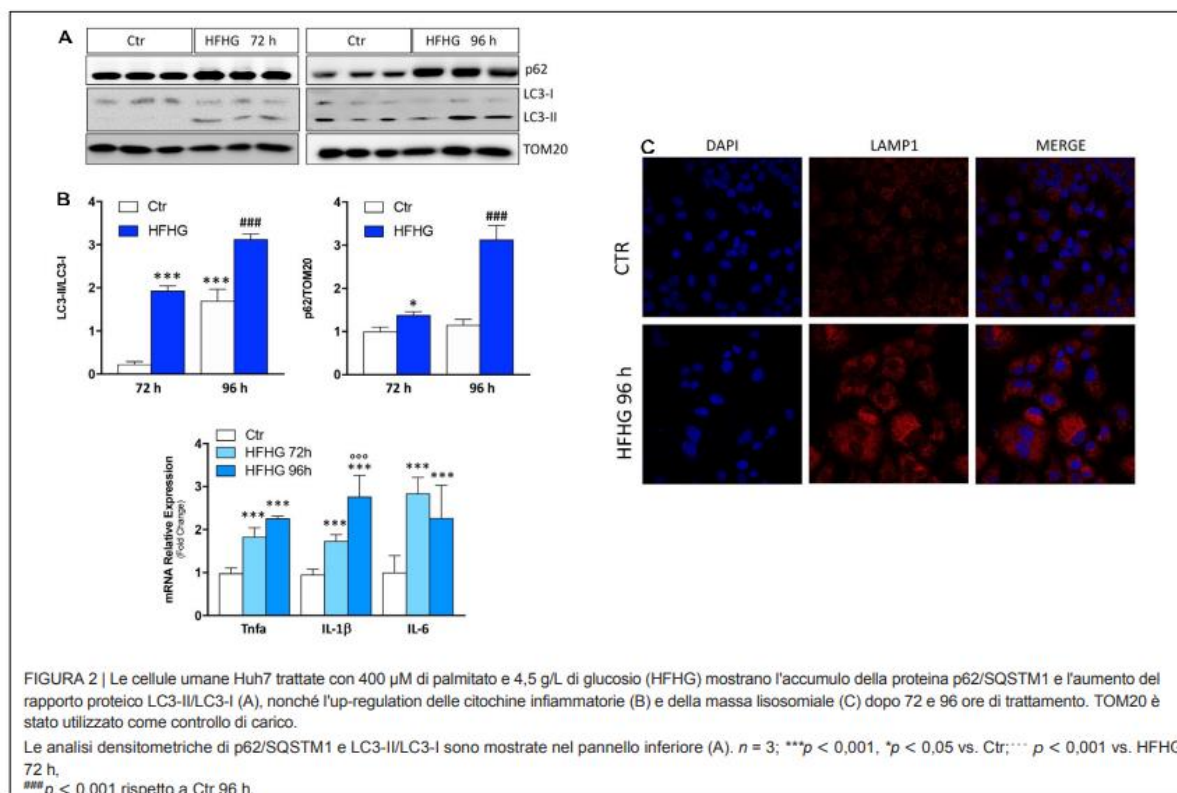
Per generare un modello preclinico di NAFLD, i topi C57BL/6J sono stati alimentati con HFD per 4 o 8 mesi. I topi alimentati con dieta normale (ND) sono serviti da controllo. Come previsto, i topi alimentati con HFD hanno subito un progressivo aumento del peso corporeo (Figura 1A) e un'alterazione dei parametri biochimici, come l'aumento della glicemia, del colesterolo e delle ALT (Figura 1B). Sono stati

osservati anche un aumento del peso del fegato (Figura 1C) e l'acquisizione di un fenotipo steatotico (Figura 1D), in associazione a una maggiore espressione di citochine infiammatorie (IL-6, TNF- α , IL-1 β) e di marcatori di fibrosi (Col1a1, Mmp2) (Figura 1E), ricapitolando nel complesso la comparsa di un fenotipo clinico simile alla NAFLD. A livello proteico, si è notato un aumento significativo del rapporto p62/SQSTM1 e LC3-II/LC3-I rispetto al gruppo ND, più marcato dopo 8 mesi rispetto a 4 mesi di trattamento HFD (Figure 1F,G).



Risultati simili sono stati osservati nel modello in vitro di sovraccarico di lipidi epatocellulare, in particolare le cellule Huh7 sono state coltivate in DMEM ad alto contenuto di glucosio integrato con 400 μM di acido palmitico (high-fat/high-glucose, HFHG). A partire da 72 ore di trattamento, è stata riscontrata una up-regulation degli mRNA delle citochine (IL-6, TNF- α , IL-1 β), è stato osservato un aumento della proteina p62/SQSTM1 e del rapporto LC3-II/LC3-I (Figure 2A,B), nonché un accumulo di massa lisosomiale all'analisi confocale con il marcatore lisosomiale LAMP1 (Figura 2C),

suggerendo l'inibizione dell'autofagia e la reazione lisosomiale.



Aumento dei lipolisosomi e alterazione del catabolismo lipidico nei pazienti con NAFLD

Sulla base dei risultati ottenuti nei modelli sperimentali di NAFLD, siamo passati a una coorte di 59 pazienti con NAFLD. Le principali caratteristiche di questi pazienti sono riportate nella Tabella 1.

TABELLA 1 Caratteristiche biologiche, antropometriche e biochimiche dei pazienti con NAFLD.

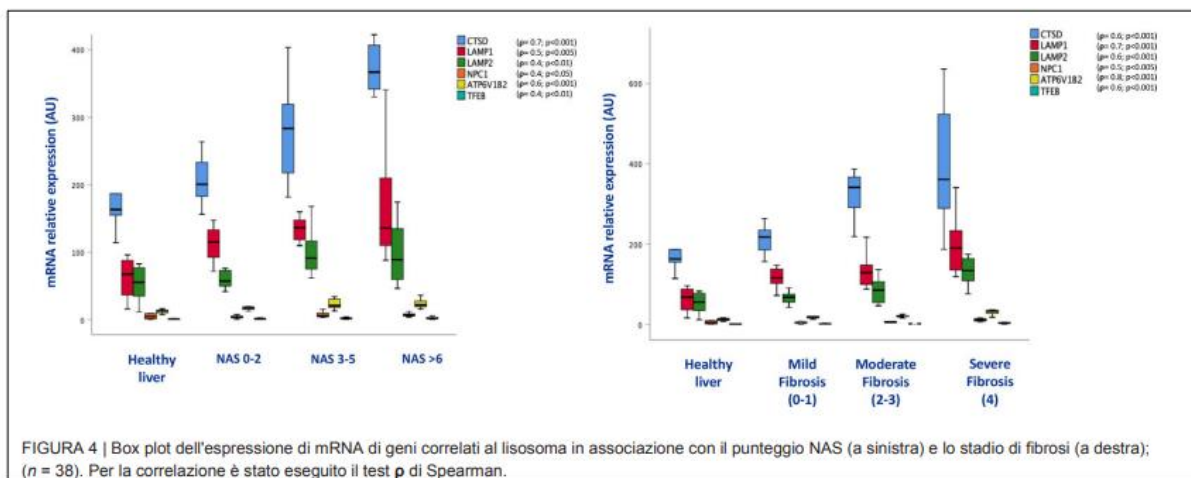
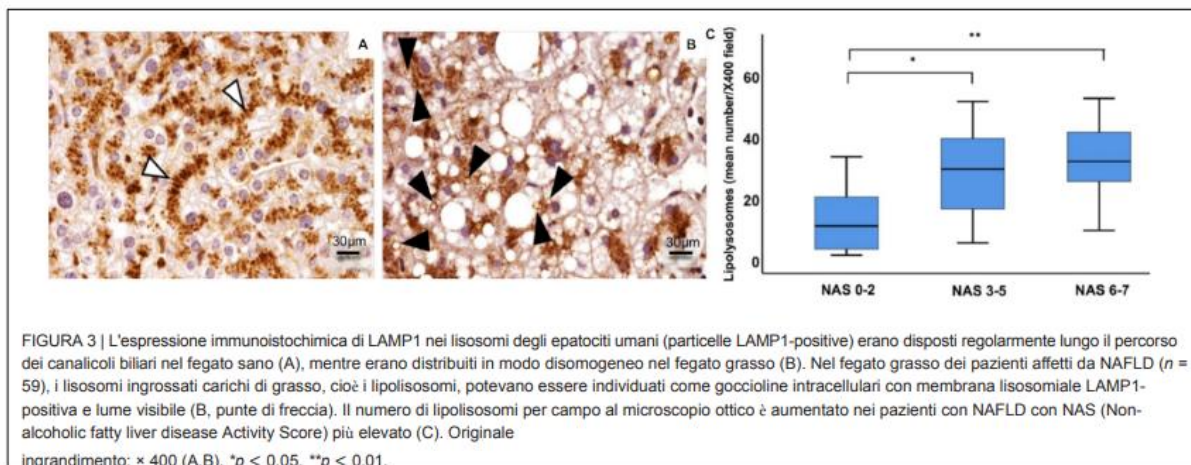
N	59
Età (anni)	49.9 \pm 14.8
Sesso (M / F)	35 / 24
IMC (kg/m ²)	29.4 \pm 4.5
AST (valore/u.n.l.)	1.3 \pm 0.9
ALT (valore/u.n.l.)	2,2 \pm 1,9
GGT (valore/u.n.l.)	2,1 \pm 2,0
Glicemia (mg/dL)	102,3 \pm 25,3
Colesterolo totale (mg/dL)	204,3 \pm 48,6
Colesterolo HDL (mg/dL)	47,4 \pm 12,6
Trigliceridi (mg/dL)	170,9 \pm 117,4
Diabete (Si/No)	25 / 34
Ipertensione (Si/No)	29 / 30

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

Con l'immunoistochimica per LAMP1, i lisosomi dei soggetti sani sono stati rilevati soprattutto in prossimità del polo biliare dell'epatocita e non sono stati rilevati vacuoli

LAMP1-positivi con lumi visibili. Nei pazienti con NAFLD, l'architettura del compartimento lisosomiale è stata completamente stravolta. In particolare, i lisosomi non erano più localizzati al polo biliare e si osservavano vacuoli LAMP1-positivi all'interno degli epatociti. Inoltre, il numero di lisosomi carichi di LD, i cosiddetti lipolisosomi, correlava positivamente con il punteggio NAS ($p = 0,375$, $p < 0,005$) (Figura 3).

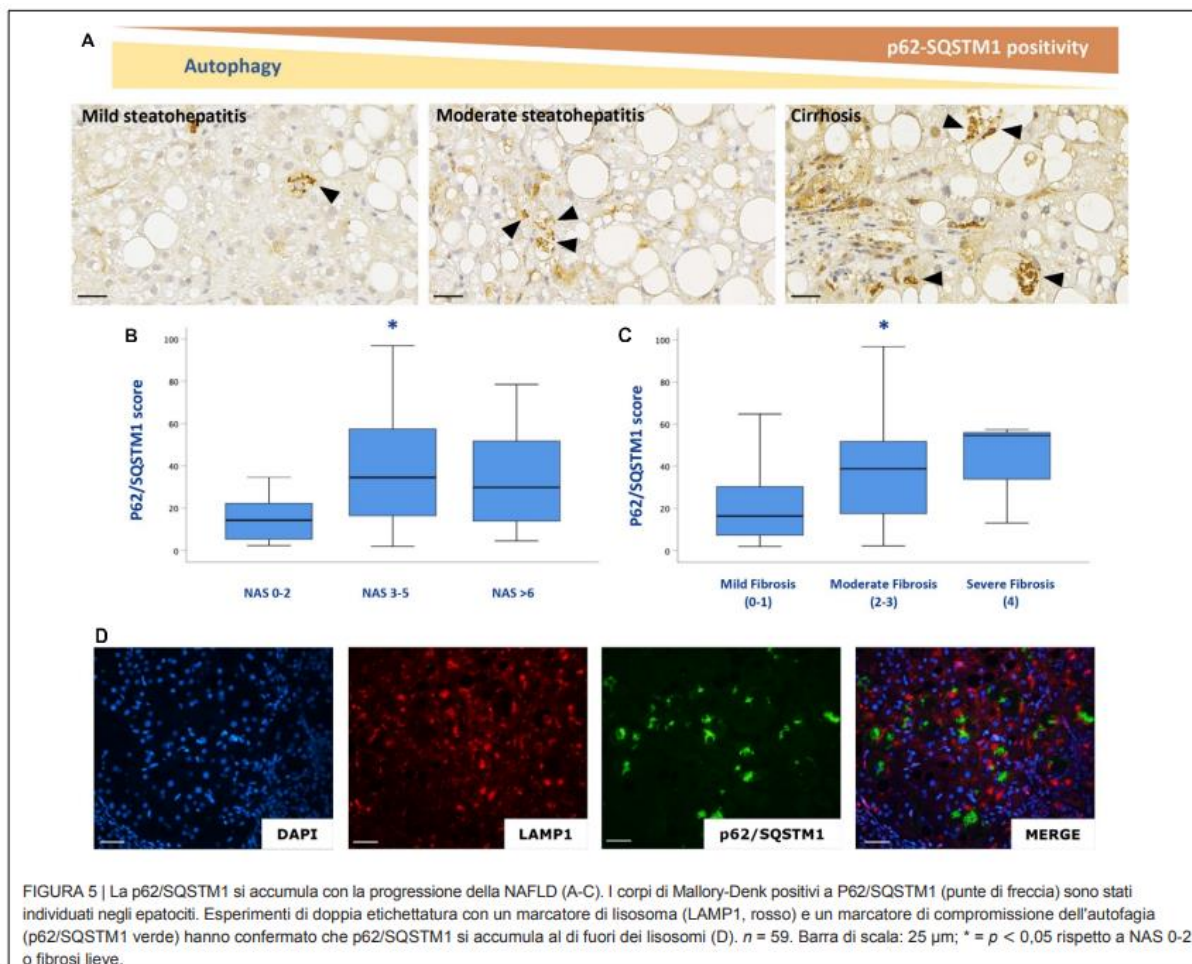
L'aumento della massa lisosomiale è stato supportato da un aumento dei livelli di espressione dei geni lisosomiali (CTSD, LAMP1, LAMP2, NPC1, ATP6V1B2, TFEB), i cui livelli di espressione erano correlati con il punteggio NAS ($r = 0,7$; $p < 0,001$; $r = 0,5$; $p < 0,005$; $r = 0,4$; $p < 0,01$; $r = 0,4$; $p < 0,05$; $r = 0,6$); $p < 0,001$; $r = 0,5$; $p < 0,005$; $r = 0,4$; $p < 0,01$; $r = 0,4$; $p < 0,05$; $r = 0,6$; $p < 0,001$; $r = 0,4$; $p < 0,01$, rispettivamente), nonché con lo stadio di fibrosi ($r = 0,6$; $p < 0,001$; $r = 0,7$; $p < 0,001$; $r = 0,6$; $p < 0,001$; $r = 0,5$; $p < 0,005$; $r = 0,8$; $p < 0,001$; $r = 0,6$; $p < 0,001$, rispettivamente) (Figura 4).



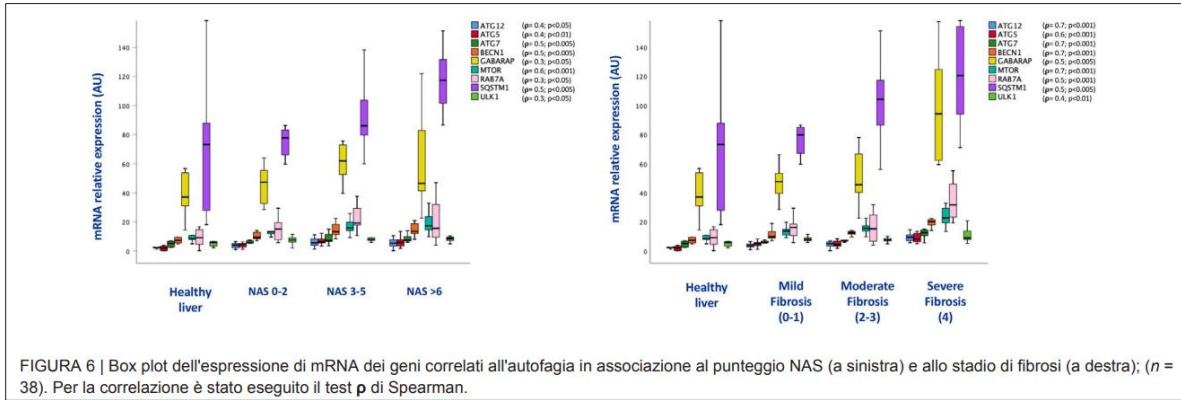
Autofagia compromessa nei pazienti con NAFLD

Coerentemente con i risultati ottenuti nei topi, i livelli di proteina p62/SQSTM1 e la

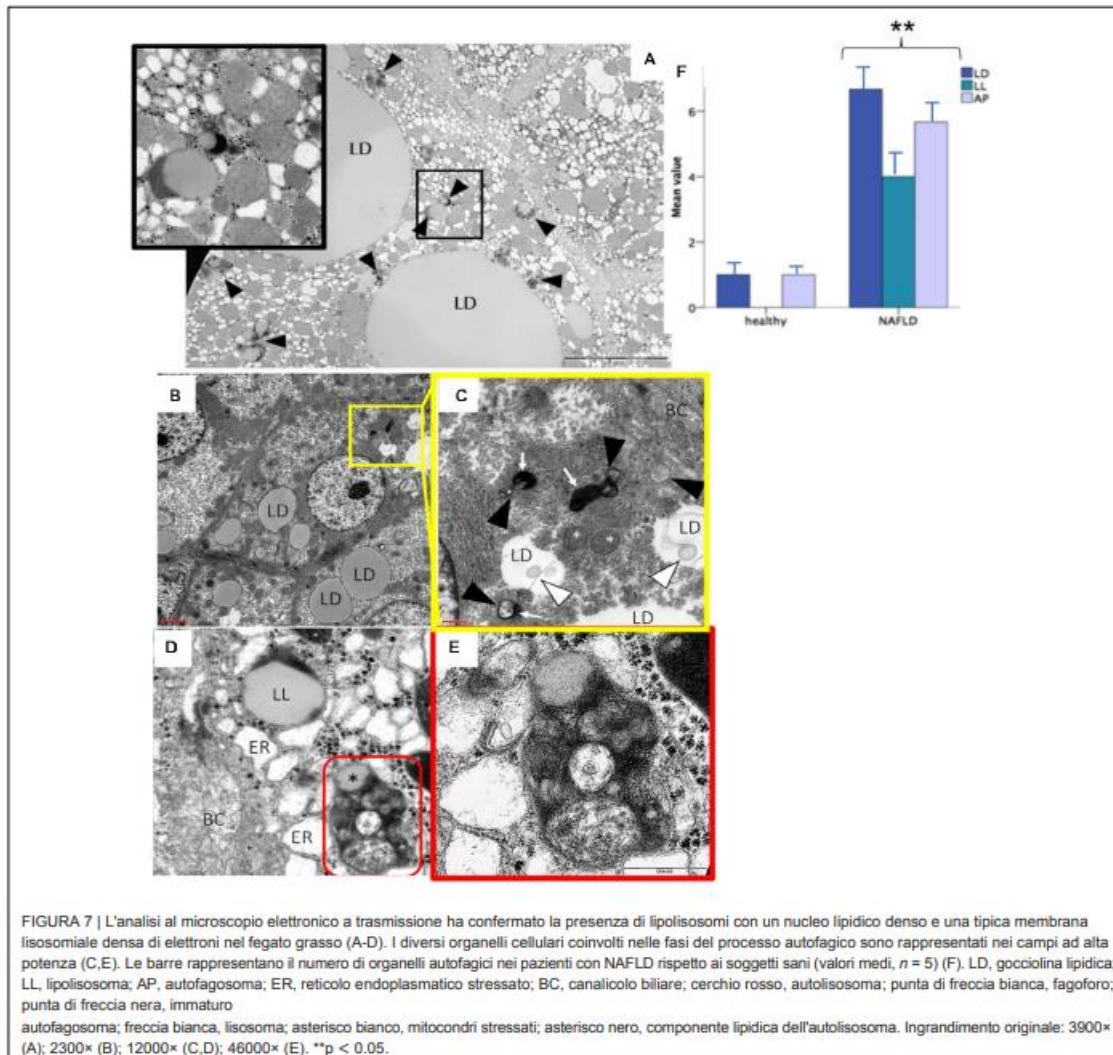
fibrosi erano significativamente aumentati nel fegato dei pazienti con NAFLD. In particolare, la positività immunohistochimica di p62/SQSTM1 è aumentata con la progressione della fibrosi, accumulandosi negli epatociti nei cosiddetti corpi di Mallory-Denk e indicando il blocco dell'autofagia. Inoltre, mediante immunofluorescenza, sono stati osservati aggregati di p62/SQSTM1 al di fuori dei lisosomi, suggerendo un'alterazione anche delle prime fasi dell'autofagia (Figura 5).



Inoltre, sono state rilevate correlazioni significative tra i livelli di espressione dei geni correlati all'autofagia (ATG12, ATG5, ATG7, BECN1, GABARAP, MTOR, RAB7A, P62/SQSTM1, ULK1) e il punteggio NAS ($r = 0,4$; $p < 0,05$; $r = 0,4$; $p < 0,01$; $r = 0,5$; $p < 0,005$; $r = 0,5$; $p < 0,005$; $r = 0,3$; $p < 0,05$; $r = 0,6$; $p < 0,001$; $r = 0,3$; $p < 0,05$; $r = 0,5$; $p < 0,005$; $r = 0,3$; $p < 0,05$, rispettivamente) e lo stadio di fibrosi ($r = 0,7$; $p < 0,001$; $r = 0,6$; $p < 0,001$; $r = 0,7$; $p < 0,001$; $r = 0,7$; $p < 0,001$; $r = 0,5$; $p < 0,005$; $r = 0,7$; $p < 0,001$; $r = 0,5$); $p < 0,001$; $r = 0,5$; $p < 0,005$; $r = 0,4$; $p < 0,01$, rispettivamente) (Figura 6).



La valutazione dell'autofagia è stata eseguita anche a livello ultrastrutturale in biopsie umane trattate per l'esperimento TEM. Nei soggetti con NAFLD è stata riscontrata una maggiore quantità di goccioline lipidiche, lipolisosomi e autofagosomi rispetto ai soggetti sani ($p < 0,05$) (Figura 7).



Discussione

Nel presente studio abbiamo dimostrato che il sovraccarico cronico di lipidi attraverso l'HFD nei topi e il trattamento con acido palmitico in una linea cellulare derivata da epatociti umani, rispettivamente, portano a un'inibizione dell'autofagia dipendente dal tempo. In particolare, nei topi alimentati con HFD, la progressione delle caratteristiche che simulano la NAFLD era fortemente associata al grado di inibizione dell'autofagia (aumento di p62/SQSTM1 e LC3-II/LC3-I). Inoltre, abbiamo dimostrato per la prima volta la presenza di lipolisosomi negli epatociti di pazienti affetti da NAFLD sia con la microscopia ottica che con quella elettronica. Nella NAFLD, i lipolisosomi rappresentano probabilmente la progressiva compromissione della funzione lisosomiale, e in particolare della capacità delle idrolasi lisosomiali di catabolizzare i grassi. Ciò è supportato dalla correlazione tra l'aumento del numero di lipolisosomi e l'attività della malattia in termini di necroinfiammazione.

L'up-regulation di geni lisosomiali, come CTSD, LAMP1, LAMP2, NPC1, ATP6V1B2, TFEB, che suggerisce un aumento della massa lisosomiale complessiva, deve essere interpretata come un tentativo di contrastare la disfunzione lisosomiale. Tra questi geni, in particolare, la CTSD è già stata correlata all'infiammazione e all'alterazione del metabolismo lipidico nella NAFLD. Houben et al. (2017) hanno dimostrato che l'inibizione della CTSD nei topi determina una riduzione dei livelli di colesterolo e trigliceridi nel fegato. Il gruppo di Liao ha dimostrato che la CTSD è up-regolata quando il colesterolo si accumula nei compartimenti lisosomiali in un modello NPC1 knock-out, dimostrando un aumento della CTSD quando i lisosomi vengono inglobati (Liao et al., 2007). Nel presente studio, l'espressione di CTSD è risultata più elevata nei pazienti con NAFLD rispetto ai controlli ed è stata osservata una correlazione diretta tra l'espressione di CTSD e la NAS e la fibrosi.

È stato dimostrato che l'inglobamento dei lisosomi da parte dei lipidi inibisce il turnover degli autofagosomi e diversi studi sulle malattie da accumulo lisosomiale hanno dimostrato un'alterazione della fusione tra autofagosomi e lisosomi grassi che porta a una clearance autofagica difettosa (Fukuda et al., 2006; Settembre et al., 2008; Sarkar et al., 2013). Coerentemente con ciò, come già descritto (Fukuo et al., 2014), abbiamo confermato un'aumentata espressione di p62/SQSTM1 mRNA e proteina nel fegato dei pazienti con NAFLD, significativamente associata ad attività della malattia e stadio di fibrosi. L'aumento di p62/SQSTM1 suggerisce che i cargos autofagici non possono fondersi con i lisosomi per essere degradati, portando ad aggregati citosolici di p62/SQSTM1; di conseguenza, l'esperimento di doppia etichettatura ha rivelato che gli ammassi di p62/SQSTM1 sono staccati dalla struttura lisosomiale. Inoltre, nei

pazienti con NAFLD, l'analisi TEM ha rivelato un aumento del numero di autofagosomi e lipolisosomi, che probabilmente rappresentano l'espansione compensatoria di un macchinario autofagico mal funzionante. Infatti, l'espressione di diversi geni coinvolti nell'autofagia (Atg7, Atg5, GABARAB e Rab7) è risultata significativamente correlata alla NAS e allo stadio di fibrosi. Si tratta di proteine chiave per la formazione delle vescicole autofagiche e la maturazione dei lisosomi, il cui deficit è risultato in grado di sopprimere il flusso autofagico e di compromettere la fusione autofagosoma-lisosoma (Xu et al., 2013). Inoltre, l'autofagia potrebbe esercitare un ruolo antifibrogeno poiché promuove la sopravvivenza degli epatociti e l'apoptosi degli epatociti è un evento centrale nel processo fibrogeno (Ni et al., 2014; Ruart et al., 2019; Hammoutene et al., 2020).

In conclusione, nel presente studio abbiamo osservato un'alterazione dell'autofagia nella NAFLD, con conseguente compromissione della degradazione dei lipidi. La compromissione dell'autofagia sembra essere un fattore cruciale che determina la progressione clinica della NAFLD. Individuare i marcatori molecolari di compromissione della lipofagia potrebbe aiutare a identificare i pazienti a rischio di progressione. In particolare, in questo studio, LAMP1-positivo I vacuoli con lume visibile, noti come lipolisosomi, sono stati identificati come caratteristica morfologica di alterata lipofagia. Si attendono chiaramente ulteriori studi per verificare se la quantificazione dei lipolisosomi possa essere un metodo praticabile e strumento riproducibile per valutare la gravità della NAFLD e la sua propensione alla progressione.

Bibliografia

Fukuda, T., Ewan, L., Bauer, M., Mattaliano, R. J., Zaal, K., Ralston, E., et al. (2006). Dysfunction of endocytic and autophagic pathways in a lysosomal storage disease. *Ann. Neurol.* 59, 700–708. doi: 10.1002/ana.20807

Fukuo, Y., Yamashina, S., Sonoue, H., Arakawa, A., Nakadera, E., Aoyama, T., et al. (2014). Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res.* 44, 1026–1036. doi: 10.1111/hepr.12282

Hammoutene, A., Biquard, L., Lasselin, J., Tanguy, M., Loyer, X., Jules, M., et al. (2020). A defect in endothelial autophagy occurs in patients with non-alcoholic steatohepatitis and promotes inflammation and fibrosis. *J. Hepatol.* 2020 72, 528–538. doi: 10.1016/j.jhep.2019.10.028

Houben, T., Oligschlaeger, Y., Hendriks, T., Bitorina, A. V., Walenbergh, S. M. A., Van Gorp, P. J., et al. (2017). Cathepsin D regulates lipid metabolism in murine steatohepatitis. *Sci. Rep.* 7:3494. doi: 10.1038/s41598-017-03796-5

Liao, G., Yao, Y., Liu, J., Yu, Z., Cheung, S., Xie, A., et al. (2007). Cholesterol accumulation is associated with lysosomal dysfunction and autophagic stress in *Npc1*^{-/-} mouse brain. *Am. J. Pathol.*

171, 962–975. doi: 10.2353/ajpath.2007. 070052

Ni, H. M., Woolbright, B. L., Williams, J., Bryan, C., Wei, C., James, L. P., et al. (2014). Nrf2 promotes the development of fibrosis and tumorigenesis in mice with defective hepatic autophagy. *J. Hepatol.* 61, 617–625. doi: 10.1016/j.jhep. 2014.04.043

Ruart, M., Chavarria, L., Campreciós, G., Nuria, S. H., Bosch, J., Scott, L. F., et al. (2019). Impaired endothelial autophagy promotes liver fibrosis by aggravating the oxidative stress response during acute liver injury. *J. Hepatol.* 70, 458–469. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.015

Sarkar, S., Carroll, B., Buganim, Y., Maetzel, D., Ng, A. H. M., Cassady, J. P., et al. (2013). Impaired autophagy in the lipid-storage disorder niemann-pick type C1 disease. *Cell Rep.* 5, 1302–1315. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.042

Settembre, C., Fraldi, A., Jahreiss, L., Spampinato, C., Venturi, C., Medina, D., et al. (2008). A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum. Mol. Genet.* 17, 119–129. doi: 10.1093/hmg/ddm289

Xu, X., Hua, Y., Sreejayan, N., Zhang, Y., and Ren, J. (2013b). Akt2 knockout preserves cardiac function in high-fat diet-induced obesity by rescuing cardiac autophagosome maturation. *J. Mol. Cell Biol.* 5, 61–63. doi: 10.1093/jmcb/ mjs055

Studio 3. Interazioni tra colestasi e lipofagia nei pazienti NAFLD

Introduzione

Recenti evidenze in ambito clinico hanno dimostrato che un pattern colestatico nei pazienti con NAFLD predice una prognosi sfavorevole ed è associato a specifici aspetti morfologici e di espressione genica. Da un punto di vista fisiopatologico si è evidenziato che la lipofagia ovvero la degradazione selettiva delle gocce lipidiche da parte dei lisosomi, è essenziale per la regolazione dei livelli di lipidi. Tale processo autofagico può essere downregolato dagli acidi biliari liberi che si accumulano nell'epatocita in corso di colestasi intraepatica (CholeSTOPhagy).

Con il seguente studio abbiamo valutato la relazione tra autofagia e colestasi in pazienti NAFLD. la relazione tra i marcatori sierologici di colestasi e autofagia. Inoltre, valutiamo il livello di espressione di un pannello di geni correlati al metabolismo dei lipidi, all'escrezione della bile e alla lipofagia in relazione alle caratteristiche istomorfologiche nei pazienti con NAFLD.

Inoltre ci siamo soffermati sull'espressione delle pompe di efflusso di colesterolo nel canalicolo biliare ABCG5 e ABCG8 (vedi figura 1).

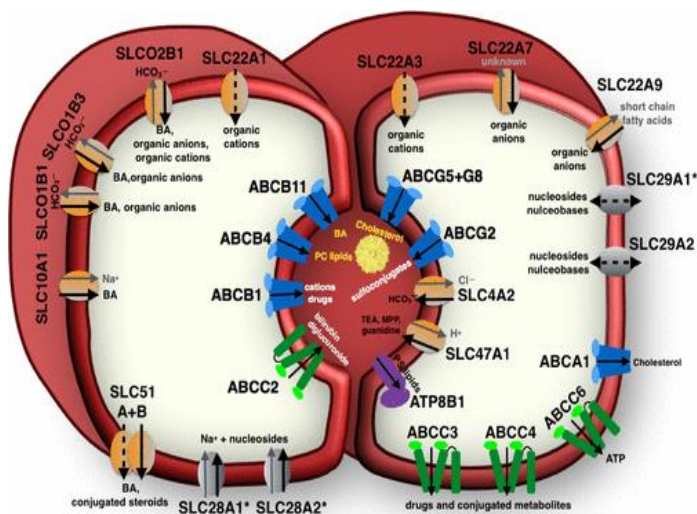


Figura 1. Schema di due epatociti che formano un canalicolo biliare. Sono evidenziati tutti i trasportatori localizzati nella membrana plasmatica degli epatociti umani. I trasportatori ABC, ad eccezione della sottofamiglia ABCC (colorata in verde), sono illustrati in blu. ABCB4, ABCB11 e ABCG5/G8 traslocano i composti che formano una micella mista (giallo chiaro) nel canalicolo biliare. (adattato da Kroll T. Chem. Rev. 2021)

Metodi

Il seguente studio è uno studio osservazionale descrittivo su 28 pazienti adulti con NAFLD. Tutti i pazienti arruolati sono stati sottoposti a biopsia epatica ed hanno

eseguito esami ematochimici. I pazienti sono stati classificati in due gruppi in base al pattern di enzimi epatici elevati utilizzando il seguente rapporto come già utilizzato in letteratura: $R = ((ALT/ALT\ ULN)/(ALP/ALP\ ULN))$ (Pennsisi et al. *Liver Int* 2022). Sono quindi stati evidenziati due gruppi: un gruppo prevalentemente colestatico (gruppo C) con $R < 2$ e un gruppo con profilo epatocellulare (gruppo H) con $R > 2$.

Le caratteristiche istomorfologiche sono state valutate al microscopio ottico con colorazioni standard per graduare l'attività della malattia (NAS) e lo stadio di fibrosi.

Analisi immunoistochimica

Ogni caso è stato analizzato mediante immunoistochimica per la CK7 un marcatore biliare e p62/SQSTM1 (ab56416, titolo 1:100, monoclonale di topo, Cambridge, Regno Unito), un marcatore di compromissione autofagica. L'immunoistochimica è stata eseguita su sezioni ottenute da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina. Le sezioni colorate con l'immunoistochimica sono state scansionate con l'Hamamatsu NanoZoomer 2.0-RS. La CK7 è stata utilizzata per valutare il compartimento delle cellule progenitrici epatiche (HPC), contando le small cell CK7-positive nell'area periportale del lobulo ed esprimendole come numero per campo. Le cellule erano presenti come cellule singole, stringhe che rappresentavano canalicoli di Hering e dotti biliari di reazione duttulare. Le cellule contate erano più piccole degli epatociti normali e mostravano una colorazione citoplasmatica. I dotti biliari interlobulari (IBD) sono stati contati separatamente in quanto formanti elementi del lume costituiti da cellule CK7-positive. Gli epatociti morfologicamente tipici con citoplasma anti-CK7-positivi sono stati considerati epatociti intermedi (IH) e sono stati valutati separatamente. Per ogni caso, i valori medi delle cellule progenitrici epatiche, dotti biliari interlobulari ed epatociti intermedi sono stati ottenuti contando i tre campi a 10 ingrandimenti con la più alta intensità di colorazione antiCK7.

L'immunoistochimica è stata valutata utilizzando un plugin open source IHC Profiler per Image J (Varghese et al., 2014).

Risultati

Sono stati analizzati i dati di 27 pazienti con NAFLD. Abbiamo escluso i pazienti (N=6) con grado di fibrosi severo (fibrosi>3). Caratteristiche antropometriche e cliniche dei pazienti: l'età media era di $48,8 \pm 13,1$; BMI (Kg/m²) $30,5 \pm 3,4$; AST

(AST/AST ULN) $1,67 \pm 0,89$, ALT $1,9 \pm 1,3$, ALP $2,07 \pm 1,46$.

Le biopsie sono state classificate in steatosi semplice N = 10 [37%]; NASH N = 15 [55%], e borderline, zona 3 (N = 2). Un grado di fibrosi è stato osservato in 22/27 campioni biopistici. I dati antropometrici e sierologici sono riportati nella tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche antropometriche e cliniche pazienti NAFLD	
Età	48.8 ± 13.1
Sesso [M (%) / F (%)]	11 (51%) / 10 (49%)
BMI (Kg/m ²)	30.5 ± 3.4
AST (AST/AST ULN)	48.0 ± 25.7
ALT (ALT/ALT ULN)	88.6 ± 69.3
GGT (GGT/GGT ULN)	83.5 ± 77.3
Rapporto colestasi (ALT/ALT ULN) / (GGT /GGT ULN) <2	8 (29%)
Glicemia (mg/dL)	102.5 ± 26.0
Diabete [No (%) / Si (%)]	16 (65%) / 10 (35%)
Ipertensione [No (%) / si (%)]	14 (54%) / 12 (46%)
Colesterolo totale (mg/dL)	200.8 ± 37.6
HDL (mg/dL)	46.8 ± 10.0
Trigliceridi (mg/dL)	140.4 ± 40.9

L'impairment autofagico correla con l'aumento dei segni morfologici di colestasi ma non con quelli sierologici di colestasi

La compromissione dell'autofagia è stata associata ad alterazioni legate alla colestasi nel compartimento biliare: è stato osservato un aumento della reazione dutturale e l'espansione di epatociti intermedi. Si è infatti osservato un aumento

parallelo del marcatore di compromissione dell'autofagia p62/SQSTM1 e delle cellule progenitrici epatiche (HPCs) e delle degli epatociti intermedi (IH)($R=0,392$, $p=0,016$; $R=0,370$, $p=0,026$).

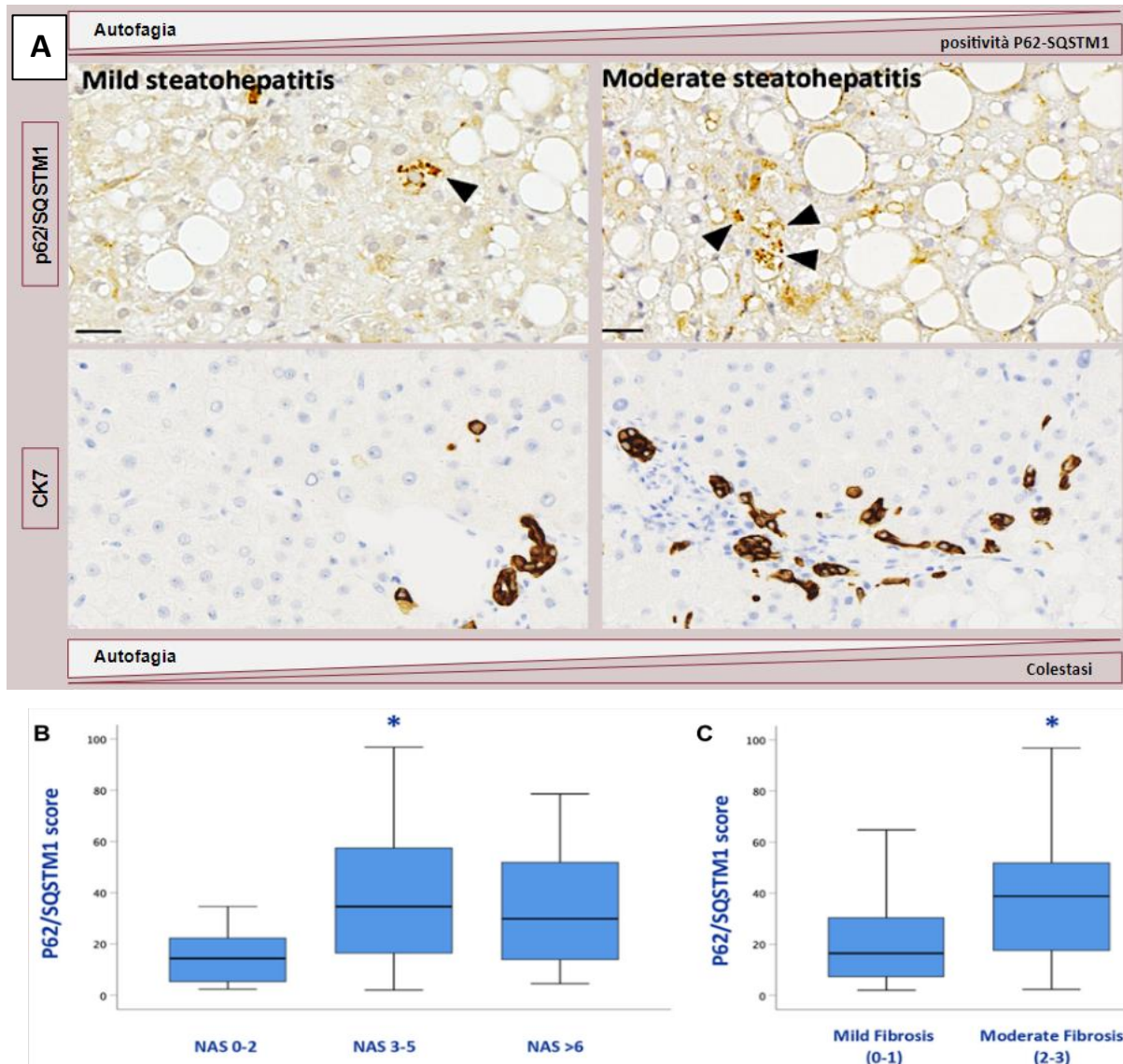


Figura 2. Pannello A. L'espressione immunoistochimica di p62 è aumentata nei gradi più severi di NAFLD evidenziando un blocco del processo autofagico. L'impairment autofagico è correlato all'aumento delle HPC e degli IH e quindi alla colestasi nei pazienti NAFLD. Pannello B. L'espressione di p62 aumenta nella NASH rispetto a pazienti con steatosi semplice e nei gradi di fibrosi moderata rispetto a quelli con fibrosi lieve.

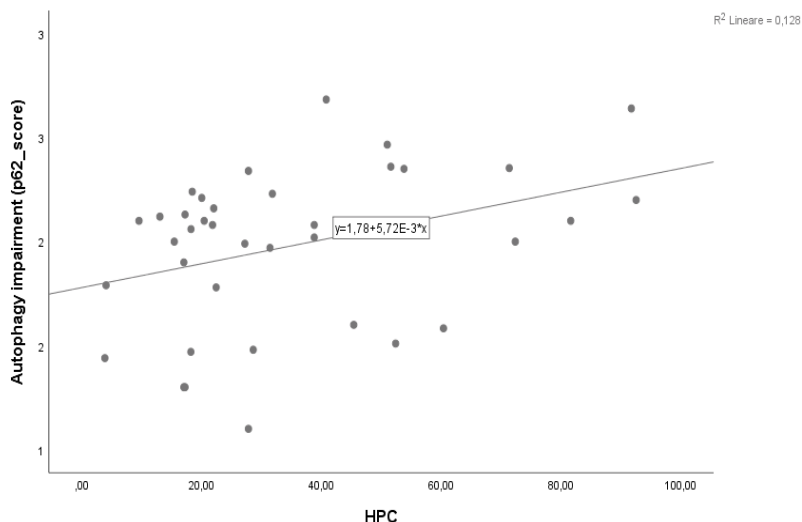


Figura 3. Il numero di HPC aumenta in maniera direttamente proporzionale e statisticamente significativa con l'aumento dell'espressione del marker di impairment autofagico p62 nei pazienti NAFLD.

Non è stata riscontrata invece alcuna differenza significativa tra p62/SQSTM1 e pattern sierologico (H di KW=1,63; $p=0,44$).

L'impairment autofagico a livello immunoistochimico correla con l'espressione genica di mRNA coinvolti nella cascata autofagica ma non con l'mRNA delle pompe di efflusso biliari P62/SQSTM1 è direttamente correlato a diversi mRNA coinvolti nella cascata autofagica (cfr. tabella 2) ma non è stata trovata alcuna correlazione tra p62/SQSTM1 e le pompe di efflusso della bile (ABCG5 e ABCG8). Tuttavia si è rilevata un'associazione significativa tra p62/SQSTM1 e un aumento dell'espressione dei di NR1H3 e NR1H4 ($R=0,512$, $p=0,009$; $R=0,411$, $p=0,041$).

	p62/SQSTM1 (n. 25)	Pattern sierologico (gruppo colestatico vs gruppo epatocellulare) test U di mann whitney
ABCA1	R=0,159 p=0,449	p=,052
ABCG5	R=0,152 p=0,469	p=,044
ABCG8	R=0,175 p=0,404	p=,069
BCN1	R=0,506 p=0,010	

ATG7	R=0,478 p=0,016	
CTSD	R=0,707 p=0,000	R=0,701 p=0,024
LAMP1	R=0,522 p=0,007	
LAMP2 ATP6V1E2 ATP6V0E1	R=0,475 p=0,017 R=0,399 p=0,048 R=0,441 p=0,027	
NPC1 NR1H3 NR1H4 FSTL1	R=0,668 p=0,000 R=0,512 p=0,009 R=0,411 p=0,041 R=0,500 p=0,011	
PCSK9	R=0,386 p=0,057	
PARa	R=0,375 p=0,064	p=0,045
PPARgamma	R=0,268 p=0,196	
PNPLA2	R=0,386 p=0,057	
COL2A1		R=0,690 p=0,027

Tabella 2. Correlazioni tra espressione genica di geni coinvolti nella cascata autofagica rispetto all'espressione istologica di p62 e al pattern sierologico (colestatico vs epatocellulare) dei pazienti NAFLD.

Il profilo colestatico sierologico correla con un aumento dell'espressione dei geni delle pompe di efflusso biliare.

Abbiamo riscontrato un aumento dell'espressione dell'mRNA delle pompe di efflusso della bile (ABCG5 e ABCG8) nel gruppo colestatico ($p=,052$; $p=,044$). Non sono invece state riscontrate correlazioni tra le caratteristiche morfologiche della colestasi (IBD, IH e IH) e l'espressione genica delle pompe di efflusso biliare. Abbiamo quindi eseguito una sottoanalisi nel gruppo dei pazienti con colestasi sierologica ed abbiamo evidenziato una correlazione inversa tra ballooning ed espressione genica delle pompe di efflusso biliare (ABCG5 ABCG8)($p=0,03$, $R=-$

1,4; $p=0.02$ $R=-1,2$).

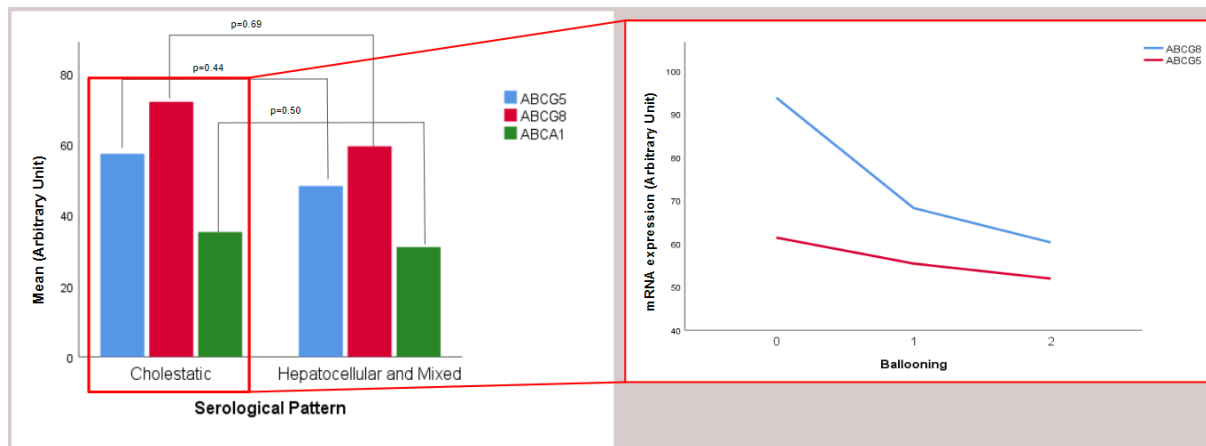


Figura 4. Rapporto tra i livelli di espressione genica delle pompe di efflusso del colesterolo a livello del canalicolo biliare ABCG5 e 8 in pazienti con profilo sierologico colestatico vs pazienti con profilo epatocellulare. Nel riquadro rosso sottoanalisi dell'espressione di ABCG5/8 nei soli pazienti con colestasi sierologica in rapporto alla presenza di ballooning.

Il compartimento biliare intraepatico risulta sovrertito nei casi di NAFLD più severa

All'analisi ultrastrutturale con il microscopio elettronico a trasmissione si sono evidenziate significative differenze a livello dei canalicoli biliari tra pazienti con NAFLD lieve e severa. Infatti i pazienti con gradi di steatoepatite severa mostrano un aumento del lume canalicolare, un appiattimento dei microvilli e presenza di materiale corpuscolato all'interno del lume (vedi figura 5).

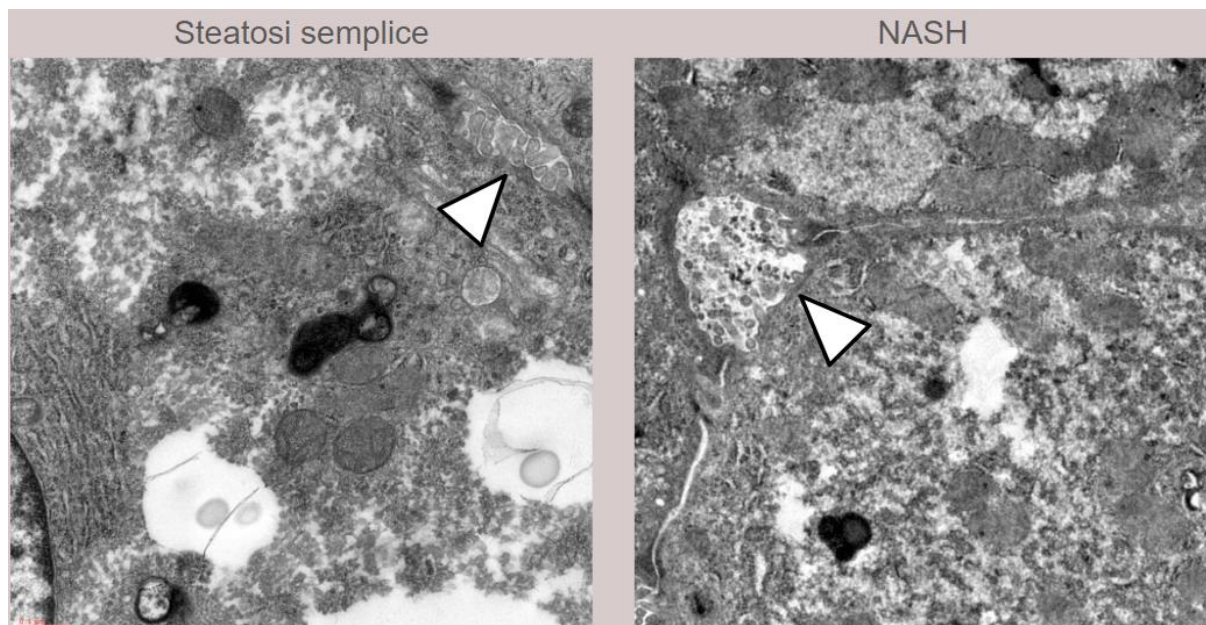


Figura 5. Nei pazienti con NAFLD grave, la TEM rivela una dilatazione canalicolare e un appiattimento subtotale dei microvilli rispetto ai pazienti con NAFLD più lieve; punte di freccia: canalicoli biliari (per gentile concessione della Prof.ssa Maria Zingariello)

All'analisi immunohistochimica utilizzando il marcatore anti-CD10 per evidenziare i canalicoli biliari si è messa in evidenza una completa destrutturazione dell'albero dei canalicoli biliari nei pazienti con NAFLD di grado più severo rispetto alle forme lievi (vedi figura 6).

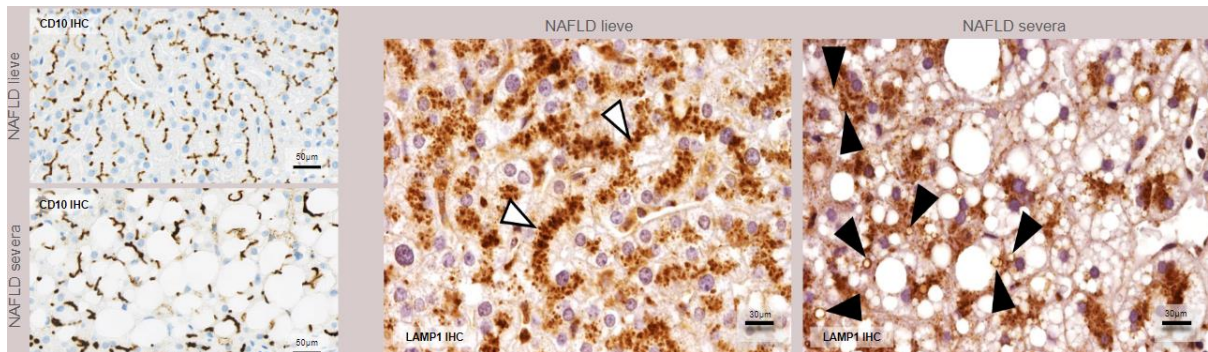


Figura 6. I canalicoli biliari (CD10-positivi) erano più discontinui e disposti irregolarmente nella MASLD grave rispetto a quella lieve.

Discussione

I risultati sopra riportati dimostrano come l'impairment autofagico sia strettamente correlato ad un rimaneggiamento delle vie biliari intraepatiche con conseguente colestasi intraepatica a livello istomorfologico. Infatti all'aumentare dell'intensità del marcatore di impairment autofagico p62 si assiste ad un aumento delle HPC e degli epatociti intermedi. La proliferazione dei dotti biliari è l'espressione patologica della reazione dutturale (DR), tipicamente osservata nelle malattie croniche del fegato. Il danno epatocellulare è il principale fattore scatenante della DR, che comprende non solo la proliferazione dei dotti biliari, ma anche un ampio spettro di reazioni del tessuto epatico, tra cui l'attivazione di diverse vie infiammatorie. Il danno epatico cronico attiva le cellule progenitrici epatiche (HPC), quiescenti nel fegato normale, con una conseguente DR che si manifesta in diversi modi. In primo luogo, le HPCs si differenziano in cellule intermedie e verso i lineages degli epatociti o dei colangiociti, a seconda della patogenesi del danno epatico; inoltre le HPCs possono dedifferenziare, portando alla metaplasia. Solitamente queste modifiche del compartimento biliare riguarda patologie biliari primitive come l'atresia biliare o la colangite sclerosante o comunque malattie epatiche arrivate a stadi in cui la fibrosi è preponderante. Nella nostra casistica invece abbiamo eliminato i soggetti con fibrosi severa quindi il danno colestatico sembra essere correlato esclusivamente alla malattia di base e soprattutto segue l'impairment dell'autofagia.

Un altro risultato importante risulta essere la discrepanza del rapporto tra autofagia e colestasi morfologica vs sierologica. Infatti suddividendo i pazienti in base ai parametri sierologici di colestasi non si è notata una differenza significativa nell'espressione immunomorfologica di p62 a livello epatico. Questo dato probabilmente sottolinea il fatto che un sottogruppo di pazienti NAFLD che non presenta alterazioni colestatiche a livello sierologico mostra invece a livello morfologico delle alterazioni importanti che potrebbero portare ad una più rapida progressione della malattia con prognosi sfavorevole come dimostrato dallo studio di Pennisi et al.

I dati immunomorfologici sull'impairment autofagico sono stati inoltre confermati dai risultati emersi dall'analisi sull'espressione genica di geni coinvolti nella cascata autofagica: si assiste ad un aumento dell'espressione di quasi tutti i geni correlati all'autofagia (vedi tabella) che correla con l'aumentare del marcatore p62 a livello istologico. Quindi nonostante un aumento dell'espressione della machinery autofagica viene rilevato un aumento dell'espressione tissutale di p62 evidenziando quindi un blocco nella fase finale dell'autofagia ovvero nell'eliminazione dei substrati a livello lisosomiale. Tale dato era già stato dimostrato dal nostro gruppo con recenti studi.

Per quanto riguarda il rapporto tra colestasi ed autofagia abbiamo inoltre trovato una correlazione diretta tra l'espressione istologica di p62 e i livelli di espressione genica di NR1H1 ed NR1H3 (ovvero il liver X receptor alfa LXR α).

L'LXRalfa assieme al recettore X dei retinoidi alfa forma un eterodimero che funge da recettore nucleare che modula l'espressione genica di diversi pathway metabolici tra cui il metabolismo del colesterolo e degli acidi biliari (Uppal H, Hepatology 2007). In questo scenario, l'aumento di LXR α nei pazienti NAFLD con compromissione dell'autofagia potrebbe rappresentare un tentativo di far fronte all'accumulo di colesterolo e acidi biliari. Tale dato sembra essere supportato dall'evidenza che anche l'espressione di mRNA delle pompe di efflusso biliare ABCG5 e 8 è aumentato nei pazienti con pattern sierologico colestatico rispetto ai pazienti epatocellulari. ABCG5 e 8 costituiscono un eterodimero che forma un canale per il trasporto del colesterolo dal citoplasma epatocitario verso il lume del canalicolo biliare. Quindi, nonostante il tentativo di aumentare i meccanismi per eliminare il colesterolo da parte dell'epatocita si osserva un accumulo intracitoplasmatico di lipidi e colesterolo che portano alla NAFLD. Nonostante abbiamo osservato un aumento di espressione di ABCG5/8 e LXR α tuttavia da un

punto di vista istomorfologico e ultrastrutturale abbiamo osservato un totale sovvertimento della struttura biliare a livello epatocitario. Infatti i canalicoli biliari presentano meno microvilli ed un volume aumentato con microinclusi nel lume nei pazienti con NAFLD più severa rispetto ai pazienti con gradi più lievi di malattia, e anche la struttura lineare dei canalicoli e dei dotti biliari nei pazienti con malattia steatosica più severa subisce un sovvertimento come evidenziato dal marcatore canalicolare CD10. Tali evidenze di sovvertimento della struttura epatobiliare, unite all'aumento dell'espressione delle pompe di efflusso e di LXRA potrebbe suggerire un tentativo epatocitario di aumentare l'eliminazione di colesterolo e acidi biliari a fronte di una chiara disfunzione strutturale dei canalicoli/colestasi intraepatocitaria. Infine l'analisi immunomorfologica con il marcatore per la parete lisosomiale LAMP1 ha messo in evidenza come in un fegato di pazienti con NAFLD lieve il compartimento lisosomiale è situato lungo il polo bilare dell'epatocita, tanto che a basso ingrandimento LAMP1 delinea il decorso dei canalicoli biliari. Invece nei pazienti con NAFLD severa la positività per LAMP1 diviene disordinata e mette in evidenza i lipolisosomi ripieni di colesterolo in eccesso come dimostrato in studi precedenti e non c'è più una prossimità del comparto lisosomiale a quello biliare. La presenza dei lisosomi lungo i canalicoli biliari suggerisce una stretta relazione metabolica tra questi due elementi. Dal momento che il lisosoma rappresenta l'effettore finale della cascata autofagica e lipofagica, la compromissione dell'autofagia che abbiamo evidenziato precedentemente sembra anche in questo caso essere correlata ad una disfunzione a livello biliare.

Altri studi a livello biomolecolare devono essere condotti per valutare meglio il rapporto funzionale tra canalicolo biliare e lipofagia nei pazienti con NAFLD.

Conclusioni parte generale

Con questa serie di studi abbiamo valutato alcuni dei possibili meccanismi che possono portare ad un'alterata eliminazione dei lipidi nel fegato dei pazienti NAFLD. In questi studi abbiamo indagato l'eliminazione dei lipidi a livello epatocitario sia in termini di afflusso (ovvero meccanismi di eliminazione dei lipidi all'interno dell'epatocita tramite la lipofagia) sia le vie di efflusso, concentrandoci sul versante del canalicolo biliare dove vengono eliminati colesterolo e acidi biliari. Abbiamo quindi riscontrato che un blocco a livello del processo lipofagico ovvero quel processo che elimina esteri del colesterolo e trigliceridi dell'epatocita tramite il lisosoma, sembra svolgere un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione della

NAFLD. Inoltre abbiamo evidenziato che il blocco della lipofagia potrebbe essere in parte determinato da una riduzione dell'attività della Lipasi acida lisosomiale che rappresenta l'enzima adibito alla scissione degli esteri del colesterolo. Tale blocco della cascata autofagica al vertice del processo porterebbe allo sviluppo dei lipolisosomi ovvero vescicole con membrana ripiene di esteri del colesterolo e trigliceridi che occupano il citoplasma epatocitario. Infine abbiamo evidenziato che un sovertimento del deflusso biliare a livello istomorfologico ma non sierologico è strettamente correlato sia alla progressione della NAFLD ma anche all'impairment lipofagico. Quindi una colestasi intraepatica non clinicamente evidente potrebbe contribuire ad un fenotipo di malattia a prognosi peggiore.

Materiali e metodi parte generale

Cellule e trattamenti

La linea cellulare di carcinoma umano derivata da epatociti Huh7 è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) e coltivata in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) a basso contenuto di glucosio con 10% di siero fetale bovino, 1% di penicillina- streptomina e 1% di L-glutamina in un incubatore umidificato a 37 °C con il 5% di CO₂. Per i trattamenti, le cellule sono state piastrate all'80% di confluenza e, dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato sostituito con DMEM completo ad alto contenuto di glucosio e sono stati aggiunti 200 µM di acido palmitico coniugato con BSA per 2, 4 e 8 giorni. Le cellule Huh7 sono state trattate anche con l'inibitore del proteasoma MG132 10 µM (Sigma- Aldrich, Milano, Italia) per 3 h. Le cellule Huh7 sono state trasfettate con un vettore che codifica per l'ubiquitina umana marcata con HA. In particolare, le cellule Huh7 sono state trasfettate per una notte con 2 µg/ml di pDNA e 3 µg di reagente PEI/µg di pDNA in terreno completo. Il pDNA e il reagente PEI (Alfa Aesar Cat. 43896; stock: 1 µg/µl in ddH₂O) sono stati incubati 25 minuti a temperatura ambiente (RT) in terreno Opti-MEM (10% del volume di coltura).

Modello animale, trattamento e analisi biochimiche

La sperimentazione sui topi è stata condotta in conformità con gli standard accettati da per la cura degli animali umani, dopo l'approvazione da parte dei comitati locali (Comitato per il Benessere Animale dell'Università di Tor Vergata) e nazionali (Ministero della Salute, Decreto Legislativo n. 26/2014; Direttiva Europea 2010/63/UE)

con l'autorizzazione n. 378/2017-PR. Topi adulti maschi C57BL/6J (3 mesi di età) (acquistati da ENVIGO, Italia) sono stati suddivisi casualmente in quattro gruppi: topi alimentati con dieta normale (ND: 3,85 kcal/g tra cui 10% kcal da grassi, 20% da proteine e 70% da carboidrati) per 4 mesi (gruppo 1) o per 8 mesi (gruppo 2); topi alimentati con HFD (5,24 kcal/g tra cui 60% kcal da grassi, 20% da proteine e 20% da carboidrati) per 4 mesi (gruppo 3) o per 8 mesi (gruppo 4). ND (#D12450B) e HFD (#D12492) sono stati prodotti da Research Diets, INC (New Brunswick, NJ, USA). ND conteneva il 38% di zuccheri, il 4% di grassi saturi, il 6% di grassi insaturi e caseina; HFD conteneva il 20% di zuccheri, il 54% di grassi saturi, il 6% di grassi insaturi e caseina. I topi sono stati mantenuti a $23,0 \pm 1,0$ °C e $55,0 \pm 5,0\%$ di umidità relativa con un ciclo di luce/buio di 12 ore (accensione delle luci alle 6.00 del mattino, spegnimento delle luci alle 18.00). Al termine del trattamento, i topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale e il tessuto epatico è stato espantato per le analisi.

Attività enzimatica

L'attività della LAL è stata valutata sia in cellule Huh7 che in campioni di tessuto epatico di topo. Le cellule sono state lisate in tampone acetato 0,15 mol/l (pH 4,0) e 1% Triton X-100. Lalistat-2 è stato utilizzato come inibitore delle proteasi. Le sezioni di tessuto epatico (~1 mm) sono state omogeneizzate in Triton 100X all'1% con inibitori delle proteasi e diluite con 0,3 mg/ml di proteine. La miscela di reazione conteneva 4- metilumbelliferone (4-MU, Apollo Scientific, Manchester, Regno Unito), cardiopina (Sigma Aldrich Company Ltd, Dorset, Inghilterra) e LAL Lalistat-2 (fornito da Alexion Pharma, Cheshire, Connecticut, USA). Per eseguire l'esperimento, è stata preparata una soluzione tampone con 0,15 M di tampone acetato a pH 4,0 e 1,0% di Triton 100X. Quindi, 14 ml di tampone sono stati conservati in acqua (37 °C) e per la soluzione tampone di substrato sono stati utilizzati 1,0 ml (0,5%, w/v) di cardiopina in metanolo e 400 µl (13,3 mM) di 4 MU-palmitato in DMSO. Infine, ogni volta sono stati preparati 30 µM di Lalistat-2 diluendo 200 µM di Lalistat-2 (in DMSO) con acqua distillata. Uno spot di 3,2 mm è stato inserito nel pozzetto di una piastra da 96 microtiter (Greiner bio-one, Germania) e diluito in 200 µl di acqua per 1 ora a RT con una leggera inclinazione (50g). Le reazioni sono state eseguite in doppio. La miscela di reazione conteneva 40 µl di campione e 10 µl dell'inibitore Lalistat-2. Dopo 10 minuti di pre-incubazione, sono stati aggiunti 150 µl di tampone di substrato e la piastra è stata incubata per 3 ore a 37 °C. La reazione è stata arrestata aggiungendo 100 µl (15 mM) di HgCl₂. È stata costruita una curva standard 0-2,5 nmol/pozzetto 4 MU.

L'intensità della fluorescenza è stata misurata con un lettore di piastre multimodale EnSpire (Perkin Elmer, USA) (eccitazione $\lambda = 355$ nm, emissione $\lambda = 460$ nm). L'attività della LAL è stata determinata sottraendo l'attività nella reazione inibita da quella non inibita (lipasi totale) ed espressa come nmol/ spot/h di 4MU (metilumbelliferone).

Saggio di immunoprecipitazione

Le cellule Huh7 (piatto da 100 mm) sono state lisate in 1 ml di tampone RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 12 mM acido desossicico, 0,5% Nonidet P- 40 e inibitori di proteasi e fosfatasi). Quindi, 1 mg di proteine totali è stato pre-liquidato (4 ore a 4 °C in leggera miscelazione) con 30 μ l di Agarose Goat IgG, policlonale-Isotype Control (Abcam, ab104155). Il lisato ripulito è stato incubato con 30 μ l di anticorpo di agarosio anti-HA tag (Abcam; ab214758) o controllo isotipico (16 h a 4 °C in leggera miscelazione). L'immunoprecipitato (IP) è stato raccolto a 1000g per 2 minuti, seguito da tre lavaggi con tampone RIPA. L'IP è stato denaturato con 40 μ l di tampone Laemmli 2X e 30 μ l sono stati caricati su SDS-PAGE.

Western blot

Il tessuto epatico animale e le cellule sono stati omogeneizzati in tampone RIPA. Per ottenere la frazione citosolica, le cellule Huh7 (piatto da 150 cm) sono state risospese in 3 ml di tampone saccarosio (250 mM saccarosio, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,4) e lisate con 30 colpi in un omogeneizzatore Potter-Helvenheim in ghiaccio. Membrana e organuli sono stati separati a 20.000g per 20 minuti a 4 °C. Il surnatante (frazione arricchita di citosol) è stato concentrato 10 volte con filtri centrifughi da 30 K (Amicon® Ultra - 2 ml con membrana Ultracel® da 30 K; UFC203024; Merck-Millipore). Quindi, 10 μ g di proteine sono stati caricati su SDS- PAGE e sottoposti a western blotting. Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate con anti-heat shock protein-60 (Hsp60) (Abcam, ab46798), anti-TOM20 (Santa Cruz Biotechnology, Sc17764), anti- vincolina (Santa Cruz Biotechnology, Sc73614), anti-Ubiquitina (Santa Cruz Biotechnology, Sc-8017), anti-cathepsina D (AbD Serotec, Cat 1910- 8997), anticorpi primari anti-LAMP-1 (NovusBiologicals, NBP2-61619), anti-LAL (Proteintech, 12956- 1-AP), anti-LAL (Novus, NBP1-54155) e anti- LAL (Abcam, ab154356) alla diluizione 1.000:1000. Successivamente, le membrane sono state incubate con gli appropriati anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano. Le bande immunoreattive sono state rilevate con un sistema FluorChem FC3 (Protein-Simple, San Jose, CA, USA) dopo l'incubazione delle membrane con il reagente ECL Selected

Western Blotting Detection (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA).

Istomorfologia epatica

I campioni di tessuto epatico umano sono stati colorati con ematossilina ed eosina e rosso Sirius, e ogni caso è stato analizzato dallo stesso operatore con competenze specifiche in istopatologia epatica. La gravità della steatosi (0-3), le caratteristiche della NASH, tra cui la necroinfiammazione (0-3), il ballooning epatocellulare (0-2) e lo stadio di fibrosi (0-4) sono stati valutati secondo il sistema di punteggio della rete di ricerca clinica sulla NAFLD [12], e ogni caso è stato diagnosticato come steatosi semplice o NASH secondo Brunt et al. [13].

Analisi immunoistochimica

L'IHC è stata eseguita su sezioni ottenute da tessuti di topo e umani fissati in formalina e inclusi in paraffina. Ogni caso è stato analizzato mediante IHC per LAMP1, un marcatore lisosomiale (NBP1- 61619, 1:50, monoclonale di topo, Novus Biologicals, Abingdon, Regno Unito) e due diversi anticorpi LAL (12956-1-AP, 1:100, policlonale di coniglio, Proteintech, Manchester, Regno Unito e NBP1-54155, 1:200, policlonale di coniglio, Novus Biologicals, Abingdon, Regno Unito). Le reazioni IHC sono state visualizzate con DAB come cromogeno DAKO Omnis Envision FLEX/HRP (California, USA). L'ematossilina è stata utilizzata come controstampo per visualizzare i nuclei. Le sezioni colorate IHC sono state scansionate con Hamamatsu NanoZoomer 2.0-RS. LAMP1 è stato utilizzato per visualizzare le vescicole di origine lisosomiale (con membrana positiva a LAMP1). Il numero di vescicole LAMP1-positive di grandi dimensioni, con un lume visibile, cioè lipolisosomi, è stato valutato in cinque campi scelti a caso per ciascun caso con un ingrandimento di x400. Il valore medio è stato quindi ricavato in ogni campione per l'analisi statistica. La percentuale di epatociti con steatosi microvescicolare nel tessuto epatico (accumulo di piccole gocce di grasso con architettura cellulare conservata) [14, 15] è stata valutata in quattro campi scelti a caso per ciascun caso (ingrandimento x100) ed è stato ricavato un valore medio. Infine, i campioni sono stati suddivisi come segue: una steatosi microvescicolare <5% nei campioni è stata classificata come classe 1, classe 2 dal 5-10%, classe 3 dall'11-25% e la classe 4 dal 26 al 50%. Per valutare l'espressione di LAL, sono stati analizzati tre campi scelti a caso per ciascun campione (ingrandimento x100). L'immunocolorazione è stata valutata utilizzando un plugin open-source IHC Profiler per ImageJ [16]. Tutte le immagini analizzate sono state sogliate allo stesso valore di

intensità. Per descrivere l'intensità della colorazione in ciascun campo è stata applicata una scala che va da 0 a 3, dove 0 significa negativo e 3 significa fortemente positivo. Per ogni campo è stata registrata la percentuale di tessuto epatico con diversi punteggi di intensità. Il punteggio IHC è stato ricavato come segue: $[(3 + \%tessuto) \times 3 + (2 + \%tessuto) \times 2 + (1 + \%tessuto) \times 1]$. È stato quindi ricavato un valore medio per ciascun campione [17].

La colorazione immunofluorescente è stata eseguita su sezioni di tessuto incluso in paraffina e colture cellulari con gli stessi anticorpi utilizzati per l'immunoistochimica. Gli anticorpi secondari Alexa Fluor 488 e/o Alexa Fluor 568 coniugati di asino anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat (Invitrogen, Carlsbad, CA, Stati Uniti) sono stati aggiunti per 30 minuti (titolo 1:200), seguiti da un'altra fase di lavaggio completo in TBS. La controcolorazione nucleare è stata eseguita utilizzando il mezzo di montaggio Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Stati Uniti) contenente 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). Le immagini di fluorescenza sono state raccolte con un sistema di microscopio laser confocale Nikon A1 (Nikon, Tokyo, Giappone). L'acquisizione è stata effettuata con il software di imaging NIS-Elements (Nikon).

Contenuto lipidico e analisi in microscopia a fluorescenza.

L'accumulo di goccioline lipidiche nelle cellule Huh7 è stato analizzato mediante colorazione Oil Red O. Le cellule sono state fissate con formaldeide al 10%, risciacquate con isopropanolo al 60% e colorate con la soluzione di lavoro Oil Red O appena preparata (2 mg/ml in 2-propanolo al 60%; Sigma- Aldrich) per 20 minuti, seguita da quattro lavaggi di 10 minuti con PBS. I nuclei sono stati controcolorati con Hoechst 33342. La fluorescenza derivata dall'Oil Red O è stata visualizzata con un microscopio a fluorescenza Zeiss AXIO observer 7 (Zeiss) dotato di obiettivo A-Plan 5x/0,12 (cod. 421030-9900-000; Zeiss). Il contenuto di lipidi neutri è stato stimato mediante eluizione di Oil Red O con il 100% di 2-propanolo e misurato mediante analisi spettrometrica a 492 nm.

La colorazione immunofluorescente è stata eseguita su cellule e sezioni di fegato di topo da tessuto incluso in paraffina. Le cellule sono state lavate con PBS e fissate con paraformaldeide al 4% per 15 minuti. Le cellule sono state permeabilizzate e bloccate con lo 0,25% di TRITON X- 100 e il 2% di siero normale (in PBS) per 20 minuti e poi incubate in 1% di siero normale, 0,1% di TRITON X-100 (in PBS) con gli anticorpi primari appropriati per 2 ore RT alla seguente concentrazione: Anticorpo per

l'ubiquitina (Sc-8017, 1:100, monoclonale di topo, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germania) per riconoscere le proteine ubiquitine, anticorpo per LAMP1 (NBP1-61619, 1:50, monoclonale di topo, Novacella, 1:50):50, monoclonale di topo, Novus Biologicals, Abingdon, UK) e due diversi anticorpi LAL (12956- 1-AP, 1:50, policlonale di coniglio, Proteintech, Manchester, UK e NBP1-54155, 1:50, policlonale di coniglio, Novus Biologicals, Abingdon, UK).

I tessuti di topo fissati in formalina e inclusi in paraffina sono stati incubati con gli appropriati anticorpi primari anti-LAL e anti-LAMP1 (ab24170) per 2 ore RT. Per ogni caso, sono stati aggiunti anticorpi secondari Alexa Fluor 488 e/o Alexa Fluor 568 coniugati con anticorpi di asino anti-mouse, anti-rabbit e anti-goat (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per 30 minuti (titolo 1:200), seguiti da un'altra fase di lavaggio completo in PBS. La controcolorazione nucleare è stata eseguita utilizzando il mezzo di montaggio Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) contenente 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). Le immagini fluorescenti sono state raccolte con un sistema di microscopio laser confocale Nikon A1 (Nikon, Tokyo, Giappone). L'acquisizione è stata effettuata utilizzando il software di imaging NIS-Elements (Nikon) ed elaborato con il software Fiji (US National Institutes of Health).

Analisi ultrastrutturale

Un sottogruppo ($n = 5$) di campioni di fegato è stato fissato in glutaraldeide al 2,5% in tampone cacodilato 0,1 M per lo studio ultrastrutturale. Dopo la fissazione, la disidratazione e l'impregnazione, i campioni sono stati inclusi in resine epossidiche e acriliche, tagliati all'ultramicrotomo e trattati per lo studio ultrastrutturale degli epatociti mediante microscopia elettronica. In particolare, gli aspetti morfologici tipici del sovraccarico lipidico, dell'attivazione lisosomiale e del processo di lipofagia/autofagia, come la presenza di goccioline lipidiche, vacuoli lipidici legati alla membrana (lipolisosomi) e Gli autofagosomi sono stati valutati in campioni a 5000X. La presenza di lipolisosomi negli epatociti di pazienti affetti da NAFLD è stata valutata sia alla luce e microscopia elettronica è stata valutata secondo i criteri precedenti di Iancu et al. (2013).

Analisi dell'mRNA

L'analisi Nanostring nCounter è stata eseguita in un sottogruppo di pazienti e controlli ($n = 38$). L'RNA totale è stato estratto con il kit High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche) da sezioni di 10 μm di biopsie epatiche FFPE di pazienti con NAFLD (27

campioni) e 11 controlli. L'RNA è stato quantificato con il BioPhotometerR D30 (Eppendorf) e 100 ng di RNA totale sono stati sottoposti al Nanostring nCounter Analysis System. Questo sistema utilizza una nuova tecnologia digitale con codici a barre colorati che si basa sulla misurazione diretta multiplexata dell'espressione genica e offre alti livelli di precisione e sensibilità (<1 copia per cellula). La tecnologia utilizza "codici a barre" molecolari e immagini di singole molecole per rilevare e contare centinaia di trascritti unici in una singola reazione.

Abbiamo utilizzato un CodeSet nCounter personalizzato contenente 20 geni, selezionati per valutare i livelli di espressione (livelli di mRNA) di geni coinvolti nell'autofagia e di altri geni funzionali in campioni di fegato NAFLD rispetto a quelli sani. In particolare, di questi geni, 6 sono geni correlati al lisosoma (LAMP1, LAMP2, CTSD, NPC1, ATP6V1B2, TFEB, LAL) e 9 sono geni chiave coinvolti nell'autofagia (mTOR, ULK1, BECN1, ATG12, ATG5, ATG7, p62/SQSTM1, RAB7A, GABARAP). Abbiamo anche incluso nel pannello 3 marcatori epatocitari (AFP, ALB e TTR) per normalizzare i valori del numero di epatociti presenti in ciascun campione e 2 geni housekeeping (TUBB e HIST1H3A), per normalizzare i valori del numero totale di cellule. L'analisi Nanostring nCounter è stata eseguita seguendo il protocollo del produttore. In breve, 100 ng di RNA totale sono stati ibridati in soluzione a 65° C per 16 ore con coppie specifiche di sonde a ~50 basi per ciascun set di geni mRNA. La sonda Reporter trasporta il segnale; la sonda Capture consente di immobilizzare il complesso per la raccolta dei dati. Dopo ibridazione, l'eccesso di sonda è stato rimosso e i complessi sonda/target sono stati allineati e immobilizzati nella cartuccia nCounter. Le cartucce campione sono state inserite nell'analizzatore digitale per la raccolta dei dati. I codici colore sulla superficie della cartuccia vengono contati e tabulati per ogni molecola target. I conteggi grezzi di ciascun mRNA sono stati normalizzati (per i marcatori epatocitari o per i geni housekeeping) e analizzati con il software di analisi nSolver (nSAS) per ottenere l'analisi dell'espressione differenziale di 44 geni nei campioni NAFLD rispetto ai campioni di controllo (sani).

Statistiche

A seconda della distribuzione parametrica o non parametrica, le variabili sono espresse rispettivamente come media \pm SD o mediana e range interquartile 25-75% (25-75% IR). Le differenze sono state valutate con il test di Kruskal-Wallis. Le correlazioni sono state effettuate con il test di correlazione di rango di Spearman. Un $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Per le analisi statistiche è

stato utilizzato il software SPSS (versione 22.00; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Bibliografia parte generale

1. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: an expanded review. *World J Hepatol* 9: 715–732, 2017. doi:10.4254/wjh.v9.i16.715.
2. Aguilera MO, Berón W, Colombo MI. The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy* 8: 1590–1603, 2012. doi:10.4161/auto.21459.
3. A-Kader HH. Lysosomal acid lipase deficiency: a form of non-obese fatty liver disease (NOFLD). *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 11: 911–924, 2017. doi:10.1080/17474124.2017.1343144.
4. Amin NB, Carvajal-Gonzalez S, Purkal J, Zhu T, Crowley C, Perez S, Chidsey K, Kim AM, Goodwin B. Targeting diacylglycerol acyltransferase 2 for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Transl Med* 11: eaav9701, 2019. doi:10.1126/scitranslmed.aav9701.
5. Amrutkar M, Chursa U, Kern M, Nuñez-Durán E, Ståhlman M, Sütt S, Borén J, Johansson BR, Marschall HU, Blüher M, Mahlapuu M. STK25 is a critical determinant in nonalcoholic steatohepatitis. *FASEB J* 30: 3628–3643, 2016. doi:10.1096/fj.201600562R.
6. Baratta F, Pastori D, Del Ben M, Polimeni L, Labbadia G, Di Santo S, Piemonte F, Tozzi G, Violi F, Angelico F. Reduced lysosomal acid lipase activity in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *EBioMedicine* 2: 750–754, 2015. doi:10.1016/j.ebiom.2015.05.018.
7. Baratta F, Pastori D, Tozzi G, D'Erasmus L, Di Costanzo A, Arca M, Ettorre E, Ginanni Corradini S, Violi F, Angelico F, Del Ben M. Lysosomal acid lipase activity and liver fibrosis in the clinical continuum of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 39: 2301–2308, 2019. doi:10.1111/liv.14206.
8. Barbosa AD, Siniosoglou S. Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 1459–1468, 2017. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.04.001.
9. BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology* 66: 1111–1124, 2017. doi:10.1002/hep.29273.
10. Ben M'barek K, Ajjaji D, Chorlay A, Vanni S, Forêt L, Thiam AR. ER membrane phospholipids and surface tension control cellular lipid droplet formation. *Dev Cell* 41: 591–604.E7, 2017. doi:10.1016/j.devcel.2017.05.012.
11. Benador IY, Veliova M, Liesa M, Shirihaï OS. Mitochondria bound to lipid droplets: where mitochondrial dynamics regulate lipid storage and utilization. *Cell Metab* 29: 827–835, 2019. doi:10.1016/j.cmet.2019.02.011.
12. Abdrakhmanov A, Gogvadze V, Zhivotovsky B. To eat or to die: deciphering selective forms of autophagy. *Trends Biochem Sci* 45: 347–364, 2020. doi:10.1016/j.tibs.2019.11.006.
13. Brier LW, Ge L, Stjepanovic G, Thelen AM, Hurley JH, Schekman R. Regulation of LC3 lipidation by the autophagy-specific class III phosphatidylinositol-3 kinase complex. *Mol Biol Cell* 30: 1098–1107, 2019. doi:10.1091/mbc.E18-11-0743.

14. Bruschi FV, Tardelli M, Claudel T, Trauner M. PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. *Hepat Med* 9: 55–66, 2017. doi:10.2147/HMER.S125718.
15. Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11: 467–480, 2000. doi:10.1091/mbc.11.2.467.
16. Burton BK, Balwani M, Feillet F, Baric´ I, Burrow TA, Camarena Grande C, Coker M, Consuelo-Sánchez A, Deegan P, Di Rocco M, Enns GM, Erbe R, Ezgu F, Ficicioglu C, Furuya KN, Kane J, Laukaitis C, Mengel E, Neilan EG, Nightingale S, Peters H, Scarpa M, Schwab KO, Smolka V, Valayannopoulos V, Wood M, Goodman Z, Yang Y, Eckert S, Rojas-Caro S, Quinn AG. A phase 3 trial of sebelipase alfa in lysosomal acid lipase deficiency. *N Engl J Med* 373: 1010–1020, 2015. doi:10.1056/NEJMoa1501365.
17. Burton BK, Marulkar S, Friedman M, Tripuraneni R, Furuya KN. Long-term benefit of sebelipase alfa over 76 weeks in children and adults with lysosomal acid lipase deficiency (LALD) “ARISE. *Mol Genet Metab* 120: S33, 2017. doi:10.1016/j.ymgme.2016.11.056.
18. Camarena C, Aldamiz-Echevarria LJ, Polo B, Barba Romero MA, García I, Cebolla JJ, Ros E. Update on lysosomal acid lipase deficiency: diagnosis, treatment and patient management. *Med Clin (Barc)* 148: 429.e1–429.e10, 2017. doi:10.1016/j.medcli.2016.12.044.
19. Cho CS, Park HW, Ho A, Semple IA, Kim B, Jang I, Park H, Reilly S, Saltiel AR, Lee JH. Lipotoxicity induces hepatic protein inclusions through TANK binding kinase 1-mediated p62/sequestosome 1 phosphorylation. *Hepatology* 68: 1331–1346, 2018. doi:10.1002/hep.29742.
20. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 22: 353–363, 2011. doi:10.1016/j.tem.2011.04.007.
21. del Angel G, Hutchinson AT, Jain NK, Forbes CD, Reynders J. Large-scale functional LIPA variant characterization to improve birth prevalence estimates of lysosomal acid lipase deficiency. *Hum Mutat* 40: 2007–2020, 2019. doi:10.1002/humu.23837.
22. 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* 115: 1343–1351, 2005. doi:10.1172/JCI23621.
23. Du H, Schiavi S, Levine M, Mishra J, Heur M, Grabowski GA. Enzyme therapy for lysosomal acid lipase deficiency in the mouse. *Hum Mol Genet* 10: 1639–1648, 2001. doi:10.1093/hmg/10.16.1639.
24. Du H, Zhao T, Ding X, Yan C. Hepatocyte-specific expression of human lysosome acid lipase corrects liver inflammation and tumor metastasis in *lal(-/-)* mice. *Am J Pathol* 185: 2379–2389, 2015. doi:10.1016/j.ajpath.2015.05.021.
25. Dupont N, Chauhan S, Arko-Mensah J, Castillo EF, Masedunskas A, Weigert R, Robenek H, Proikas-Cezanne T, Deretic V. Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis. *Curr Biol* 24: 609–620, 2014. doi:10.1016/j.cub.2014.02.008.
26. Ekstedt M, Nasr P, Kechagias S. Natural history of NAFLD/NASH. *Curr Hepatol Rep* 16: 391–397, 2017. doi:10.1007/s11901-017-0378-2.
27. Emanuel R, Sergin I, Bhattacharya S, Turner J, Epelman S, Settembre C, Diwan A, Ballabio A, Razani B. Induction of lysosomal biogenesis in atherosclerotic macrophages can rescue lipid-

- induced lysosomal dysfunction and downstream sequelae. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 1942–1952, 2014. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303342.
28. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134: 424–431, 2008. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.038.
29. Ferri F, Mischitelli M, Tozzi G, Messina E, Mignini I, Mazzuca S, Pellone M, Parisse S, Marrapodi R, Visentini M, Baratta F, Del Ben M, Pastori D, Perciballi R, Attilia ML, Carbone M, De Santis A, Violi F, Angelico F, Ginanni Corradini S. Reduced lysosomal acid lipase activity in blood and platelets is associated With nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Transl Gastroenterol* 11: e00116, 2020. doi:10.14309/ctg.000000000000116.
30. Fukuo Y, Yamashina S, Sonoue H, Arakawa A, Nakadera E, Aoyama T, Uchiyama A, Kon K, Ikejima K, Watanabe S. Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 44: 1026 – 1036, 2014. doi:10.1111/hepr.12282.
31. Gomaraschi M, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Pavanello C, Giorgio E, Da Dalt L, Norata GD, Calabresi L, Consonni D, Lombardi R, Branchi A, Fargion S. Lipid accumulation impairs lysosomal acid lipase activity in hepatocytes: evidence in NAFLD patients and cell cultures. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864: 158523, 2019. doi:10.1016/j.bbalip.2019.158523.
32. Gong J, Sun Z, Wu L, Xu W, Schieber N, Xu D, Shui G, Yang H, Parton RG, Li P. Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J Cell Biol* 195: 953–963, 2011. doi:10.1083/jcb.201104142.
33. Granneman JG, Moore HPH, Mottillo EP, Zhu Z, Zhou L. Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem* 286: 5126–5135, 2011. doi:10.1074/jbc.M110.180711.
34. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11: 1433–1437, 2009. doi:10.1038/ncb1991.
35. Hikita H, Sakane S, Takehara T. Mechanisms of the autophagosomelysosome fusion step and its relation to non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Res* 2: 120–124, 2018. doi:10.1016/j.livres.2018.09.003.
36. Hodson L, Gunn PJ. The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state. *Nat Rev Endocrinol* 15: 689–700, 2019. doi:10.1038/s41574-019-0256-9.
37. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109: 1125–1131, 2002. doi:10.1172/JCI0215593.
38. Iizuka K, Miller B, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E358–E364, 2006. doi:10.1152/ajpendo.00027.2006.
39. Inami Y, Yamashina S, Izumi K, Ueno T, Tanida I, Ikejima K, Watanabe S. Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 412: 618–625, 2011. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.012.
40. Jensen-Urstad APL, Semenkovich CF. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta* 1821: 747–753, 2012.

doi:10.1016/j.bbali.2011.09.017.

41. Jones SA, Rojas-Caro S, Quinn AG, Friedman M, Marulkar S, Ezgu F, Zaki O, Gargus JJ, Hughes J, Plantaz D, Vara R, Eckert S, Arnoux JB, Brassier A, Le Quan Sang KH, Valayannopoulos V. Survival in infants treated with sebelipase Alfa for lysosomal acid lipase deficiency: an open-label, multicenter, dose-escalation study. *Orphanet J Rare Dis* 12: 25, 2017. doi:10.1186/s13023-017-0587-3.
42. Kalhan SC, Bugianesi E, McCullough AJ, Hanson RW, Kelley DE. Estimates of hepatic glyceroneogenesis in type 2 diabetes mellitus in humans. *Metabolism* 57: 305–312, 2008. doi:10.1016/j.metabol.2007.10.003.
43. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol* 17: 759–770, 2015. doi:10.1038/ncb3166.
44. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 48: 434–441, 2013. doi:10.1007/s00535-013-0758-5.
45. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 125: 25–32, 2015. doi:10.1172/JCI73939.
46. Kwanten WJ, Martinet W, Michielsen PP, Francque SM. Role of autophagy in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: a controversial issue. *World J Gastroenterol* 20: 7325–7338, 2014. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7325.
47. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G, Zechner R. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Charnin-Dorfman syndrome. *Cell Metab* 3: 309–319, 2006. doi:10.1016/j.cmet.2006.03.005.
48. Lettieri Barbato D, Aquilano K. Feast and famine: adipose tissue adaptations for healthy aging. *Ageing Res Rev* 28: 85–93, 2016. doi:10.1016/j.arr.2016.05.007.
49. Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR. Mitochondrial hormesis links nutrient restriction to improved metabolism in fat cell. *Aging (Albany NY)* 7: 869–881, 2015. doi:10.18632/aging.100832.
50. Li F, Zhang H. Lysosomal acid lipase in lipid metabolism and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39: 850–856, 2019. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312136.
51. Li Z, Schulze RJ, Weller SG, Krueger EW, Schott MB, Zhang X, Casey CA, Liu J, Stöckli J, James DE, McNiven MA. A novel Rab10-EHBP1-EHD2 complex essential for the autophagic engulfment of lipid droplets. *Sci Adv* 2: e1601470, 2016. doi:10.1126/sciadv.1601470.
52. Magré J, Delépine M, et al; BSCL Working Group. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 28: 365–370, 2001. doi:10.1038/ng585.
53. Martinez-Lopez N, Garcia-Macia M, Sahu S, Athonvarangkul D, Liebling E, Merlo P, Cecconi F, Schwartz GJ, Singh R. Autophagy in the CNS and periphery coordinate lipophagy and lipolysis in the Brown adipose tissue and liver. *Cell Metab* 23: 113–127, 2016. doi:10.1016/j.cmet.2015.10.008.
54. Ministrini S, Calzini L, Nulli Migliola E, Ricci MA, Roscini AR, Siepi D, Tozzi G, Daviddi G, Martorelli EE, Paganelli MT, Lupattelli G. Lysosomal acid lipase as a molecular target of the very low carbohydrate ketogenic diet in morbidly obese patients: the potential effects on liver steatosis

- and cardiovascular risk factors. *J Clin Med* 8: 621, 2019. doi:10.3390/jcm8050621.
55. Mizunoe Y, Kobayashi M, Tagawa R, Nakagawa Y, Shimano H, Higami Y. Association between lysosomal dysfunction and obesity-related pathology: a key knowledge to prevent metabolic syndrome. *Int J Mol Sci* 20: 3688, 2019. doi:10.3390/ijms20153688.
56. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 137–155, 2019. doi:10.1038/s41580-018-0085-z.
57. Pagani F, Garcia R, Pariyarath R, Stuani C, Gridelli B, Paone G, Baralle FE. Expression of lysosomal acid lipase mutants detected in three patients with cholesteryl ester storage disease. *Hum Mol Genet* 5: 1611–1617, 1996. doi:10.1093/hmg/5.10.1611.
58. Park HW, Park H, Semple IA, Jang I, Ro SH, Kim M, Cazares VA, Stuenkel EL, Kim JJ, Kim JS, Lee JH. Pharmacological correction of obesity-induced autophagy arrest using calcium channel blockers. *Nat Commun* 5: 4834, 2014. doi:10.1038/ncomms5834.
59. Pavanello C, Baragetti A, Branchi A, Grigore L, Castelnuovo S, Giorgio E, Catapano AL, Calabresi L, Gomaraschi M. Treatment with fibrates is associated with higher LAL activity in dyslipidemic patients. *Pharmacol Res* 147: 104362, 2019. doi:10.1016/j.phrs.2019.104362.
60. Pericleous M, Kelly C, Wang T, Livingstone C, Ala A. Wolman's disease and cholesteryl ester storage disorder: the phenotypic spectrum of lysosomal acid lipase deficiency. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2: 670 – 679, 2017. doi:10.1016/S2468-1253(17)30052-3.
61. Pingitore P, Romeo S. The role of PNPLA3 in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864: 900 –906, 2019. doi:10.1016/j.bbalip.2018.06.018.
62. Polimeni L, Pastori D, Baratta F, Tozzi G, Novo M, Vicinanza R, Troisi G, Pannitteri G, Ceci F, Scardella L, Violi F, Angelico F, Del Ben M. Spleen dimensions are inversely associated with lysosomal acid lipase activity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Intern Emerg Med* 12: 1159 –1165, 2017. doi:10.1007/s11739-017-1746-1.
63. Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G, et al. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 54: 2419 –2423, 1994.
64. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell* 32: 678 –692, 2015. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.029.
65. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 90: 1383–1435, 2010. doi:10.1152/physrev.00030.2009.
66. Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, Soran H, Hovingh K, Bertolini S, Jones S, Coric M, Calandra S, Hamilton J, Eagleton T, Ros E. Lysosomal acid lipase deficiency—an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis* 235: 21–30, 2014. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.003.
67. Rodriguez-Navarro JA, Kaushik S, Koga H, Dall'Armi C, Shui G, Wenk MR, Di Paolo G, Cuervo AM. Inhibitory effect of dietary lipids on chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 109: E705– E714, 2012. doi:10.1073/pnas.1113036109.
68. Rodriguez-Navarro JAR, Cuervo AM. Dietary lipids and aging compromise chaperone-mediated autophagy by similar mechanisms. *Autophagy* 8: 1152–1154, 2012. doi:10.4161/auto.20649.
69. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 40: 1461–1465, 2008. doi:10.1038/ng.257.
70. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ; NASH CRN. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 52: 894 –903, 2010. doi:10.1002/hep.23759.
71. Salo VT, Ikonen E. Moving out but keeping in touch: contacts between endoplasmic reticulum and lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol* 57: 64 –70, 2019. doi:10.1016/j.ceb.2018.11.002.
72. Salo VT, Li S, Vihinen H, Hölttä-Vuori M, Szkalitsy A, Horvath P, Belevich I, Peränen J, Thiele C, Somerharju P, Zhao H, Santinho A, Thiam AR, Jokitalo E, Ikonen E. Seipin facilitates triglyceride flow to lipid droplet and counteracts droplet ripening via endoplasmic reticulum contact. *Dev Cell* 50: 478 –493.E9, 2019. doi:10.1016/j.devcel.2019.05.016.
73. Sathyanarayan A, Mashek MT, Mashek DG. ATGL promotes autophagy/lipophagy via SIRT1 to control hepatic lipid droplet catabolism. *Cell Reports* 19: 1–9, 2017. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.026.
74. Schneider JL, Suh Y, Cuervo AM. Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metab* 20: 417–432, 2014. doi:10.1016/j.cmet.2014.06.009.
75. Schott MB, Weller SG, Schulze RJ, Krueger EW, Drizyte-Miller K, Casey CA, McNiven MA. Lipid droplet size directs lipolysis and lipophagy catabolism in hepatocytes. *J Cell Biol* 218: 3320 –3335, 2019. doi:10.1083/jcb.201803153.
76. Schroeder B, Schulze RJ, Weller SG, Sletten AC, Casey CA, McNiven MA. The small GTPase Rab7 as a central regulator of hepatocellular lipophagy. *Hepatology* 61: 1896 –1907, 2015. doi:10.1002/hep.27667.
77. Schulze RJ, Drizyte K, Casey CA, McNiven MA. Hepatic lipophagy: new insights into autophagic catabolism of lipid droplets in the liver. *Hepatol Commun* 1: 359 –369, 2017. doi:10.1002/hep4.1056.
78. Scott SA, Liu B, Nazarenko I, Martis S, Kozlitina J, Yang Y, Ramirez C, Kasai Y, Hyatt T, Peter I, Desnick RJ. Frequency of the cholesteryl ester storage disease common LIPA E8SJM mutation (c.894GA) in various racial and ethnic groups. *Hepatology* 58: 958 – 965, 2013. doi:10.1002/hep.26327.
79. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 283–296, 2013. doi:10.1038/nrm3565.
80. Shteyer E, Villenchik R, Mahamid M, Nator N, Safadi R. Low serum lysosomal acid lipase activity correlates with advanced liver disease. *Int J Mol Sci* 17: 312, 2016. doi:10.3390/ijms17030312.
81. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458: 1131–1135, 2009. doi:10.1038/nature07976.
82. Sinha RA, Farah BL, Singh BK, Siddique MM, Li Y, Wu Y, Ilkayeva OR, Gooding J, Ching J, Zhou J, Martinez L, Xie S, Bay BH, Summers SA, Newgard CB, Yen PM. Caffeine stimulates hepatic lipid

metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. *Hepatology* 59: 1366 –1380, 2014. doi:10.1002/hep.26667.

83. Spandl J, Lohmann D, Kuerschner L, Moessinger C, Thiele C. Ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) localizes to lipid droplets and binds the E2 ubiquitin conjugase G2 (Ube2g2) via its G2 binding region. *J Biol Chem* 286: 5599 –5606, 2011. doi:10.1074/jbc.M110.190785.

84. Stöckli J, Zadoorian A, Cooke KC, Deshpande V, Yau B, Herrmann G, Kebede MA, Humphrey SJ, James DE. ABHD15 regulates adipose tissue lipolysis and hepatic lipid accumulation. *Mol Metab* 25: 83–94, 2019. doi:10.1016/j.molmet.2019.05.002.

85. Strebinger G, Müller E, Feldman A, Aigner E. Lysosomal acid lipase deficiency - early diagnosis is the key. *Hepat Med* 11: 79 –88, 2019. doi:10.2147/HMER.S201630.

86. Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 64: 1994 –2014, 2016. doi:10.1002/hep.28820.

87. Tietge UJF, Sun G, Czarnecki S, Yu Q, Lohse P, Du H, Grabowski GA, Glick JM, Rader DJ. Phenotypic correction of lipid storage and growth arrest in wolman disease fibroblasts by gene transfer of lysosomal acid lipase. *Hum Gene Ther* 12: 279 –289, 2001. doi:10.1089/10430340150218413.

88. Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 12: 831–835, 2010. doi:10.1038/ncb0910-831.

89. Tovoli F, Napoli L, Negrini G, D'Addato S, Tozzi G, D'Amico J, Piscaglia F, Bolondi L. A relative deficiency of lysosomal acid lipase activity characterizes non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 18: 1134, 2017. doi:10.3390/ijms18061134.

90. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4: 107–110, 2006. doi:10.1016/j.cmet.2006.06.008.

91. Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, Cohen AR, Davidson MW, Betzig E, Lippincott-Schwartz J. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* 546: 162–167, 2017. doi:10.1038/nature22369.

92. Valverde DP, Yu S, Boggavarapu V, Kumar N, Lees JA, Walz T, Reinisch KM, Melia TJ. ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *J Cell Biol* 218: 1787–1798, 2019. doi:10.1083/jcb.201811139.

93. Velikkakath AKG, Nishimura T, Oita E, Ishihara N, Mizushima N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell* 23: 896 –909, 2012. doi:10.1091/mbc.e11-09-0785.

94. Vespasiani-Gentilucci U, D'Amico J, De Vincentis A, Tozzi G, Vorini F, Gallo P, Carotti S, Valentini F, Galati G, dell'Unto C, Piemonte F, Picardi A. Platelet count may impact on lysosomal acid lipase activity determination in dried blood spot. *Clin Biochem* 50: 726 –728, 2017. doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.02.013.

95. Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, Piemonte F, Riva E, Porcari A, Vorini F, Tozzi G, Piccioni L, Galati G, De Vincentis A, Carotti S, Morini S, D'Amico J, Angeletti S, Pedone C, Picardi A. Lysosomal

- acid lipase activity is reduced both in cryptogenic cirrhosis and in cirrhosis of known etiology. *PLoS One* 11: e0156113, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0156113.
96. Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, Porcari A, Carotti S, Galati G, Piccioni L, De Vincentis A, Dell'Unto C, Vorini F, Morini S, Riva E, Picardi A. The PNPLA3 rs738409 C G polymorphism is associated with the risk of progression to cirrhosis in NAFLD patients. *Scand J Gastroenterol* 51: 967–973, 2016. doi:10.3109/00365521.2016.1161066
98. Walenbergh SMA, Shiri-Sverdlov R. Cholesterol is a significant risk factor for non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 1343–1346, 2015. doi:10.1586/17474124.2015.1092382.
99. Wang C, Liu Z, Huang X. Rab32 is important for autophagy and lipid storage in *Drosophila*. *PLoS One* 7: e32086, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0032086.
100. Wang C, Zhao Y, Gao X, Li L, Yuan Y, Liu F, Zhang L, Wu J, Hu P, Zhang X, Gu Y, Xu Y, Wang Z, Li Z, Zhang H, Ye J. Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology* 61: 870–882, 2015. doi:10.1002/hep.27409.
101. Wang H, Bell M, Sreenevasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, Londos C, Yamaguchi T, Rizzo MA, Coleman R, Gong D, Brasaemle D, Sztalryd C. Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem* 286: 15707–15715, 2011. doi:10.1074/jbc.M110.207779.
102. Wang X, Zhang X, Chu ESH, Chen X, Kang W, Wu F, To KF, Wong VWS, Chan HLY, Chan MTV, Sung JJY, Wu WKK, Yu J. Defective lysosomal clearance of autophagosomes and its clinical implications in nonalcoholic steatohepatitis. *FASEB J* 32: 37–51, 2018. doi:10.1096/fj.201601393R.
103. Wang Y, Kory N, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH. PNPLA3, CGI-58, and inhibition of hepatic triglyceride hydrolysis in mice. *Hepatology* 69: 2427–2441, 2019. doi:10.1002/hep.30583.
104. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lütjohann D, Kerksiek A, van Kruchten R, Maeda N, Staels B, van Bilsen M, Shiri-Sverdlov R, Hofker MH. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48: 474–486, 2008. doi:10.1002/hep.22363.
105. Xu X, So JS, Park JG, Lee AH. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis* 33: 301–311, 2013. doi:10.1055/s-0033-1358523.
106. Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T. CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem* 279: 30490–30497, 2004. doi:10.1074/jbc.M403920200.
107. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22: 124–131, 2010. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014.
108. Zechner R, Madeo F, Kratky D. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18: 671–684, 2017. doi:10.1038/nrm.2017.76.
109. Zhang Z, Yao Z, Chen Y, Qian L, Jiang S, Zhou J, Shao J, Chen A, Zhang F, Zheng S. Lipophagy and liver disease: new perspectives to better understanding and therapy. *Biomed Pharmacother* 97: 339–348, 2018. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.168.
110. Zhou W, Ye S. Rapamycin improves insulin resistance and hepatic steatosis in type 2 diabetes rats through activation of autophagy. *Cell Biol Int* 42: 1282–1291, 2018. doi:10.1002/cbin.11015.

111. Zschenker O, Illies T, Ameis D. Overexpression of lysosomal acid lipase and other proteins in atherosclerosis. *J Biochem* 140: 23–38, 2006. doi:10.1093/jb/mvj137.

112. Zubiete-Franco I, García-Rodríguez JL, Martínez-Uña M, Martínez-Lopez N, Woodhoo A, Juan VG, Beraza N, Lage-Medina S, Andrade F, Fernandez ML, Aldámiz-Echevarría L, FernándezRamos D, Falcon-Perez JM, Lopitz-Otsoa F, Fernandez-Tussy P, Barbier-Torres L, Luka Z, Wagner C, García-Monzón C, Lu SC, Aspichueta P, Mato JM, Martínez-Chantar ML, Varela-Rey M. Methionine and S-adenosylmethionine levels are critical regulators of PP2A activity modulating lipophagy during steatosis. *J Hepatol* 64: 409–418, 2016. doi:10.1016/j.jhep.2015.08.037.

Publicazioni scientifiche

1 Vespasiani-gentilucci u, d'amico j, de vincentis a, tozzi g, Vorini f, gallo p, carotti s, **Valentini F**, galati g, dell'unto c, Piemonte f, picardi a. Platelet count may impact on lysosomal Acid lipase activitydetermination in dried blood spot. *Clin biochem*, 2017

2 Vespasiani-gentilucci u, valentini f, carotti s, vorini f, Zingariello m, francesconi m, galati g, gallo p, de vincentis A,dell'unto c, morini s, picardi a. Hepatic expression of Lysosomal acid lipase is reduced in non-alcoholic Fatty liver disease and inversely associated with the degree of Microvescicular steatosis, impairment of the autophagic process and NAFLD activity score. *Journal of hepatology*, 2017

3 Carotti s, Guarino m, **Valentini F**, porzio s, vespasiani-Gentilucci u, perrone g, zingariello m, cicala m, picardi a, Morini s. Impairment of gh/igf-1 axis in the liver of patients with Hcv-related chronic hepatitis. *Hormone and metabolic research* 2017

4 Vespasiani u, dellunto c, devincentis a, baiocchini a, Dellemonache m, cecere r, pellicelli a, carotti s, galati g, Gallo p, **Valentini F**, delnonno f, rosati d, morini s e picardi a. Combining genetic variants improve risk prediction for nafld And its progression to cirrhosis: a proof of concept Study. *Can j gastroenterol hepatol*, 2018

5 Carotti s, aquilano k, zalfa f, ruggiero s, **Valentini F**, Zingariello m, francesconi m, perrone g, alletto f, antonelli- Incalzi r, picardi a, morini s, lettieri-barbato d, vespasiani-Gentilucci u. Lipophagy impairment is associated with disease progression in NAFLD. *Front. Physiol.*, 2020

6 Carotti s, aquilano k, **Valentini F**, ruggiero s, alletto f, Morini s, picardi a, antonelli-incalzi r, lettieri-barbato d, Vespasiani-gentilucci u. An overview of deregulated lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease with special focus on lysosomal acid lipase. *Am j physiol gastrointest liver Physiol*. 2020

7 Smarrazzo a, mariani r, **Valentini F**, lombardi mh, sinibaldi s, Peschiaroli e, papa re, campana a. Three-fold increase in Admissions for paediatric febrile convulsions

during covid-19 Pandemic could indicate alternative virus symptoms first. *Acta paediatr* 2020

8 **Valentini F**, evangelisti m, arpinelli m, di nardo g, borro m, Simmaco m, villa mp. Gut microbiota composition in children with Obstructive sleep apnoea syndrome: a pilot study. *Sleep med.* 2020

9 Carotti s, lettieri-barbato, d, piemonte f, ruggiero s, rosina M, zalfa f, zingariello m, arciprete f, **Valentini F** et al. Molecular and histological traits of reduced lysosomal acid Lipase activity in the fatty liver. *Cell death dis* 12, 1092. 2021

10 **Valentini F**, rocchi g, vespasiani-gentilucci u, guarino .P.L, altomare a, carotti s. The origins of nafld: the Potential implication of intrauterine life and early postnatal period. *Cells* 11, 562. 2022

Premi e riconoscimenti

Young investigator bursary fornita dalla European Association for the Study of the Liver (EASL). 2017

Partecipazione a congressi nazionali ed internazionali con Abstract e presentazioni

1 The hepatic expression of lysosomal acid lipase (lal) is reduce in Nafld patients, and associated with features of genetically-determined lal deficiency and nafld activity score. Vespasiani- Gentilucci u, **Valentini F**, carotti s, vorini f, zingariello m, Francesconi m, galati g, gallo p, de vincentis a, dell'unto c, morini S, picardi a. 50th annual meeting associazione italiana per lo studio del fegato (Aisf), Roma - 2017

2 Hepatic expression of lysosomal acid lipase is reduced in nafld and inversely associated with the degree of microvescicular steatosis, impairment of the autophagic process and nafld activity score. Vespasiani-gentilucci u, **Valentini F**, carotti s, vorini f, zingariello M, francesconi m, galati g, gallo p, de vincentis a, dell'unto c, Morini s, picardi a. 52nd annual meeting of the european Association for the studyof the liver (easl), amsterdam – 2017

3 **Valentini F**, Andreotti , Molinaro F, Zalfa F, Vespasiani-Gentilucci U, Perrone G, Caggiati A, Carotti S Unmasking a cholestatic signature: autophagy features and bile efflux genes could predict MASLD outcomes. 77° Congresso nazionale SIAI, Genova - 2024

