

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGRADO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

***Una dieta ad alto contenuto di grassi altera precocemente la
trimetilazione epatica di H3K27 mediata da EZH2 in modelli
preclinici in vivo ed in vitro***

Relatore

Prof. Fausto Chiazza

Candidato

Mattia Perucca

Anno Accademico 2023-24

Sessione Autunnale

A mia mamma, che ha vissuto ogni passo di questo percorso come fosse il suo.

A mio papà, che con il suo supporto concreto ha reso tutto questo possibile.

| | |
|--|-----------|
| INTRODUZIONE | 1 |
| SOVRAPPESO E OBESITÀ | 2 |
| CONSEGUENZE DELL'OBESITÀ SULLA SALUTE | 3 |
| FATTORI DI RISCHIO DELL'OBESITÀ | 4 |
| DIETA IPERCALORICA E FEGATO | 5 |
| RUOLO DELL'EPIGENETICA..... | 6 |
| NUTRIZIONE ED EPIGENETICA..... | 6 |
| MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI | 8 |
| H3K27ME3..... | 8 |
| MODULAZIONE DI H3K27ME3 | 10 |
| TAZEMETOSTAT (EPZ-6438)..... | 11 |
| MODELLI ANIMALI DI DIETA IPERCALORICA..... | 12 |
| SCOPO DEL LAVORO | 15 |
| MATERIALI E METODI | 17 |
| MODELLO <i>IN VIVO</i> | 18 |
| <i>Riferimenti normativi.....</i> | 18 |
| <i>Protocollo somministrazione dieta.....</i> | 18 |
| <i>Valutazione della glicemia</i> | 19 |
| <i>Sacrificio degli animali.....</i> | 20 |
| MODELLO <i>IN VITRO</i> | 20 |
| WESTERN BLOT | 21 |
| <i>Isolamento delle proteine</i> | 21 |
| <i>Preparazione dei campioni.....</i> | 21 |
| <i>Elettroforesi su gel.....</i> | 22 |
| <i>Trasferimento su membrana.....</i> | 23 |
| <i>Incubazione della membrana</i> | 24 |
| <i>Analisi dell'immagine.....</i> | 25 |
| <i>Analisi statistica.....</i> | 25 |
| RISULTATI..... | 27 |
| SQUILIBRI METABOLICI INDOTTI DALLA DIETA | 28 |
| <i>Variazione del peso corporeo.....</i> | 28 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Variazione della glicemia</i> | 29 |
| <i>Variazione del peso del fegato</i> | 32 |
| MODIFICAZIONI EPIGENETICHE INDOTTE DALLA DIETA | 33 |
| <i>Modello animale di 8 settimane</i> | 33 |
| <i>Modello animale di 2 settimane</i> | 36 |
| <i>Modello cellulare umano</i> | 38 |
| <i>Valutazione dell'uniformità dei carichi</i> | 40 |
| DISCUSSIONE | 41 |
| CONCLUSIONE | 45 |
| BIBLIOGRAFIA | 47 |

INTRODUZIONE

Sovrappeso e obesità

Sovrappeso e obesità presentano come caratteristica principale un accumulo eccessivo di grasso corporeo ed hanno notoriamente effetti dannosi sul benessere umano, costituendo uno tra i più impattanti problemi di salute pubblica a livello mondiale ¹. La Non-Communicable Diseases Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) ha stimato che nel mondo più di 1 miliardo di persone sono obese e quasi 3 miliardi vivono in una condizione di sovrappeso. Nel 2022, inoltre, rispetto al 1975 i tassi di obesità sono triplicati nelle donne, quadruplicati negli uomini ed aumentati di dieci volte nei bambini e negli adolescenti di età compresa tra i 5 ed i 19 anni. NCD-RisC riporta che 504 milioni di donne, 374 milioni di uomini e 159 milioni di giovani sono colpiti da obesità. Questi dati mostrano come l'incidenza dell'obesità abbia raggiunto una tale crescita da poter essere considerata come una vera e propria pandemia globale ².



Figura 1 Incidenza dell'obesità nel mondo (2022)

Presentation maps | World Obesity Federation Global Obesity Observatory

Ad oggi sovrappeso e obesità vengono principalmente diagnosticate calcolando l'indice di massa corporea (IMC). L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce un adulto in sovrappeso se ha un IMC compreso tra 25 e 29,9 kg/m² ed un adulto obeso se possiede un IMC uguale o superiore a 30 kg/m² ³. Durante l'infanzia e l'adolescenza l'IMC ha un'elevata variabilità correlata all'età ed al sesso. A livello internazionale si considera un bambino o un adolescente obeso se il suo IMC è superiore al 95° percentile ⁴. Tuttavia, l'indice di massa corporea presenta delle limitazioni dal momento che non misura la quantità e la distribuzione del grasso corporeo. Infatti, per effettuare

un corretto inquadramento dell'obesità occorre anche misurare la circonferenza della vita, i cui valori soglia di riferimento sono 80cm per le donne e 94cm per gli uomini, e calcolare il rapporto vita-fianchi. Un eccesso di grasso addominale è strettamente correlato ad un aumento del rischio dell'insorgenza di complicazioni impattanti sulla qualità e sull'aspettativa di vita ³.

Conseguenze dell'obesità sulla salute

Come anticipato, l'obesità è una malattia cronica e progressiva che può essere associata allo sviluppo di numerose complicanze. I soggetti che ne sono affetti presentano un rischio più elevato di sviluppare malattie cardiovascolari (CVD) associate, ad esempio, all'ipertensione arteriosa. Esiste infatti una correlazione diretta tra IMC ed un aumento della pressione, con una prevalenza dell'ipertensione più elevata nei soggetti obesi ⁵. Come noto, l'ipertensione può causare CVD quali ischemie cardiache, cerebrali ed insufficienza cardiaca, che costituiscono la principale causa di ospedalizzazione e mortalità a livello mondiale ⁵.

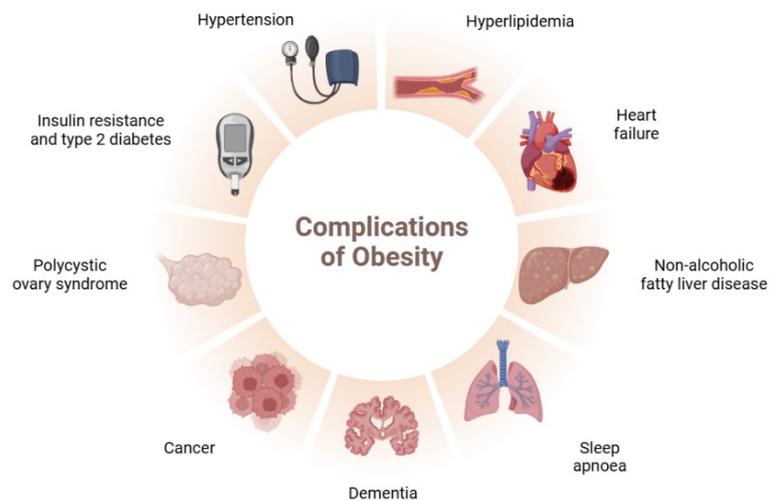


Figura 2 Comorbidità dell'obesità

L'obesità è strettamente interconnessa anche con altre malattie legate al dismetabolismo, tra cui le dislipidemie (ipertrigliceridemia ed ipercolesterolemia) ed il diabete mellito di tipo 2. Anche insulino-resistenza e iperglicemia si possono infatti manifestare come risposta adattativa omeostatica all'aumento dell'adiposità e, di conseguenza, dei livelli degli acidi grassi liberi (FFA). Elevati livelli di FFA stimolano la

gluconeogenesi epatica, ed un loro eccessivo accumulo nel fegato promuove uno stato infiammatorio che contribuisce alla resistenza insulinica ^{6,7}. Inoltre, il deposito di grasso nella cavità toracica ed il connesso stato infiammatorio, hanno effetti dannosi sulla funzione polmonare, causando apnea del sonno ⁸.

Fattori di rischio dell'obesità

L'obesità è causata principalmente da uno squilibrio energetico tra le calorie assunte con la dieta e quelle spese ⁹. Questo squilibrio è il risultato dell'interazione di diversi fattori legati allo stile di vita. Se da un lato, il comportamento alimentare è cambiato sia in termini quantitativi che qualitativi con il progredire dell'industrializzazione, dall'altro, si è osservato un peggioramento delle abitudini individuali, in particolare per quanto riguarda la diffusione di uno stile di vita sedentario ⁹.

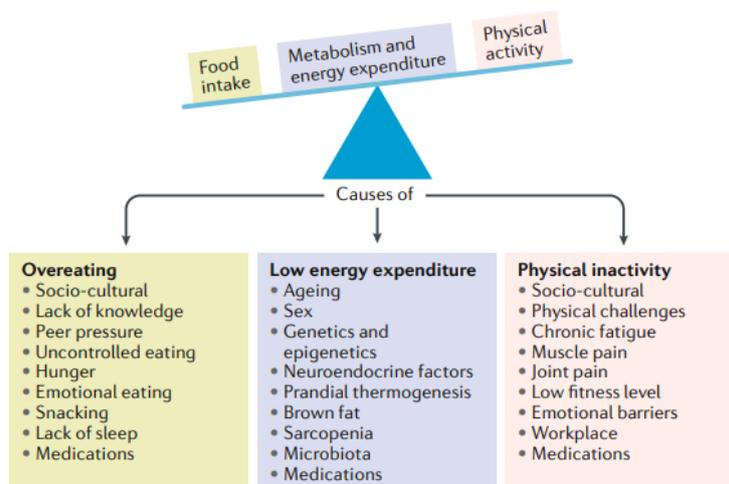


Figura 3 Fattori di rischio dell'obesità

<https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>

Tra i fattori di rischio più rilevanti troviamo quindi l'incremento nel consumo di cibo e l'assunzione di alimenti ipercalorici ed ultra-processati. Tra il 1999 ed il 2016, la composizione dei macronutrienti nella dieta di adulti che vivono, ad esempio, negli Stati Uniti è cambiata in termini proteici o di contenuto di zuccheri, procedendo verso un aumento del consumo di carboidrati complessi (cereali integrali) e di proteine vegetali; nonostante questo, il consumo di grassi saturi è rimasto pressoché invariato, ed al di sopra del livello raccomandato ¹⁰. Per quanto riguarda i paesi in via di sviluppo, al momento si trovano in una fase di 'transizione nutrizionale' che sta provocando un

aumento della morbilità e della mortalità associate a malattie legate all'alimentazione ¹¹, così come accaduto per i paesi occidentali.

Dieta ipercalorica e fegato

Il rischio di sviluppare sovrappeso e obesità è quindi strettamente correlato alle abitudini alimentari. Una dieta ipercalorica ad alto contenuto di grassi contribuisce a provocare un complesso danno multiorgano risultando un fattore di rischio per la salute umana. Tra i vari organi, il fegato è fortemente coinvolto in molteplici funzioni metaboliche, inclusi il metabolismo lipidico e quello glicidico, ed è uno dei tessuti che viene maggiormente colpito da squilibri metabolici ¹². Tra queste alterazioni, una delle principali è la steatosi epatica, ovvero un accumulo eccessivo di lipidi nel fegato ¹². La steatosi epatica è il risultato di uno squilibrio del metabolismo lipidico epatico, coinvolgendo molteplici processi tra cui: l'assorbimento di lipidi derivanti dalla dieta o dal tessuto adiposo, la *de novo* lipogenesi, la β -ossidazione mitocondriale e perossisomiale, e la secrezione dei lipidi ¹³.

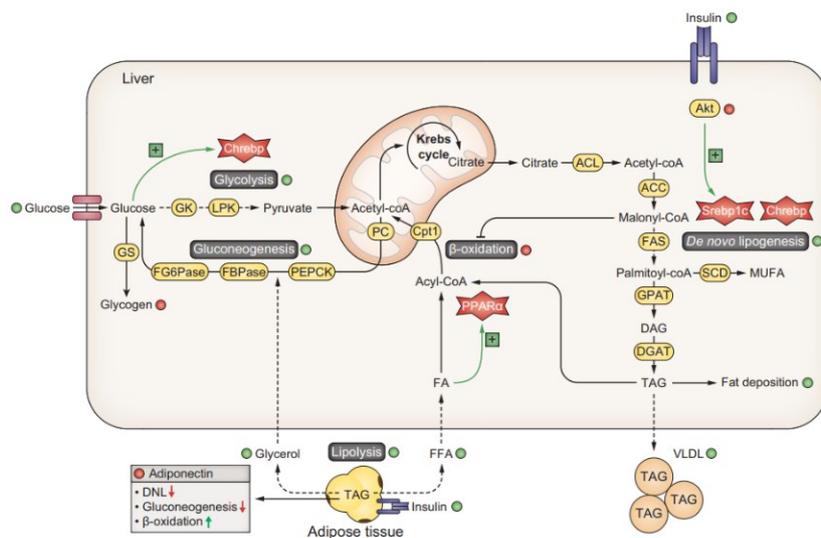


Figura 4 Metabolismo a livello epatico

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Un'assunzione eccessiva di grassi saturi determinerà un accumulo anomalo di lipidi nel fegato e, conseguentemente, una disfunzione nei processi metabolici che coinvolgono il fegato stesso quali un aumento della resistenza all'insulina, l'insorgenza dell'infiammazione ed un incremento del peso dell'organo, con conseguente sviluppo

di un circolo vizioso che porta ad una steatosi non reversibile ^{14,15}. Uno degli aspetti più interessanti di questo processo è che l'accumulo di grassi a livello epatico inizia a manifestarsi già nelle prime fasi dell'assunzione di una dieta ipercalorica, alterando l'omeostasi lipidica nell'organo, in termini di un incremento della lipogenesi, una riduzione della β -ossidazione degli acidi grassi ed una compromissione della secrezione delle lipoproteine a bassissima densità (VLDL) che trasportano i lipidi nel circolo sanguigno ¹⁶.

Ruolo dell'epigenetica

Come già evidenziato in precedenza, un anomalo deposito di FFA e di colesterolo nel fegato provoca l'insorgenza di infiammazione. Infatti, elevati livelli di FFA causano stress ossidativo, danneggiando gli epatociti ed innescando un processo infiammatorio mediato da NF- κ B, che promuove la trascrizione di citochine pro-infiammatorie, come le interleuchine IL-1 β ed IL-6. Inoltre, FFA e colesterolo inducono l'attivazione delle cellule di Kupffer ed il conseguente rilascio di fattori infiammatori (TNF) e fibrotici (TGF- β e PDGF) ¹⁷. In questo processo infiammatorio gioca un ruolo fondamentale anche l'inflammasoma NLRP3, che porta all'attivazione della caspasi-1 e delle interleuchine IL-1 β e IL-18 ¹⁸. I meccanismi che regolano l'infiammazione e la fibrosi a livello epatico si manifestano anch'essi precocemente, prima dello sviluppo di un danno metabolico conclamato, ma quali siano le modifiche apportate da una dieta ipercalorica che contribuiscono al trigger precoce di questi fenomeni è ancora non del tutto delucidato. L'epigenetica può avere un ruolo cruciale in questo contesto, dal momento che può essere rapidamente modulata da una dieta ipercalorica ¹⁶. I meccanismi epigenetici possono promuovere un'infiammazione cronica legata al metabolismo o innescare meccanismi fibrotici, che contribuiscono alla progressione dell'alterazione metabolica, causando effetti a lungo termine. Pertanto, l'epigenetica può essere considerata uno tra i fattori coinvolti nella cosiddetta 'memoria metabolica' ¹⁹.

Nutrizione ed epigenetica

La nutriepigénomica è un'emergente area di ricerca che studia la correlazione tra nutrizione ed epigenetica. Quest'ultima include tutte quelle modificazioni ereditabili che

senza alterare la sequenza nucleotidica del DNA modificano l'espressione genica. Recenti studi hanno avvalorato l'ipotesi che un'assunzione cronica di una dieta ad alto contenuto di grassi possa alterare rapidamente i meccanismi epigenetici e quindi modulare precocemente i programmi di espressione genica coinvolti nella progressione dei disturbi metabolici, come l'obesità ed il diabete mellito di tipo 2 ¹⁶. Le modificazioni epigenetiche più ampiamente studiate che sembrano coinvolgere l'accumulo di lipidi, l'insulino resistenza, l'infiammazione, lo stress ossidativo, la fibrosi, sono la metilazione del DNA, le modificazioni post-traduzionali degli istoni (metilazione ed acetilazione) e gli RNA non codificanti ²⁰.

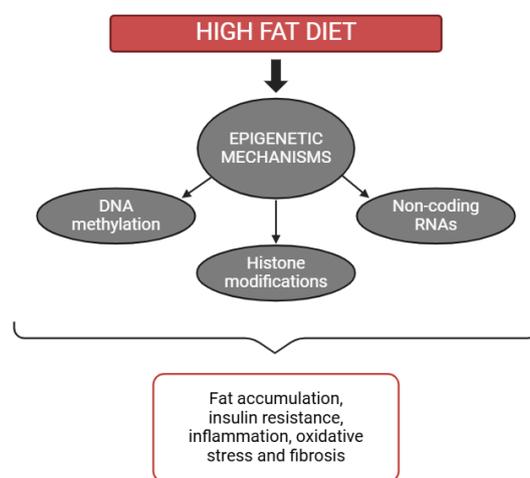


Figura 5 Meccanismi epigenetici indotti dalla dieta

Il processo di metilazione del DNA prevede il legame covalente di un gruppo metile ad una citosina, specialmente nei siti CpG, ed è catalizzato da una famiglia di enzimi chiamata DNA metiltransferasi. Questa modifica chimica si verifica soprattutto nelle isole CpG, regioni genomiche associate ai promotori, di conseguenza, interferisce con la trascrizione genica. L'obesità è associata ad alterazioni nello stato di metilazione di geni che regolano il metabolismo glicidico (adiponectina) e la sensibilità all'insulina (IRS1) ²⁰. Gli RNA non codificanti sono molecole di RNA che non vengono tradotte in proteine, ma hanno un ruolo nella regolazione post-trascrizionale. Nel contesto dell'obesità, i microRNA (miRNA) sono i più studiati, in particolare miR-122 è il più espresso a livello epatico (circa 70%) e la sua espressione è sovraregolata negli epatociti di topi alimentati con una dieta ipercalorica ad alto contenuto di grassi ²¹.

Modificazioni post-traduzionali

Le modificazioni a carico degli istoni sono tra le più studiate nella modulazione dell'espressione genica in campo metabolico ²². Gli istoni sono proteine di natura basica che interagiscono con il DNA. Le proteine istoniche svolgono un importante ruolo strutturale, costituendo la struttura portante del nucleosoma e permettono la compattazione del DNA, e quindi la regolazione dell'espressione genica. Le code N-terminali sono costituite da amminoacidi (lisine ed arginine) che possono essere soggetti a modificazioni epigenetiche operate da specifici enzimi. Queste modificazioni post-traduzionali includono la metilazione, marcatore epigenetico repressivo che silenzia la trascrizione genica, e l'acetilazione che invece aumenta l'attività dei geni correlati ²². Gli istoni possono essere metilati ed acetilati in diverse posizioni, tra queste, la trimetilazione della lisina 27 dell'istone 3 (H3K27me3) è tra le più interessanti in ambito metabolico ed epatico, essendo coinvolta nella patogenesi di diverse malattie, tra cui la steatosi e la fibrosi epatica ²³. H3K27me3 è noto per svolgere un ruolo chiave nella regolazione negativa di molti marcatori antifibrotici ²⁴. Tra i vari geni soppressi da H3K27me3 troviamo ad esempio Smad7 (Small mothers against decapentaplegic 7) e Dkk1 (Dickkopf-related protein 1) che inibiscono il segnale profibrotico mediato da TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) ^{25,26} e Wnt (Wingless/Int-1) ^{27,28}. Inoltre, H3K27me3 reprime anche geni antinfiammatori come l'interleuchina IL-10 ²⁹, dimostrandosi coinvolto anche nello sviluppo di processi infiammatori.

H3K27me3

H3K27me3 è una modificazione post traduzionale che è stata ampiamente studiata nella cancerogenesi e di cui è stato dimostrato il suo utilizzo come marcatore epigenetico tumorale ³⁰. Questa trimetilazione è catalizzata dalla metiltransferasi EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), subunità catalitica del Complesso Repressivo Polycomb 2 (PRC2). EZH2 è strutturata in cinque domini: il dominio EBD di interazione con EED, il dominio I la cui funzione non è nota, il dominio II di interazione con SUZ12, il dominio CXC ricco di cisteine ed il dominio catalitico SET ³¹. Il nucleo di PRC2 è composto da tre subunità: EZH2 con attività metiltransferasica, EED necessaria per l'attività catalitica e SUZ12 che costituisce l'impalcatura del complesso. L'estremità N-

terminale di SUZ12 interagisce con diverse proteine, tra cui RBBP4/7 e AEBP2, che favoriscono il legame di PRC2 con la cromatina e stimolano l'attività catalitica ³².

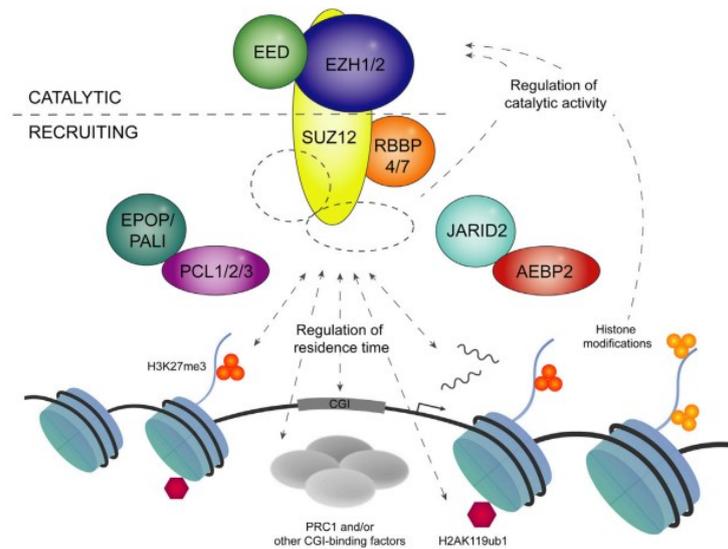


Figura 6 Complesso Repressivo Polycomb 2
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.011>

EZH2 promuove H3K27me3, che provoca un rimodellamento della cromatina, portando alla sua compattazione ed al conseguente silenziamento genico. Recentemente, è stato messo in evidenza il ruolo di EZH2 nell'indurre infiammazione e fibrosi, attraverso la regolazione epatica di geni antinfiammatori ed antifibrotici ³³. Recenti studi hanno rivelato che l'espressione di EZH2 è aumentata nelle cellule stellate epatiche (HSCs) attivate rispetto a quelle quiescenti, suggerendo che le HSCs svolgono un ruolo fondamentale nella fibrosi epatica ³⁴. Il trattamento con un inibitore di EZH2 potrebbe prevenire la transdifferenziazione di HSCs in cellule simili ai fibroblasti (MFBs), attraverso il ripristino dell'espressione di geni antifibrotici Dkk1 ^{29,35}. Inoltre, è stato dimostrato che l'inibizione di EZH2 riduce l'infiammazione e la fibrosi epatica in modelli preclinici di steatoepatite non alcolica ³⁶. Altri importanti protagonisti nella formazione di H3K27me3 sono le demetilasi istoniche KDMs e le sirtuine SIRT. KDMs (Lysine Demethylase) catalizzano la rimozione dei gruppi metilici dai residui di lisina presenti sulle code N-terminali degli istoni. La demetilazione degli istoni altera la struttura della cromatina e, di conseguenza, regola la trascrizione genica. L'espressione anomala delle KDMs è fortemente legata allo sviluppo di malattie, tra cui la fibrosi epatica ³⁷. Il processo fibrotico è associato al livello di metilazione di H3K27, il quale è regolato sia dalla metiltransferasi EZH2 che dalle demetilasi

istoniche. KDM6B demetila H3K27me3, provocando la decondensazione della cromatina ed inducendo l'attivazione dei geni profibrotici ²⁴.

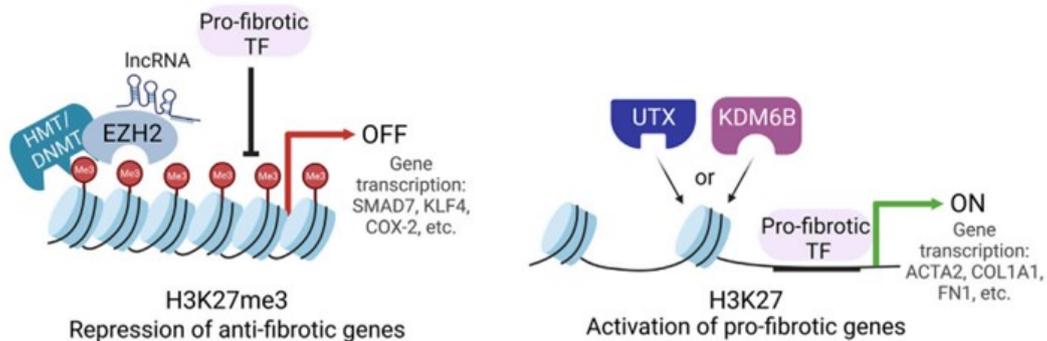


Figura 7 Regolazione del processo fibrotico

doi: 10.3389/fcell.2023.1193344

SIRT6 sono deacetilasi NAD-dipendenti che regolano vie di segnalazione coinvolte in numerosi processi biologici, tra cui il metabolismo, l'infiammazione e lo stress ossidativo. Cambiamenti nell'espressione e nell'attività delle SIRT6 sono correlati molteplici malattie, incluse la steatoepatite non alcolica e l'insufficienza epatica ³⁸. Studi hanno evidenziato che SIRT1 regola l'espressione di EZH2 a livello proteico, riducendo la stabilità e, di conseguenza, modulando i suoi effetti repressivi ³⁹.

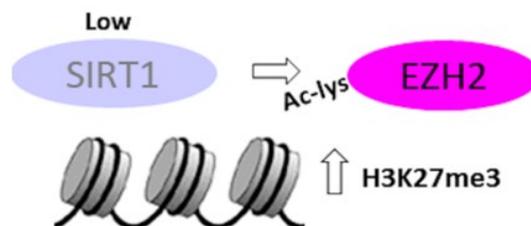


Figura 8 Regolazione a monte di EZH2/H3K27me3

doi: 10.3389/fonc.2021.678447

Modulazione di H3K27me3

Il blocco dell'attività metiltransferasica può avvenire in due modi: inibendo la metiltransferasi EZH2 o interferendo con la formazione del complesso PRC2. Gli inibitori di EZH2 possono agire indirettamente inibendo la S-adenosil-L-omocisteina (SAH) idrolasi o direttamente competendo con la S-adenosil-metionina (SAM) ⁴⁰. Gli inibitori indiretti, tra cui troviamo DZNep (3-Deazaneplanocin), provocano un aumento dei livelli di SAH e, di conseguenza, riducono la disponibilità della S-adenosil-metionina (SAM), causando una diminuzione della metilazione di H3K27 ⁴¹. Invece, gli

inibitori diretti di EZH2, come GSK126, occupano la tasca di legame per SAM presente nel dominio catalitico SET ed inibiscono EZH2 ⁴².

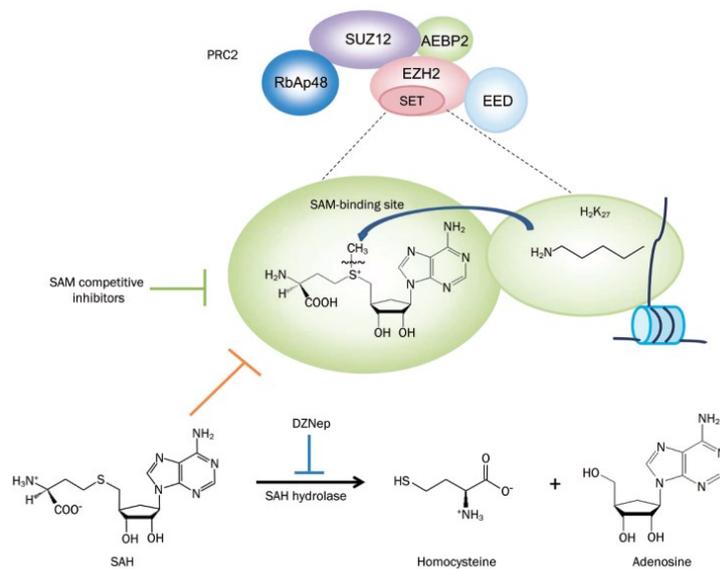


Figura 9 Inibitori della metiltransferasi EZH2

doi: 10.1038/aps.2013.161

SAM è un coenzima che si associa ad EZH2 ed è coinvolto nel trasferimento dei gruppi metilici. SAH è il metabolita prodotto al termine della reazione di metilazione che successivamente viene idrolizzato in adenosina ed omocisteina. Quest'ultima viene convertita in metionina che sarà utilizzata per ripristinare SAM ⁴³.

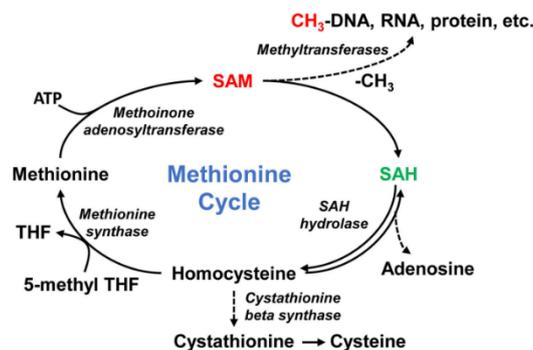


Figura 10 Ciclo della metionina

doi: 10.1016/j.aca.2021.338873

Tazemetostat (EPZ-6438)

EPZ-6438 è il primo inibitore di EZH2 che è stato recentemente approvato negli Stati Uniti dalla FDA (Food and Drug Administration) sia per il trattamento del sarcoma

questi animali. I risultati di questa ricerca mostrano che solo cinque ceppi di topi (C57BL/6J, AKR/J, A/J, C3H/HeJ e DBA/2J) sono inclini a sviluppare adiposità, mentre negli altri tre ceppi (SJL/J, I/STN e SWR/J) non si sono osservati cambiamenti significativi ⁴⁹. Questo studio ha rivelato inoltre che i topi maschi C57BL/6J sono tra i più suscettibili allo sviluppo di sovrappeso ed insulino resistenza ⁴⁹. In aggiunta, è preferibile l'utilizzo di topi maschi poiché, rispetto alle femmine, hanno una minore protezione contro l'accumulo di grasso indotto dalla dieta, dovuta a differenze sia ormonali che nella composizione del microbiota intestinale ^{50,51}. Nella scelta della dieta ipercalorica, invece, è importante tenere in considerazione la sua composizione, in termini di distribuzione calorica e natura dei macronutrienti. Il contenuto di grassi nelle diete sperimentali è considerato tra i principali fattori responsabili dell'incremento del peso, fornendo il 45% o il 60% delle calorie totali sotto forma di lipidi, ma vengono somministrate anche diete ad alto contenuto di zuccheri ⁴⁹.

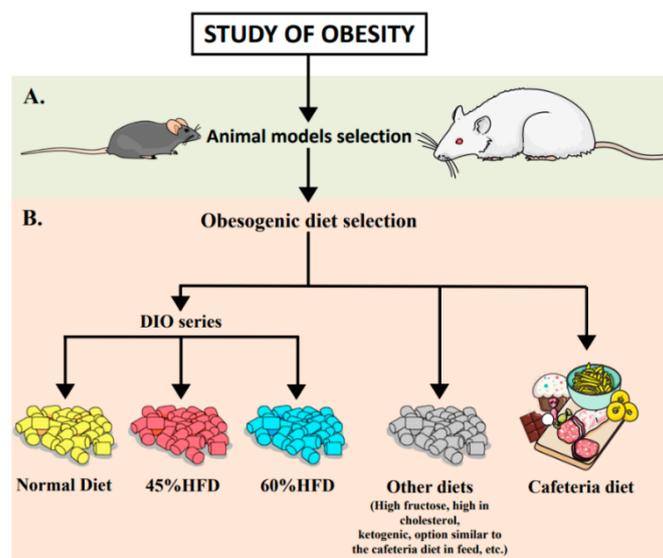


Figura 12 Modelli animali di dieta ipercalorica

doi: 10.3390/nu12113234

Le diete al 60% di calorie da lipidi non rispecchiano adeguatamente la dieta occidentale che invece contiene circa il 36/40% di grassi. Tuttavia, queste diete sono molto utilizzate negli studi preliminari, dal momento che accelerano lo sviluppo di sovrappeso e, pertanto, riducono i tempi ed i costi della sperimentazione ⁵². Numerosi studi hanno dimostrato che la somministrazione di una dieta ipercalorica ad alto contenuto di grassi (60%, HFD) inizia a produrre i primi segni di sovrappeso a partire

dalla quinta settimana di somministrazione ¹². Differenze nei livelli di glicemia, tra topi alimentati con HFD e quelli nutriti con una dieta standard, diventano rilevanti dopo 8 settimane ⁵³. Invece, una breve somministrazione di una o due settimane con HFD non sembra essere sufficiente per produrre variazioni nel peso e nella glicemia ¹⁴. Tuttavia, questo non implica che non si osservino già precoci influenze sul metabolismo. In uno studio del 2014, Chiazza et al. hanno dimostrato che 1 settimana di somministrazione di HFD non alterava peso e glicemia. Tuttavia, andando ad analizzare l'omeostasi glicidica mediante ipGTT (intra peritoneal glucose tolerance test), si riscontravano minime differenze tra i topi alimentati con HFD e quelli nutriti con una dieta standard (SD), a dimostrare un'iniziale influenza della dieta sul metabolismo di questi animali. Queste differenze sono state rilevabili solo poiché valutate con ipGTT, una modalità di valutazione dell'insulino-resistenza in grado di rivelare differenze estremamente piccole. In questo stesso studio, un lungo periodo di recupero (8 settimane) con SD non è stato sufficiente a normalizzare completamente le alterazioni osservate dopo una settimana di HFD. Pertanto, una breve esposizione ad HFD può avere effetti duraturi sull'organismo dell'animale ¹⁴. Tuttavia, non è ancora chiaro quali siano i fenomeni precoci che scatenano queste conseguenze a lungo termine e quanto precocemente si manifestino. Noi ipotizziamo che H3K27me3 possa avere un ruolo cruciale in questo contesto, andando a silenziare precocemente geni coinvolti nel metabolismo/infiammazione/fibrosi.

SCOPO DEL LAVORO

L'obesità rappresenta oggi una tra le principali problematiche di salute pubblica a livello globale, con impatti significativi sul benessere delle persone, ma anche sull'economia dei singoli paesi. Questa condizione, caratterizzata da un eccesso di grasso corporeo, colpisce più di 1 miliardo di persone, ed è associata ad un aumento del rischio di sviluppare complicanze, come malattie cardiovascolari e dismetaboliche. Le cause dell'obesità sono da attribuire a vari aspetti, tra cui fattori ambientali, comportamentali, socioeconomici e genetici. L'obesità ha un impatto diretto sull'omeostasi epatica, poiché il fegato è fortemente coinvolto nel metabolismo lipidico e glicidico. Questa influenza può favorire lo sviluppo di steatosi e fibrosi epatica, condizioni che possono progredire in cirrosi ed aumentare il rischio di cancro al fegato.

Uno degli aspetti più interessanti dell'accumulo di lipidi a livello epatico è il fatto che questo processo inizia a manifestarsi già nelle prime fasi dell'assunzione di una dieta ipercalorica, prima dello sviluppo di un sovrappeso conclamato. I meccanismi che regolano le prime fasi di danno d'organo legato all'assunzione di una dieta ipercalorica non sono ancora del tutto delucidate, ma l'epigenetica potrebbe avere un ruolo cruciale in questo contesto.

Il nostro studio mira a determinare se l'asse EZH2/H3K27me3 possa rappresentare un marcatore epigenetico precoce di compromissione epatica, in seguito all'assunzione di una dieta ipercalorica. In particolare, indagheremo la correlazione tra l'insorgenza di uno squilibrio metabolico e la modulazione di H3K27me3 in un modello preclinico *in vivo* di dismetabolismo indotto da una dieta ad alto contenuto di grassi. In questo studio ci porremo in due condizioni di alterazione metabolica: una conclamata (8 settimane di alimentazione con HFD) per valutare un'eventuale correlazione sovrappeso-alterazioni dell'espressione di H3K27me3, e una più precoce (2 settimane di alimentazione con HFD) per cercare di comprendere quanto precocemente si manifesti questa correlazione. Successivamente, proveremo a capire se la modulazione di H3K27me3 ha un nesso causale con l'insorgenza dell'alterazione metabolica partendo da un modello preclinico *in vitro* di steatosi epatica.

MATERIALI E METODI

Modello *in vivo*

Riferimenti normativi

La cura e la manipolazione degli animali sono state eseguite in conformità con la legge italiana sulla cura degli animali (D.L. 26/2014), nonché con la Direttiva Europea (2010/63/EU) e approvate dall'Organismo Preposto al Benessere Animale (OPBA) dell'Università del Piemonte Orientale (UPO), Novara, Italia. Topi maschi C57BL/6J di 4 settimane di età sono stati utilizzati in questo studio. I topi, tenuti 3-5 per gabbia con accesso ad acqua e cibo ad libitum, sono stati alloggiati in una stanza con luce (12 ore di luce e 12 ore di buio) e temperatura (22-24°C) controllate. Le gabbie per la stabulazione (Thoren Caging Systems) possiedono filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air) e si trovano presso la struttura per gli animali dell'UPO.



Figura 13 Topo C57BL/6J

C57BL/6 Mice Datasheet | Charles River (criver.com)



Figura 14 Gabbia di stabulazione

<http://www.animaletics.org.au>

Protocollo somministrazione dieta

Venti topi sono stati suddivisi casualmente in quattro gruppi, ai quali è stata somministrata una dieta di mantenimento normocalorica (13% di calorie da lipidi) in modo tale da abituarli ad una dieta raffinata. Dopo una settimana (5 settimane di età), i gruppi SD2w (n=5) e SD8w (n=5) hanno continuato a ricevere la dieta di controllo rispettivamente per 2 o 8 settimane, mentre ai gruppi HFD2w (n=5) e HFD8w (n=5) è stata somministrata una dieta ipercalorica ad alto contenuto di grassi (60% di calorie da lipidi) sempre per 2 o 8 settimane. Per l'intera durata dello studio, il peso corporeo, il cibo e l'acqua assunti da ogni topo sono stati registrati settimanalmente.

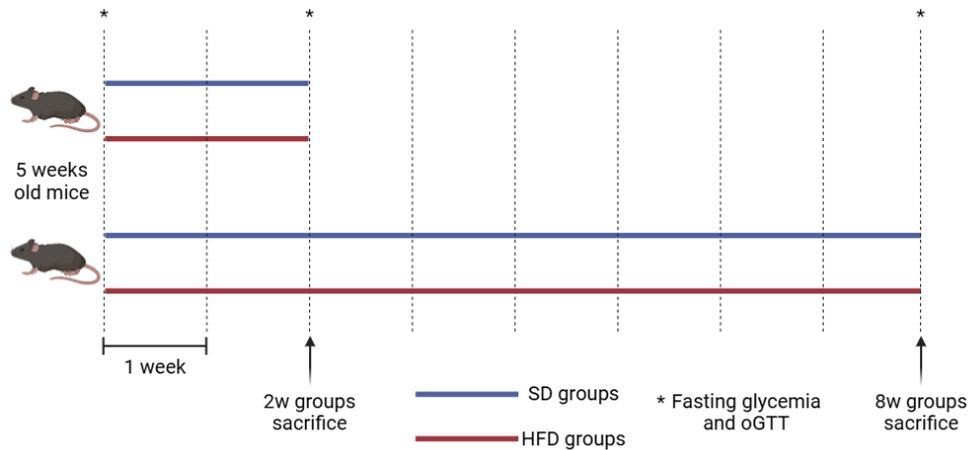


Figura 15 Rappresentazione cronologica del disegno sperimentale

Valutazione della glicemia

Glicemia ed oGTT (oral glucose tolerance test) sono stati valutati a livello basale, alla seconda ed all'ottava settimana per definire alterazioni del metabolismo glicidico indotte dalla somministrazione della dieta. L'oGTT ha lo scopo di valutare la capacità dell'organismo di mantenere normali livelli di glucosio nel sangue dopo l'assunzione di zuccheri. Il prelievo è stato effettuato pungendo la vena laterale caudale con un ago. Le gocce di sangue sono state raccolte su una striscia reattiva inserita nel dispositivo GlucoMen Areo 2K (Menarini) per la misurazione della glicemia a digiuno. Per il test di tolleranza al glucosio, dopo misura della glicemia a digiuno, ad ogni topo è stata somministrata mediante gavage una soluzione glucosata al 30% p/V (2g glucosio su Kg peso corporeo). Le concentrazioni plasmatiche di glucosio sono state misurate 15, 30, 60 e 120 minuti dopo la somministrazione della soluzione glucosata.

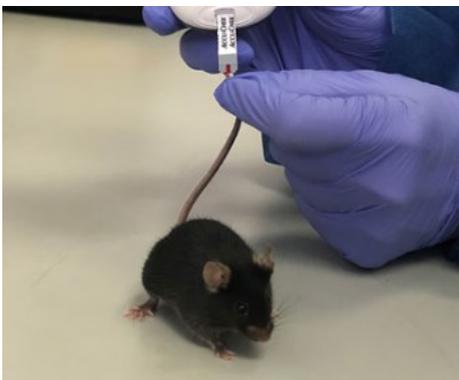


Figura 16 Misurazione glicemia
<http://www.springer.com/series/7651>



Figura 17 Gavage gastrico
 doi: 10.3791/53770

Sacrificio degli animali

Al termine della seconda settimana i topi dei gruppi SD2w e HFD2w sono stati sacrificati, mentre dopo l'ottava settimana quelli appartenenti ai gruppi SD8w e HFD8w. I topi sono stati anestetizzati con isoflurano ed eutanizzati mediante prelievo intracardiaco. Durante i sacrifici il fegato di ogni topo è stato prelevato, congelato in azoto liquido e conservato per le analisi successive.

Modello *in vitro*

Questo esperimento è stato svolto in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Lim. Cellule di epatocarcinoma umane HUH-7 sono state trattate per 24 ore con acido palmitico (PA) 100 μ M al fine di sviluppare un modello *in vitro* di una dieta ad alto contenuto di lipidi. Parte delle cellule sono state poi trattate per 24 ore con EPZ-6438 (Tazemetostat) 3.3 μ M, un inibitore selettivo di EZH2. Successivamente le cellule sono state lavate con un tampone fosfato salino (PBS) e scraperate per analisi biomolecolari o fissate in paraformaldeide (PFA) 4%⁵⁴.

Western Blot

Isolamento delle proteine

Un frazionamento cellulare è stato eseguito su tessuti epatici murini e su cellule HUH-7 al fine di separare proteine nucleari e citosoliche. I tessuti vengono lisati mediante potter in un tampone A composto da NP40 1%, HEPES 10mM pH7.9, KCl 10mM, EDTA 0.1mM ed EGTA 0.1mM, insieme ad un cocktail di inibitori di proteasi costituito da Leupeptina 10µg/ml, Pepstatina 4µg/ml ed Aprotinina 0.1unità/ml. Mentre le cellule vengono lisate mediante siringa da insulina nello stesso tampone A compreso di inibitori di proteasi. A questo punto si procede in modo univoco. Gli omogenati vengono centrifugati a 4°C a 1300/2000g per 5 minuti e si ottengono un pellet che corrisponde ai nuclei interi ed un surnatante corrispondente alle proteine citosoliche. Queste ultime vengono purificate mediante centrifugazione ulteriore a 4°C a 13000g per 30 minuti. I nuclei pellettati vengono lavati con un tampone B composto da HEPES 20mM pH7.9, NaCl 0.4M, EDTA 1mM ed EGTA 1mM, ed immediatamente centrifugati a 4°C a 13000g per 5 minuti per un totale di 5 volte. Questi vengono poi lisati mediante sonicazione a 0.2Hz per 5 secondi nel tampone B compreso di inibitori di proteasi per almeno 5 volte e vengono incubati in ghiaccio per 20 minuti. Infine, le proteine nucleari vengono purificate mediante centrifugazione ulteriore a 4°C a 13000g per 15 minuti.

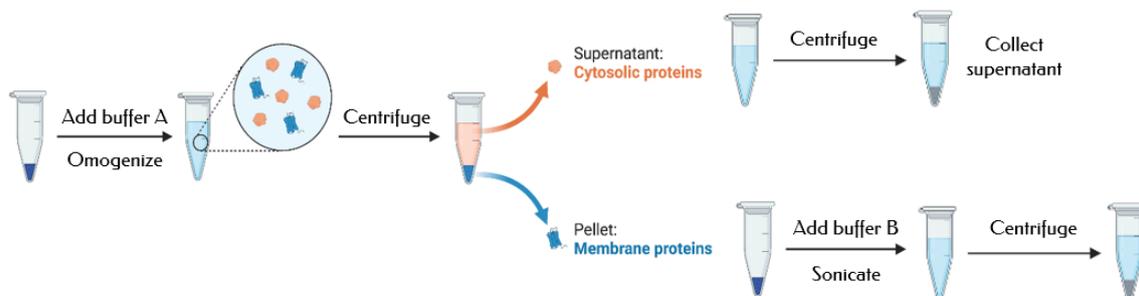


Figura 18 Protocollo per l'isolamento delle proteine

Preparazione dei campioni

Le proteine nucleari e citosoliche sono state quantificate allo spettrofotometro attraverso il saggio di Bradford. Alle proteine da analizzare viene aggiunto il colorante blu di Coomassie R-250, il quale forma complessi legandosi a queste; quindi, determina un cambio di colorazione da marrone a blu ed uno spostamento dello spettro di assorbimento massimo a 595nm. La quantificazione consente di preparare campioni

con una quantità uniforme di proteine. Successivamente ai campioni viene addizionato un tampone di caricamento costituito da Tris HCl 250mM pH6.8, 10% SDS, 30% glicerolo, 5% β -mercaptoetanololo, acqua deionizzata e una punta di blu di bromofenolo. Questi vengono riscaldati a 100°C per 3 minuti e centrifugati per 10 secondi.

Elettroforesi su gel

Un gel di acrilammide bifasico viene fatto polimerizzare in una camera delimitata da due vetrini montati su un apposito supporto. Inferiormente viene preparato il resolving gel composto da acqua deionizzata, Tris HCl 1.5M pH8.8, SDS 10%, acrilammide/bis-acrilammide in rapporto 30:0.8, APS e TEMED. Il principale fattore di separazione è la percentuale di acrilammide/bis-acrilammide nel gel. Concentrazioni maggiori consentono la separazione di proteine a basso peso molecolare, mentre concentrazioni minori si utilizzano per la separazione di proteine ad alto peso molecolare. I gel che sono stati utilizzati sono quelli al 15% ed al 8%. Superiormente viene preparato lo stacking gel composto da acqua deionizzata, Tris HCl 0.5M pH6.8, SDS 10%, acrilammide/bis-acrilammide, APS e TEMED, nel quale viene inserito un pettine per la creazione dei pozzetti. Lo stacking gel garantisce l'ingresso delle proteine all'interno del gel stesso, così da permettere una migliore separazione quando accedono al resolving gel.

| Gel | Resolving 8% | Resolving 15% | Stacking |
|------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| H ₂ O | 6.7ml | 3.35ml | 3ml |
| Tris HCl | 3.4ml | 3.4ml | 1.25ml |
| SDS 10% | 150 μ l | 150 μ l | 50 μ l |
| Acrilammide | 3.7ml | 7.05ml | 500 μ l |
| APS | 100 μ l | 100 μ l | 50 μ l |
| TEMED | 10 μ l | 10 μ l | 5 μ l |

Figura 19 Composizione resolving e stacking gel

Successivamente viene allestita una camera per la corsa elettroforetica, nella quale viene posizionato il gel e viene versato un tampone di corsa costituito da acqua deionizzata, glicina, Tris e SDS. A questo punto il pettine viene rimosso, i campioni ed un marcatore di peso molecolare vengono caricati nei pozzetti mediante una siringa Hamilton. Il marker contiene proteine ricombinanti marcate con coloranti, i cui pesi

molecolari sono noti. Infine, viene avviata la corsa elettroforetica con un voltaggio iniziale di 90V o 100V fino all'uscita delle proteine dai pozzetti, quando viene rispettivamente aumentato a 110V e 150V.

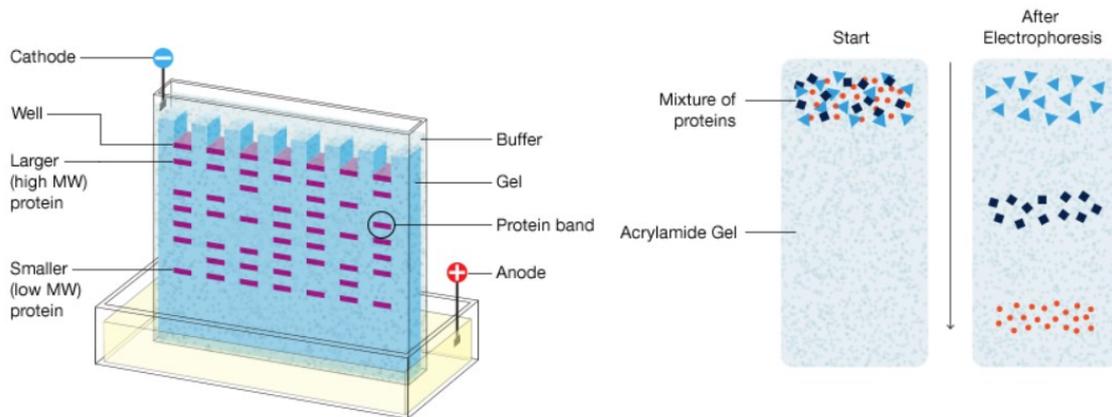


Figura 20 Elettroforesi su gel di poliacrilammide
Western Blotting Electrophoresis Techniques | Bio-Rad

Trasferimento su membrana

Le proteine vengono trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa tramite un sistema semi-dry. Innanzitutto, il gel e la membrana vengono equilibrati in un tampone di trasferimento costituito da acqua deionizzata, Tris, glicina, SDS 10% e metanolo. Poi viene assemblato un sandwich, posizionando insieme il gel e la membrana tra due strati di carta da filtro imbevuti di tampone, al quale viene applicato un campo elettrico con un voltaggio di 10V per 40 minuti. Successivamente la membrana viene colorata con una soluzione rossa composta da acqua deionizzata, TCA e Ponceau S al fine di verificare l'effettivo trasferimento, e viene acquisita un'immagine con il sistema di imaging ChemiDoc™ Touch della BIO-RAD.

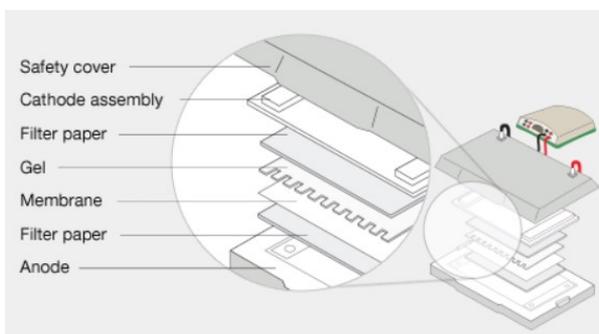


Figura 21 Trasferimento su membrana di nitrocellulosa

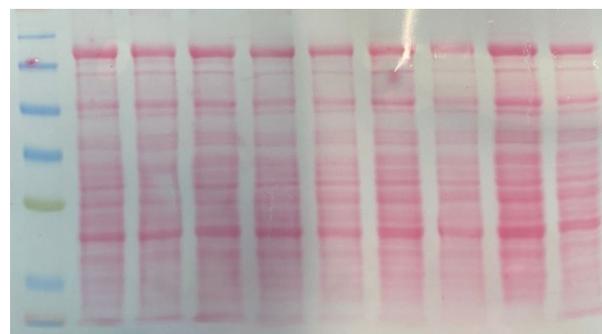


Figura 22 Colorazione membrana di nitrocellulosa con Red Ponceau

Western Blotting Transfer Techniques | Bio-Rad

Incubazione della membrana

La membrana viene lavata con PBS 1x fino alla scomparsa della colorazione del Ponceau e viene incubata a 37°C per almeno un'ora in una soluzione al 5% di BSA in PBS per bloccare i siti aspecifici. Viene poi incubata a 4°C over night in una soluzione al 1% di BSA in PBS contenente l'anticorpo primario selettivo per la proteina d'interesse. Gli anticorpi primari che sono stati utilizzati sono:

- anti-H3K27me3 (Mouse pAb diluizione 1:1000),
- anti-H3 (Rabbit mAb diluizione 1:2000),
- anti-EZH2 (Rabbit pAb diluizione 1:1000),
- anti-KDM6B (Rabbit mAb diluizione 1:250),
- anti-SIRT1 (Rabbit pAb diluizione 1:1000).

Il giorno seguente la membrana viene lavata con PBS Tween 0.3% per eliminare i legami aspecifici e viene incubata per due ore in una soluzione al 1% di BSA in PBS contenente l'anticorpo secondario che riconosce il primario ed è coniugato con HRP. Gli anticorpi secondari che sono stati utilizzati sono anti-Mouse e anti-Rabbit. Viene nuovamente lavata con PBS Tween 0.3% e viene sviluppata in una soluzione composta da luminolo, H₂O₂ e soluzione A (soluzione al 1% di acido cumarico in DMSO). In presenza di perossido d'idrogeno, la perossidasi del rafano ossida il luminolo, il quale emette chemiluminescenza che viene rilevata dal sistema di imaging ChemiDoc™ Touch della BIO-RAD.

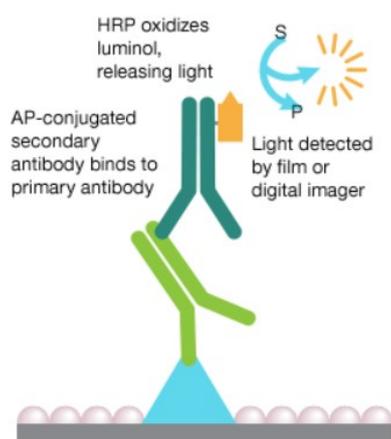


Figura 23 Emissione chemiluminescenza

Western Blotting Immunodetection Techniques | Bio-Rad

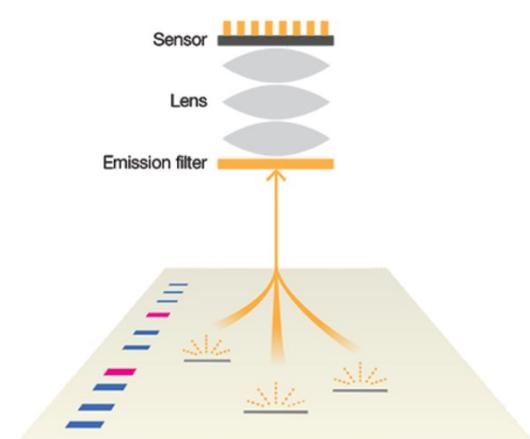


Figura 24 Rilevamento chemiluminescenza

Image Acquisition for Western Blotting | Bio-Rad

Analisi dell'immagine

Le immagini acquisite sono state analizzate con il software Image Lab. Le bande proteiche presenti su ogni immagine sono state quantificate attraverso un'analisi densitometrica. Ogni banda è composta da pixel caratterizzati da tre dimensioni: larghezza, lunghezza ed intensità; pertanto, la densità di banda viene calcolata come la somma dei volumi dei rispettivi pixel. I volumi delle bande sono direttamente proporzionali all'espressione delle proteine. Analizzando le immagini è quindi possibile determinare se l'espressione di una proteina d'interesse in un determinato campione è aumentata o diminuita rispetto ad un altro campione.



Figura 25 Banda proteica

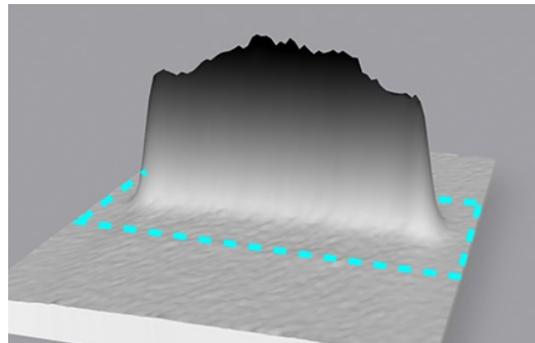


Figura 26 Volume della banda proteica

Image Analysis and Quantitation for Western Blotting | Bio-Rad

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il software GraphPad Prism 8. Il test statistico che è stato condotto è il test t con lo scopo di verificare se il valore numerico medio di un parametro discosta significativamente tra due gruppi di campioni. Per la valutazione del peso corporeo e dell'oGTT, è stata svolta un'analisi ANOVA a due vie con Dunnet's post test. È stato valutato come statisticamente significativo un risultato con un valore di p (probabilità che l'ipotesi sia vera) inferiore a 0,05.

RISULTATI

Squilibri metabolici indotti dalla dieta

Variatione del peso corporeo

Durante le otto settimane dello studio, il peso corporeo ed il consumo di cibo ed acqua per ogni topo sono stati registrati settimanalmente. Il peso corporeo è stato il primo parametro preso in considerazione per definire l'impatto che la dieta ipercalorica ha sull'organismo. Il grafico in figura 1 mostra per l'intera durata dello studio un aumento del peso maggiore nei topi alimentati con una dieta ipercalorica ad alto contenuto di grassi (HFD), rispetto a quelli nutriti con una dieta di mantenimento normocalorica (SD). Questa differenza di incremento del peso diventa statisticamente significativa a partire dalla quinta settimana di somministrazione della dieta. Nel grafico si osserva che all'inizio dello studio, ovvero in condizioni basali prima dell'inizio del protocollo dietetico, il peso risulta uguale in entrambi i gruppi.

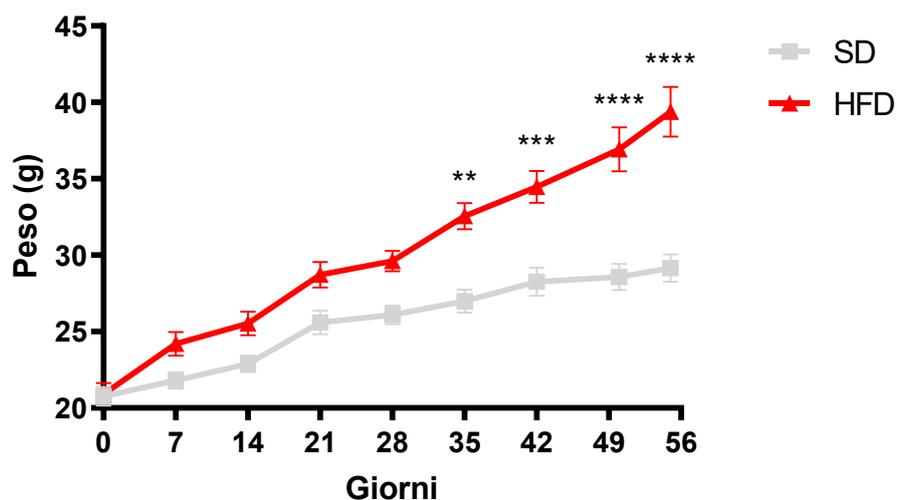


Figura 1. Grafico con variazione nel tempo del peso corporeo di topi maschi C57BL/6 alimentati per 8 settimane con SD o HFD. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ rispetto a SD).

Un confronto tra il consumo di cibo e l'assunzione di calorie è stato effettuato sia in termini quantitativi che qualitativi. Il grafico in figura 2.A mostra che la quantità di cibo assunta da ogni topo in media è di 3 grammi al giorno e non dipende dalla dieta somministrata. Nel grafico in figura 2.B si osserva che i topi alimentati con HFD assumono in media 18 chilocalorie al giorno, rispetto ad una media di 13 chilocalorie al giorno per quelli nutriti con SD.

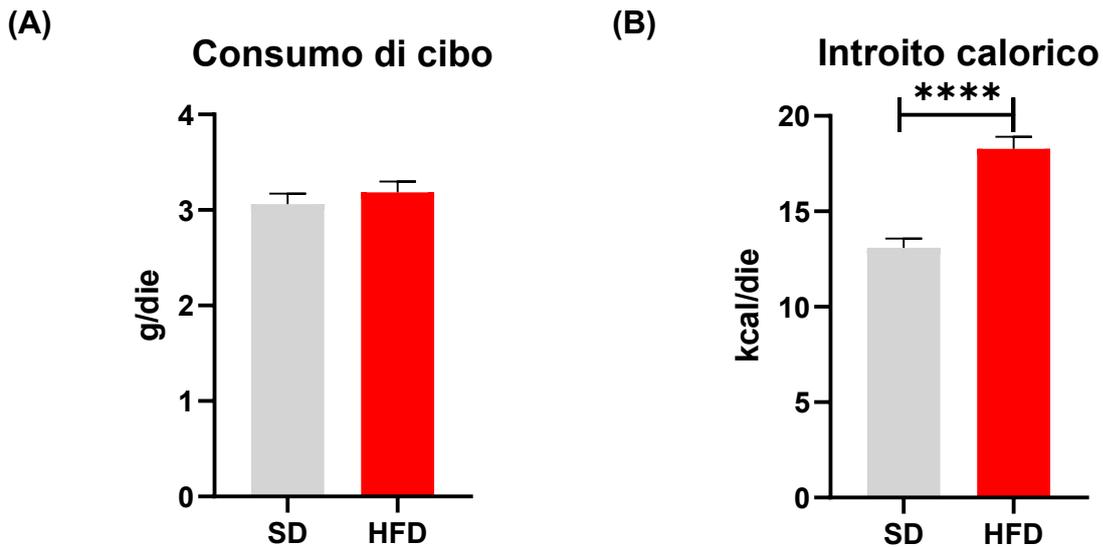
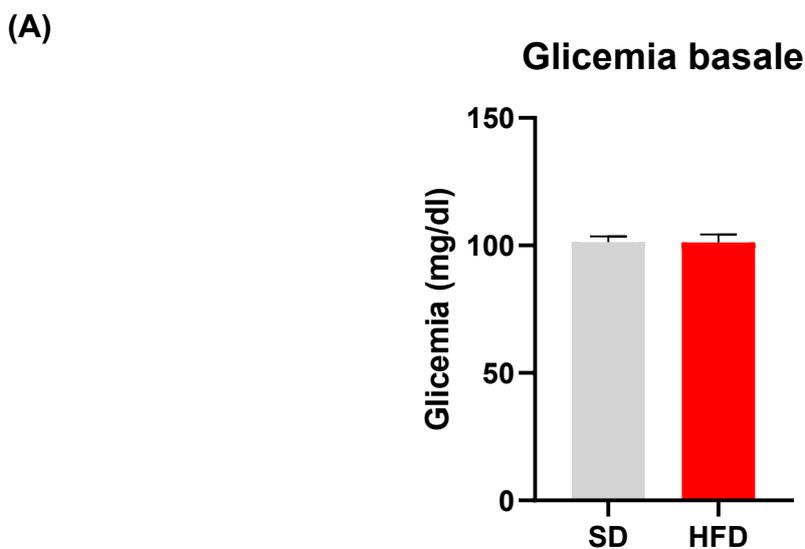


Figura 2. Grafici con quantità di cibo assunta giornalmente (A) e con apporto calorico giornaliero (B) di topi C57BL/6 alimentati con SD o HFD. I dati sono rappresentati come media±SEM (****p<0.0001 rispetto a SD).

Variazione della glicemia

Nell'arco delle otto settimane dello studio, anche glicemia ed oGTT sono state valutate, sia a livello basale che alla seconda ed all'ottava settimana. La glicemia è stata il secondo parametro considerato per definire alterazioni del metabolismo indotte dalla dieta ipercalorica. Nel grafico in figura 3.A si osserva che all'inizio dello studio, prima della somministrazione di SD o HFD, in entrambi i gruppi la glicemia a digiuno media si assesta intorno a 100mg/dl, senza differenze statisticamente significative. Nel grafico in figura 3.B non si riscontrano differenze nell'oGTT basale tra i due gruppi.



(B)

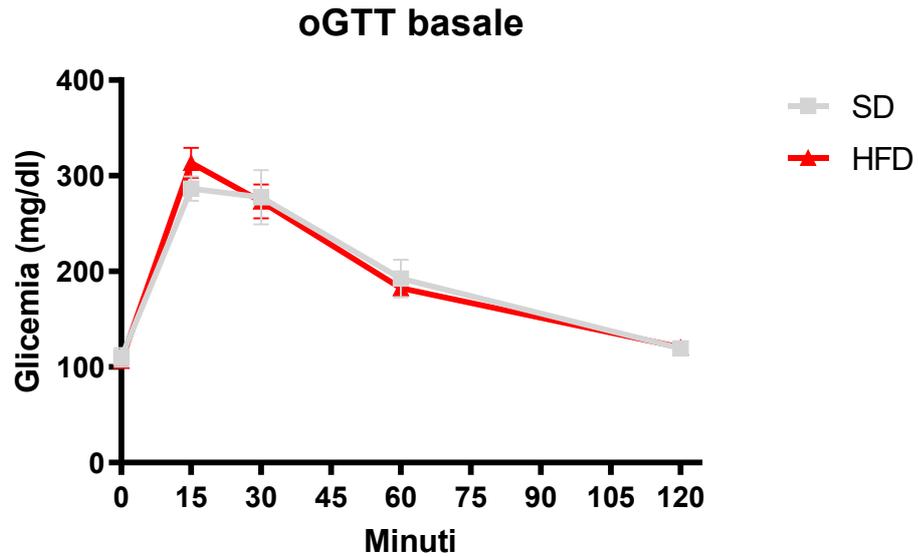
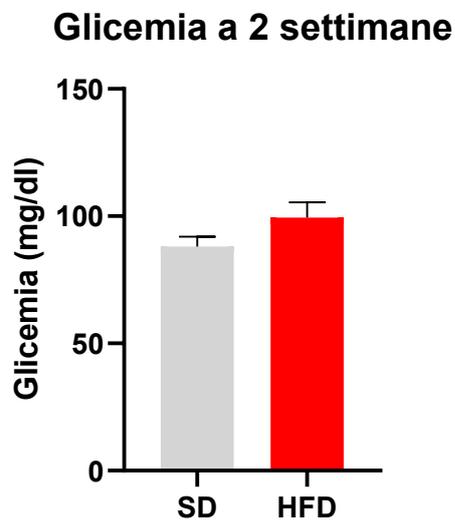


Figura 3. Grafici con glicemia a digiuno (A) e con oGTT (B) di topi C57BL/6 a livello basale prima della somministrazione della dieta SD o HFD. I dati sono rappresentati come media \pm SEM.

Il grafico in figura 4.A mostra che dopo due settimane di somministrazione della dieta la concentrazione media di glucosio nel sangue non varia in modo statisticamente significativo nei topi alimentati con HFD rispetto a quelli nutriti con SD. Nel grafico in figura 4.B non si riscontrano differenze significative nella curva oGTT tra i due gruppi.

(A)



(B)

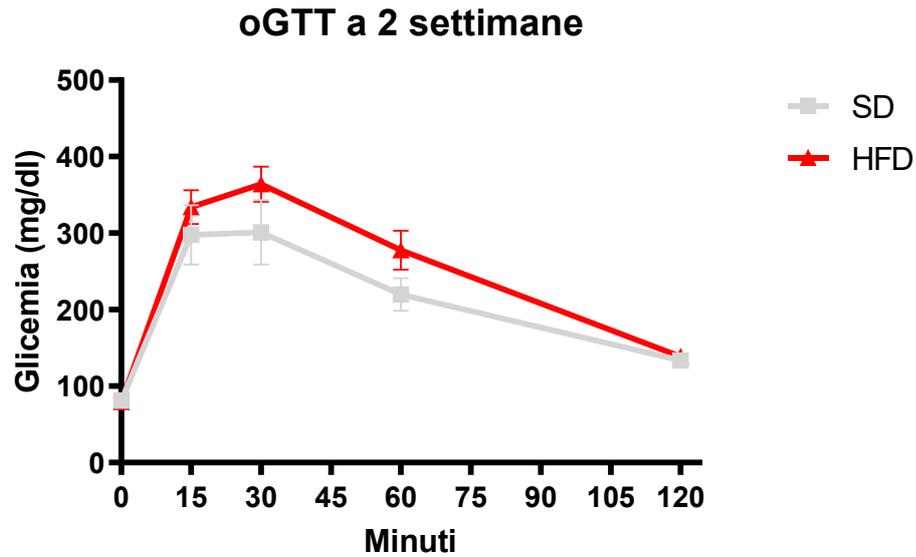
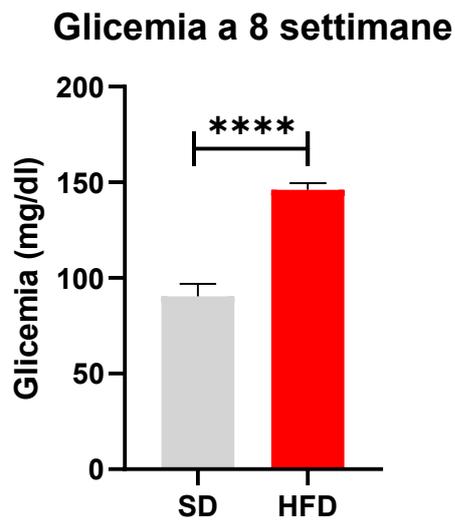


Figura 4. Grafici con glicemia a digiuno (A) e con oGTT (B) di topi C57BL/6 dopo 2 settimane di somministrazione della dieta SD o HFD. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (* p <0.05 rispetto a SD).

Il grafico in figura 5.A mostra, dopo otto settimane di somministrazione di dieta ipercalorica, un aumento superiore al 60% del valore medio della glicemia a digiuno rispetto al gruppo nutrito con dieta standard. Anche nel grafico in figura 5.B si osserva un aumento significativo delle concentrazioni plasmatiche medie di glucosio misurate durante l'oGTT, ad indicare l'instaurazione di una resistenza insulinica.

(A)



(B)

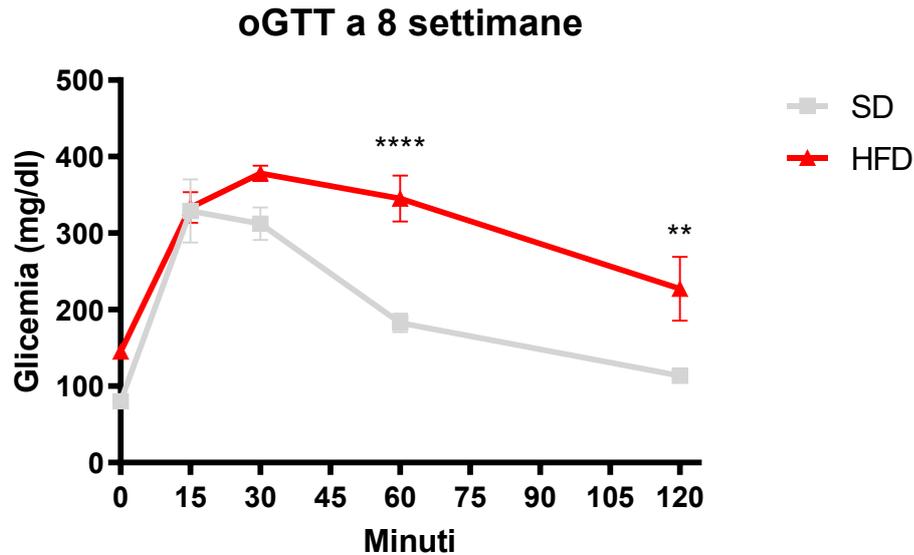
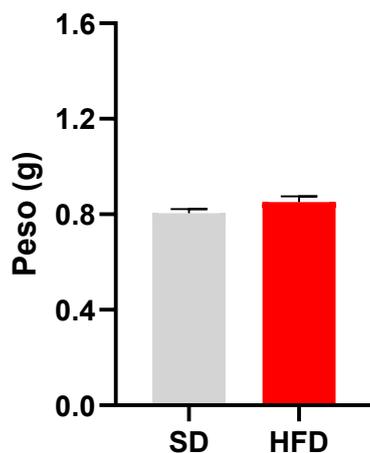


Figura 5. Grafici con glicemia a digiuno (A) e con oGTT (B) di topi C57BL/6 dopo 8 settimane di somministrazione della dieta SD o HFD. I dati sono rappresentati come media \pm SEM (** p <0.01, **** p <0.0001 rispetto a SD).

Variazione del peso del fegato

Durante i sacrifici svolti al termine della seconda e dell'ottava settimana, il fegato di ogni topo è stato prelevato e pesato al fine di valutare se la dieta ipercalorica avesse un impatto anche sull'aumento della massa epatica. Nei grafici in figura 6.A e 6.B si osserva che dopo due settimane dalla somministrazione della dieta non ci sono variazioni nel peso del fegato tra i due gruppi, mentre dopo otto settimane si osserva un aumento statisticamente significativo nei topi HFD rispetto a quelli SD.

(A)



(B)

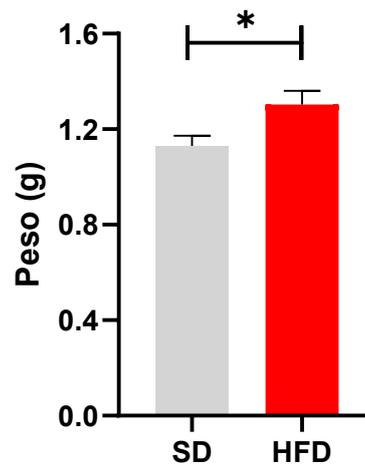


Figura 6. Grafici con peso del fegato di topi C57BL/6 alimentati con SD o HFD rispettivamente per due (A) e otto settimane (B). I dati sono rappresentati come media \pm SEM (* p <0.05 rispetto a SD).

Modificazioni epigenetiche indotte dalla dieta

Modello animale di 8 settimane

Analisi biochimiche sono state eseguite su tessuti epatici murini prelevati da topi C57BL/6J alimentati per otto settimane con SD o HFD. Attraverso analisi densitometriche è stata valutata la trimetilazione della lisina 27 dell'istone 3, marcatore epigenetico repressivo che silenzia la trascrizione genica. In figura 7.A si osserva un aumento statisticamente significativo di H3K27me3 nei topi del gruppo HFD8w rispetto a quelli appartenenti al gruppo SD8w, mentre in figura 7.B non si riscontrano differenze dell'espressione dell'istone 3 (totale) tra i due gruppi. Il grafico in figura 7.C mostra un raddoppio del rapporto H3K27me3 su H3 in HFD8w rispetto a SD8w.

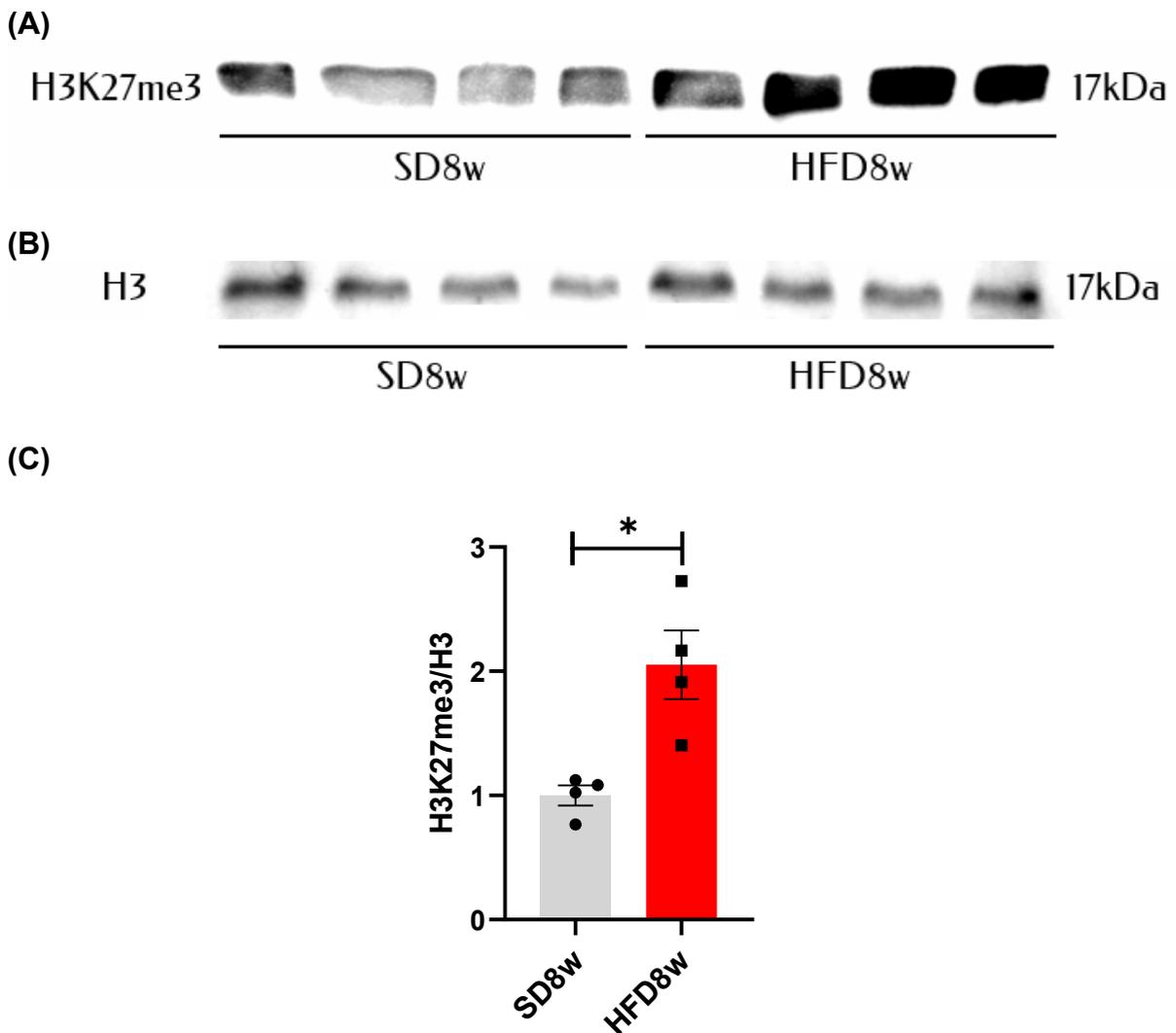


Figura 7. Autoradiogrammi dell'espressione di H3K27me3 (A) e di H3 (B) delle analisi Western Blot in tessuti epatici di topi C57BL/6 alimentati per 8 settimane con SD o HFD. Grafico con rapporto H3K27me3 su H3 dell'analisi densitometrica (C). I dati sono rappresentati come media ± SEM (*p < 0.05 rispetto a SD).

Analisi densitometriche sono state condotte anche per valutare l'espressione della metiltransferasi EZH2, subunità catalitica del Complesso Repressivo Polycomb 2, responsabile della trimetilazione di H3K27. In linea con i dati di espressione di H3K27me3, in figura 8.A si osserva un aumento statisticamente significativo dell'espressione nucleare di EZH2 nel gruppo HFD8w rispetto al gruppo SD8w, mentre in figura 8.B non si riscontrano differenze dell'espressione citosolica tra i due gruppi. I grafici in figura 8.C mostrano un raddoppio dell'espressione di EZH2 a livello nucleare nel gruppo HFD8w rispetto al gruppo SD8w, mentre a livello citosolico non si osservano differenze rilevanti tra i due gruppi.

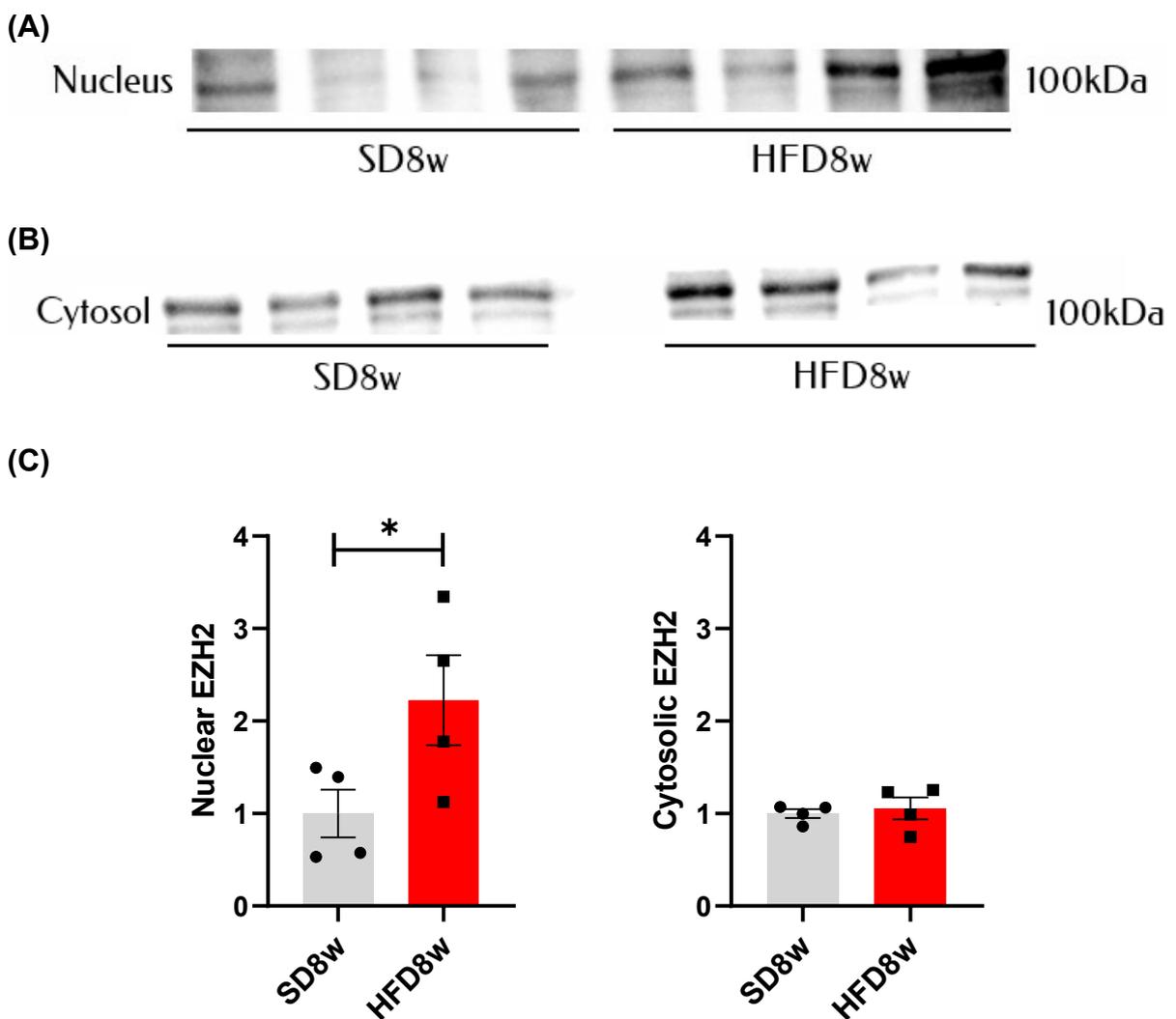


Figura 8. Autoradiogrammi dell'espressione di EZH2 a livello nucleare (A) e citosolico (B) delle analisi Western Blot in tessuti epatici di topi C57BL/6 alimentati per 8 settimane con SD o HFD. Grafici con espressione di EZH2 delle analisi densitometriche (C). I dati sono rappresentati come media \pm SEM.

In questo studio sono stati valutati anche altri enzimi coinvolti nel pathway EZH2/H3K27me3. Gli enzimi che sono stati analizzati sono la demetilasi KDM6B, antagonista funzionale di EZH2, e la deacetilasi SIRT1 che disattiva EZH2 per deacetilazione. In figura 9.A non si osservano differenze dell'espressione nucleare di KDM6B tra i gruppi HFD8w e SD8w. Allo stesso modo, in figura 9.B non si riscontrano differenze significative dell'espressione nucleare di SIRT1 tra i due gruppi. Nei due grafici in figura 9.C non si osservano differenze rilevanti dell'espressione nucleare di KDM6B e SIRT1.

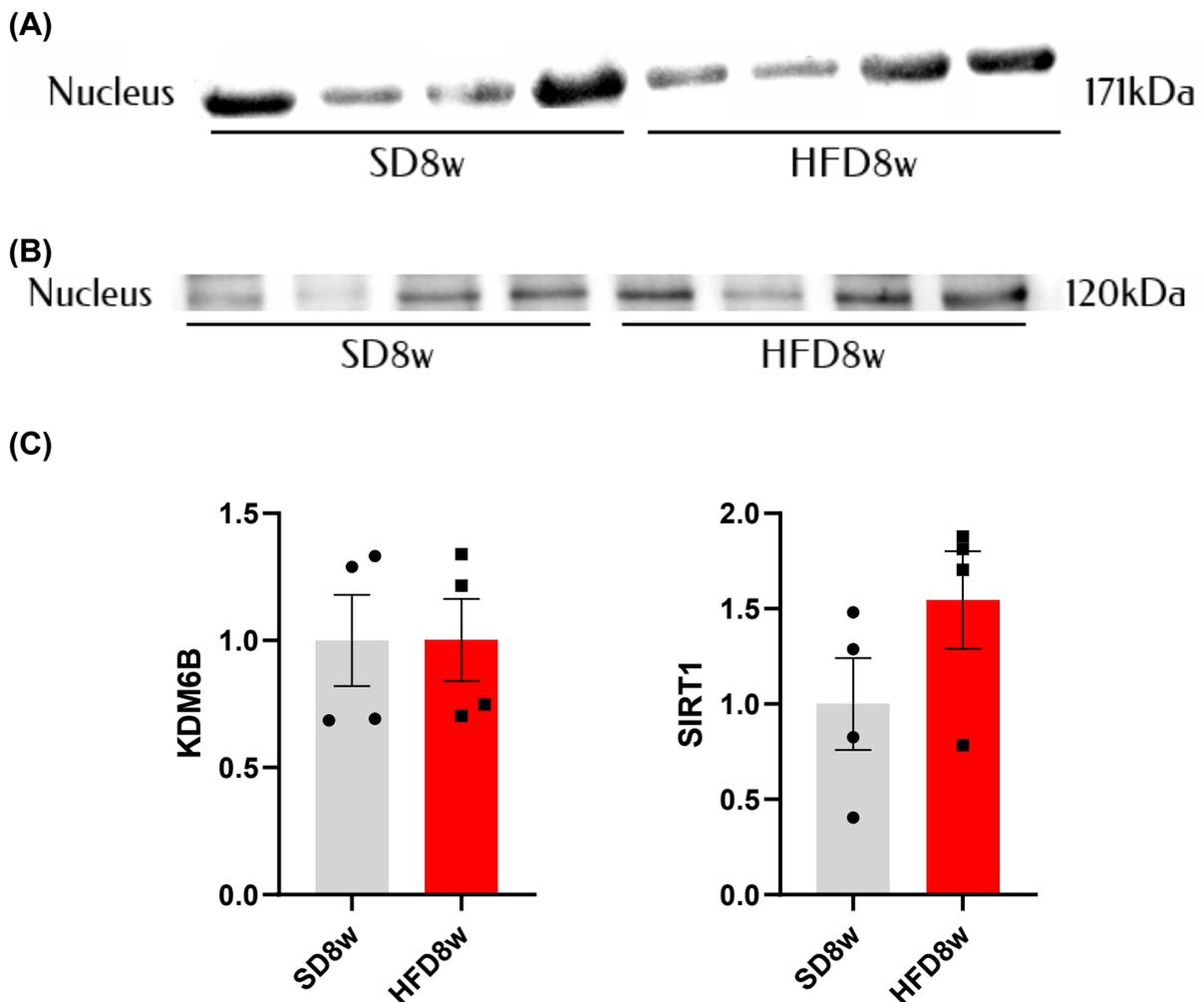


Figura 9. Autoradiogrammi dell'espressione di KDM6B (A) e di SIRT1 (B) delle analisi Western Blot in tessuti epatici di topi C57BL/6 alimentati per 8 settimane con SD o HFD. Grafici con espressione di KDM6B e SIRT1 delle analisi densitometriche (C). I dati sono rappresentati come media \pm SEM.

Modello animale di 2 settimane

Analisi biochimiche sono state eseguite anche su fegati prelevati da topi C57BL/6J alimentati per sole due settimane con SD o HFD, ovvero prima dello sviluppo di sovrappeso. Attraverso analisi western blot è stata nuovamente valutata la trimetilazione di H3K27. In figura 10.A si osserva un aumento statisticamente significativo di H3K27me3 nei topi del gruppo HFD2w rispetto a quelli appartenenti al gruppo SD2w, mentre in figura 10.B non si riscontrano differenze dell'espressione dell'istone 3 (totale) tra i due gruppi. Il grafico in figura 10.C mostra una quadruplicazione del rapporto H3K27me3 su H3 nel gruppo HFD2w rispetto al gruppo SD2w.

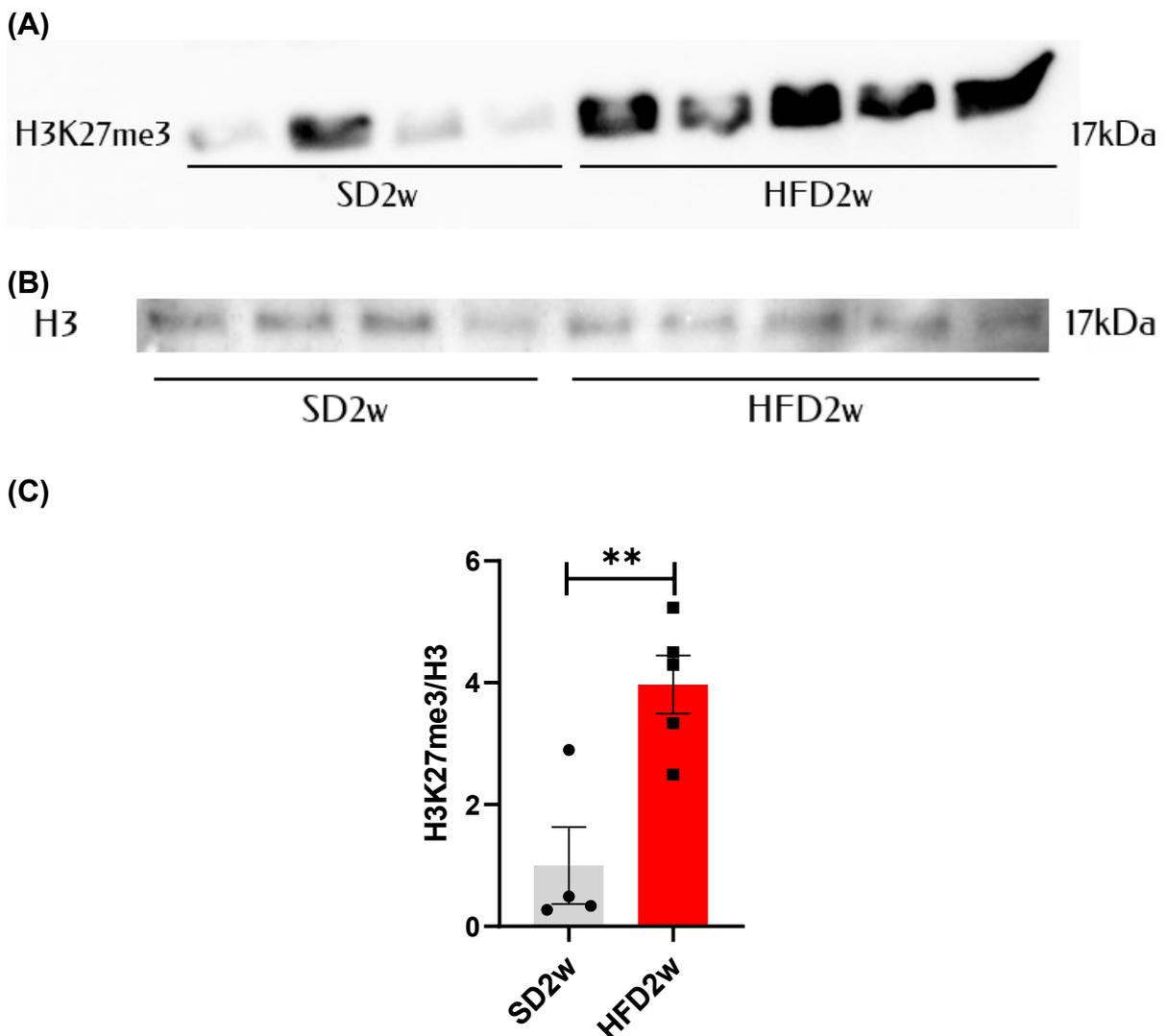


Figura 10. Autoradiogrammi dell'espressione di H3K27me3 (A) e di H3 (B) delle analisi Western Blot in tessuti epatici di topi C57BL/6 alimentati per 2 settimane con SD o HFD. Grafico con rapporto H3K27me3 su H3 dell'analisi densitometrica (C). I dati sono rappresentati come media±SEM (**p<0.01 rispetto a SD).

Analisi densitometriche sono state condotte anche per valutare l'espressione di EZH2. In figura 11.A si osserva un aumento statisticamente significativo dell'espressione nucleare di EZH2 nel gruppo HFD2w rispetto al gruppo SD2w, mentre in figura 11.B non si riscontrano differenze di espressione citosolica tra i due gruppi. I grafici in figura 11.C mostrano un aumento del 136% dell'espressione di EZH2 a livello nucleare nel gruppo HFD2w rispetto al gruppo SD2w, mentre a livello citosolico non si osservano differenze rilevanti tra i due gruppi.

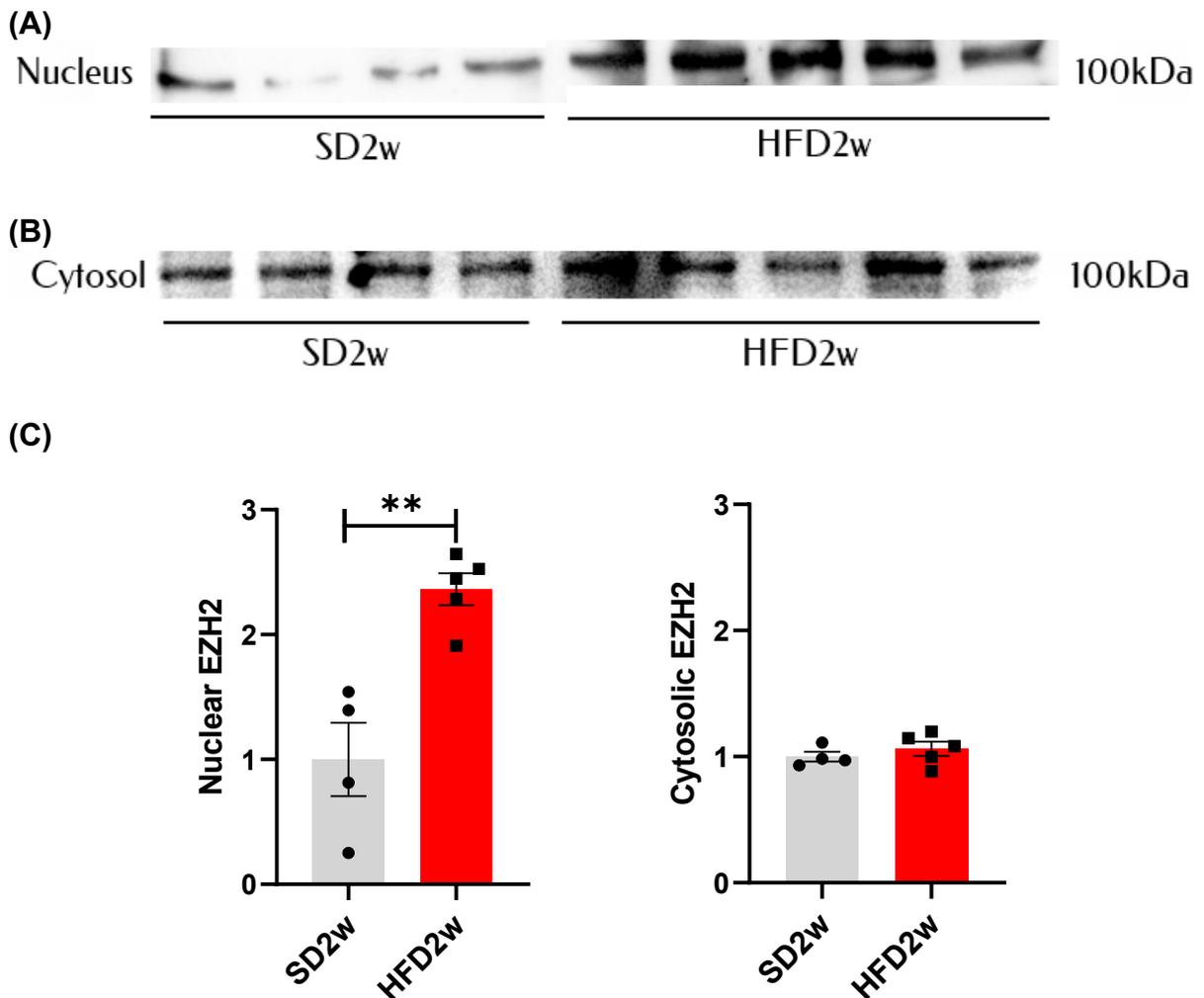
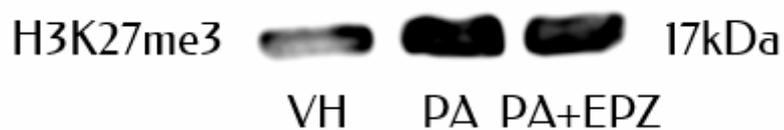


Figura 11. Autoradiogrammi dell'espressione di EZH2 a livello nucleare (A) e citosolico (B) delle analisi Western Blot in tessuti epatici di topi C57BL/6 alimentati per 2 settimane con SD o HFD. Grafici con espressione di EZH2 delle analisi densitometriche (C). I dati sono rappresentati come media±SEM (**p<0.01 rispetto a SD).

Modello cellulare umano

Infine, cellule di epatocarcinoma umane HUH-7 sono state trattate con acido palmitico (PA, a mimare una dieta ad alto contenuto di lipidi) in associazione o meno con EPZ-6438, un inibitore selettivo di EZH2. In figura 12.A si osserva un aumento significativo di H3K27me3 nelle cellule trattate con PA rispetto a quelle non trattate, inoltre si osserva una riduzione significativa della trimetilazione nelle cellule trattate con PA in associazione con EPZ rispetto a quelle trattate solamente con PA. In figura 12.B non si riscontrano differenze dell'espressione dell'istone 3 (totale) tra i vari gruppi. Il grafico in figura 12.C mostra la variazione del rapporto H3K27me3 su H3 nei vari gruppi.

(A)



(B)



(C)

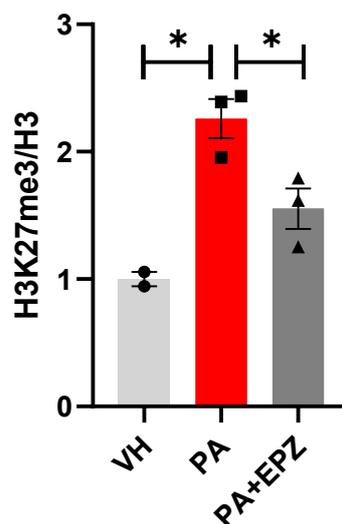
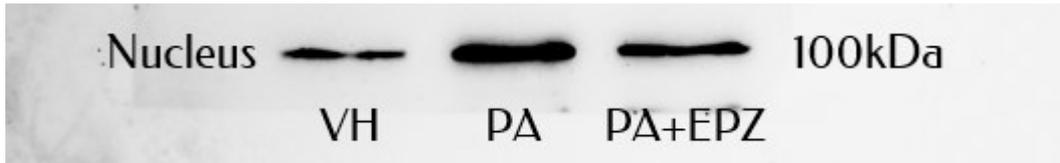


Figura 12. Autoradiogrammi dell'espressione di H3K27me3 (A) e di H3 (B) delle analisi Western Blot in cellule epatiche HUH-7 trattate con acido palmitico in associazione o no con EPZ-6438. Grafico con rapporto H3K27me3 su H3 dell'analisi densitometrica (C). I dati sono rappresentati come media \pm SEM.

Analisi densitometriche sono state condotte anche per valutare l'espressione di EZH2. In figura 13.A si osserva un aumento significativo dell'espressione di EZH2 nelle cellule trattate con PA rispetto a quelle non trattate, mentre si osserva una riduzione significativa nelle cellule trattate con PA in associazione con EPZ-6438 rispetto a quelle trattate solamente con PA. Il grafico in figura 13.B mostra la variazione dell'espressione di EZH2 nei vari gruppi.

(A)



(B)

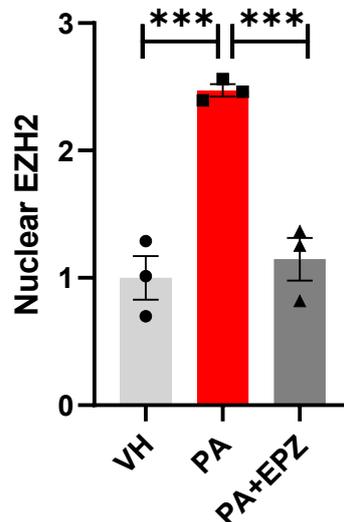


Figura 13. Autoradiogrammi dell'espressione di EZH2 a livello nucleare (A) dell'analisi Western Blot in cellule epatiche HUH-7 trattate con acido palmitico in associazione o no con EPZ-6438. Grafici con espressione di EZH2 dell'analisi densitometrica (B). I dati sono rappresentati come media±SEM (**p<0.001 rispetto a PA).

Valutazione dell'uniformità dei caricamenti

L'uniformità dei caricamenti è stata valutata attraverso la colorazione delle membrane di nitrocellulosa, contenenti le bande proteiche, con Red Ponceau e l'acquisizione di immagini con il sistema di imaging ChemiDoc™ Touch della BIO-RAD. La colorazione è stata utilizzata per normalizzare i risultati riportati nei paragrafi precedenti.

(A)



(B)



(C)



Figura 13. Autoradiogrammi dei Ponceau delle analisi Western Blot in tessuti epatici di topi C57BL/6 alimentati per 8 settimane **(A)** o per 2 settimane **(B)** con SD o HFD ed in cellule epatiche HUH-7 **(C)** trattate con acido palmitico in associazione o no con EPZ-6438.

DISCUSSIONE

Sovrappeso e obesità costituiscono fattori di rischio rilevanti per la salute umana. Un eccessivo accumulo di lipidi a livello epatico può portare all'insorgenza di infiammazione, al danneggiamento degli epatociti e può favorire la progressione verso condizioni più gravi, come la steatoepatite non alcolica e lo sviluppo di fibrosi, che può condurre cronicamente a cirrosi ^{55,56}. Approfondite ricerche suggeriscono che una complessa interazione di molteplici fattori, tra cui l'insulino-resistenza, l'infiammazione e lo stress ossidativo, contribuisca alla patogenesi dell'accumulo lipidico nel fegato in individui in sovrappeso o obesi ^{14,15}. Inoltre, è emerso che i meccanismi dannosi che comportano l'accumulo di grasso a livello epatico iniziano a manifestarsi già nelle primissime fasi dell'alterazione metabolica e, persino prima dello sviluppo del sovrappeso ⁵⁷. I meccanismi coinvolti nell'insorgenza precoce dei disturbi metabolici non sono ancora stati completamente chiariti, ma numerose ricerche evidenziano che le modificazioni epigenetiche potrebbero avere un ruolo cruciale ^{16,20}. Tra le varie modificazioni post traduzionali, la trimetilazione della lisina 27 dell'istone 3 è nota per svolgere un ruolo fondamentale nella regolazione dei marcatori di infiammazione e di fibrosi nei tessuti epatici ^{23,24}. La metiltransferasi EZH2, attraverso H3K27me3, provoca la compattazione della cromatina ed il conseguente silenziamento di geni antinfiammatori ed anti-fibrotici ³³.

In questo studio, ci siamo posti in due condizioni di alterazione metabolica: una conclamata e una molto precoce, ottenute somministrando una HFD per 8 e 2 settimane rispettivamente. Dopo 8 settimane di somministrazione di HFD, sono stati riscontrati segni evidenti di uno squilibrio metabolico. I topi, infatti, si trovano in una condizione di sovrappeso e manifestano iperglicemia. In queste condizioni, abbiamo misurato nel fegato dei topi sia un aumento dell'espressione nucleare di EZH2 sia un incremento di H3K27me3, dimostrando una correlazione con l'alterazione dei valori di peso e glicemia/insulino-resistenza. H3K27me3 è regolata anche dalla demetilasi KDM6B, che provoca la decondensazione ³⁷, tuttavia non abbiamo osservato alcuna variazione dei suoi livelli. L'attività metiltransferasica di EZH2 può essere regolata da SIRT1 ³⁹, ma anche per questo enzima non si sono riscontrate differenze di espressione tra i gruppi di animali nutriti per 8 settimane con SD e HFD.

Recenti studi hanno confermato l'ipotesi che, in condizioni di squilibrio metabolico indotto da HFD, H3K27me3 eserciti effetti duraturi sulla trascrizione genica ⁵⁸. Inoltre,

è stato dimostrato che squilibri nutrizionali durante le fasi precoci dello sviluppo ('developmental programming') inducono cambiamenti epigenetici permanenti con effetti a lungo termine ⁵⁸. H3K27me3 può essere supposto come uno tra i fattori coinvolti nella cosiddetta 'memoria metabolica'. Quest'ultima è un fenomeno strettamente associato ad una regolazione epigenetica, ad una promozione di infiammazione e fibrosi (che persistono anche in seguito ad un eventuale perdita di peso e normalizzazione della glicemia) e causa la progressione di uno squilibrio metabolico ¹⁹. Pertanto, si è voluto comprendere quanto precocemente si manifesti un aumento di H3K27me3 in seguito a somministrazione di HFD. Lo studio è quindi proseguito con un protocollo sperimentale che prevedeva l'analisi di fegati di topi alimentati con HFD per sole 2 settimane, ovvero prima dell'insorgenza del sovrappeso e della compromissione dell'omeostasi del glucosio. Sorprendentemente, abbiamo dimostrato già in questa fase iniziale una significativa sovraregolazione dei livelli nucleari di EZH2 e di H3K27me3, simile a quella osservata nei topi in sovrappeso e con iperglicemia. Per la prima volta, abbiamo quindi rilevato una precoce alterazione epigenetica che si verifica in seguito ad una breve esposizione ad una dieta ricca di grassi. Questi risultati contribuiscono a consolidare l'ipotesi del coinvolgimento molto precoce di EZH2 e di H3K27me3, che potrebbe essere legato alla memoria metabolica. Per comprendere questa correlazione si potrebbe condurre uno studio di *recovery e re-administration* di HFD, meglio illustrato nella sezione conclusione.

Infine, per capire se l'aumento di H3K27me3 abbia una correlazione diretta con l'insorgenza dello squilibrio metabolico epatico, abbiamo iniziato a sviluppare un modello *in vitro* di steatosi epatica, in cui cellule epatiche HUH-7 sono state trattate con acido palmitico (PA) in associazione o meno con EPZ-6438, inibitore selettivo di EZH2. In accordo con lo studio *in vivo*, dimostriamo sia un aumento dell'espressione nucleare di EZH2 che un incremento di H3K27me3 nelle cellule HUH-7 trattate con acido palmitico. Il trattamento con EPZ-6438, come previsto, ha ridotto i livelli nucleari di EZH2 e, di conseguenza, H3K27me3. Se queste modifiche correlano o meno con un danno metabolico sarà oggetto di studi futuri, in cui un readout selezionabile sarà quello di valutare direttamente l'accumulo di lipidi nelle cellule epatiche HUH-7 mediante ORO (oil red o) staining.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono per la prima volta una correlazione tra l'aumento precoce di EZH2/H3K27me3 nel fegato e l'insorgere del disordine metabolico conclamato o precoce.

CONCLUSIONE

L'ipotesi di una memoria metabolica associata a squilibri metabolici ha aperto la strada a nuove prospettive nella gestione di condizioni come il sovrappeso e l'obesità. Data l'importanza di un intervento precoce per prevenire sia la progressione dei disturbi metabolici che un aumento del rischio dell'insorgenza di complicazioni future, le modificazioni epigenetiche e, principalmente H3K27me3, potrebbero rappresentare un valido candidato per ulteriori approfondimenti in questo campo; infatti, i meccanismi coinvolti nella memoria metabolica sono stati finora poco studiati. Per rafforzare questa ipotesi, nel prossimo futuro sarà condotto un nuovo protocollo sperimentale *in vivo*, il quale prevederà una breve esposizione di due settimane con HFD (simile a quella eseguita in questo studio), seguita da un periodo di recupero con una dieta di controllo e, infine, da una nuova esposizione ad HFD. Questo protocollo sperimentale ha il fine di valutare se un priming precoce con HFD determini delle alterazioni nell'asse EZH2/H3K27me3 che perdurano nel tempo, in seguito ad un periodo di *recovery* metabolica ed un successivo nuovo periodo di somministrazione di dieta ipercalorica. Inoltre, sarà utile valutare come e se la modulazione selettiva di EZH2 si inserisce nel contesto metabolico descritto in questo elaborato. Tazemetostat è attualmente il primo inibitore di EZH2 approvato dalla FDA ed è impiegato per il trattamento del sarcoma epitelioide e del linfoma follicolare ⁴⁴⁻⁴⁶. In futuro sarà fondamentale condurre uno studio farmacologico *in vivo* con EPZ-6438, sia a breve che a lungo termine.

In conclusione, un ulteriore obiettivo sarà investigare quali siano i geni soppressi da EZH2/H3K27me3, attraverso una RNAseq seguita eventualmente da una ChIPseq, con lo scopo di individuare specifiche vie molecolari che potrebbero essere modulate farmacologicamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Phelps, N. H. *et al.* Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *The Lancet* 403, 1027–1050 (2024).
2. Lingvay, I., Cohen, R. V, Roux, C. W. le & Sumithran, P. Obesity in adults. *The Lancet* 404, 972–987 (2024).
3. Busetto, L. *et al.* A new framework for the diagnosis, staging and management of obesity in adults. *Nat Med* 30, 2395–2399 (2024).
4. Lister, N. B. *et al.* Child and adolescent obesity. *Nat Rev Dis Primers* 9, 24 (2023).
5. Powell-Wiley, T. M. *et al.* Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 143, (2021).
6. Fryk, E. *et al.* Hyperinsulinemia and insulin resistance in the obese may develop as part of a homeostatic response to elevated free fatty acids: A mechanistic case-control and a population-based cohort study. *EBioMedicine* 65, 103264 (2021).
7. Mourougavelou, V. & Chowdhury, T. A. Management of hyperglycaemia in people with obesity. *Clinical Medicine* 23, 364–371 (2023).
8. Dixon, A. E. & Peters, U. The effect of obesity on lung function. *Expert Rev Respir Med* 12, 755–767 (2018).
9. Blüher, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 15, 288–298 (2019).
10. Shan, Z. *et al.* Trends in Dietary Carbohydrate, Protein, and Fat Intake and Diet Quality Among US Adults, 1999-2016. *JAMA* 322, 1178 (2019).
11. Popkin, B. M. & Ng, S. W. The nutrition transition to a stage of high obesity and noncommunicable disease prevalence dominated by ultra-processed foods is not inevitable. *Obesity Reviews* 23, (2022).

12. Tsuru, H., Osaka, M., Hiraoka, Y. & Yoshida, M. HFD-induced hepatic lipid accumulation and inflammation are decreased in Factor D deficient mouse. *Sci Rep* 10, 17593 (2020).
13. Chandel, N. S. Lipid Metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 13, a040576 (2021).
14. Chiazza, F., Challa, T. D., Lucchini, F. C., Konrad, D. & Wueest, S. A short bout of HFD promotes long-lasting hepatic lipid accumulation. *Adipocyte* 5, 88–92 (2016).
15. Gluchowski, N. L., Becuwe, M., Walther, T. C. & Farese, R. V. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 343–355 (2017).
16. González-Becerra, K. *et al.* Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: a systematic review. *Lipids Health Dis* 18, 178 (2019).
17. Dorairaj, V., Sulaiman, S. A., Abu, N. & Abdul Murad, N. A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Pathogenesis and Noninvasive Diagnosis. *Biomedicines* 10, 15 (2021).
18. Purvis, G. S. D. *et al.* Inhibition of Bruton's TK regulates macrophage NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation in metabolic inflammation. *Br J Pharmacol* 177, 4416–4432 (2020).
19. Dong, H. *et al.* Metabolic memory: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 9, 38 (2024).
20. Mahmoud, A. M. An Overview of Epigenetics in Obesity: The Role of Lifestyle and Therapeutic Interventions. *Int J Mol Sci* 23, 1341 (2022).
21. Brandao, B. B., Lino, M. & Kahn, C. R. Extracellular miRNAs as mediators of obesity-associated disease. *J Physiol* 600, 1155–1169 (2022).
22. Liu, R. *et al.* Post-translational modifications of histones: Mechanisms, biological functions, and therapeutic targets. *MedComm (Beijing)* 4, (2023).

23. Zhou, T. *et al.* Enhancer of zeste homolog 2-catalysed H3K27 trimethylation plays a key role in acute-on-chronic liver failure via TNF-mediated pathway. *Cell Death Dis* 9, 590 (2018).
24. Basta, M. D., Petruk, S., Mazo, A. & Walker, J. L. Fibrosis—the tale of H3K27 histone methyltransferases and demethylases. *Front Cell Dev Biol* 11, (2023).
25. Biernacka, A., Dobaczewski, M. & Frangogiannis, N. G. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29, 196–202 (2011).
26. Meng, X., Nikolic-Paterson, D. J. & Lan, H. Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 12, 325–338 (2016).
27. Akhmetshina, A. *et al.* Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun* 3, 735 (2012).
28. Wang, J. *et al.* Emerging role and therapeutic implication of Wnt signaling pathways in liver fibrosis. *Gene* 674, 57–69 (2018).
29. Jiang, Y. *et al.* Histone H3K27 methyltransferase EZH2 and demethylase JMJD3 regulate hepatic stellate cells activation and liver fibrosis. *Theranostics* 11, 361–378 (2021).
30. Yamagishi, M. *et al.* Mechanisms of action and resistance in histone methylation-targeted therapy. *Nature* 627, 221–228 (2024).
31. Duan, R., Du, W. & Guo, W. EZH2: a novel target for cancer treatment. *J Hematol Oncol* 13, 104 (2020).
32. Laugesen, A., Højfeldt, J. W. & Helin, K. Molecular Mechanisms Directing PRC2 Recruitment and H3K27 Methylation. *Mol Cell* 74, 8–18 (2019).
33. Lee, S. *et al.* The Role of the Histone Methyltransferase EZH2 in Liver Inflammation and Fibrosis in STAM NASH Mice. *Biology (Basel)* 9, 93 (2020).
34. Mann, J. *et al.* MeCP2 Controls an Epigenetic Pathway That Promotes Myofibroblast Transdifferentiation and Fibrosis. *Gastroenterology* 138, 705-714.e4 (2010).

35. Martin-Mateos, R. *et al.* Enhancer of Zeste Homologue 2 Inhibition Attenuates TGF- β Dependent Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 7, 197–209 (2019).
36. Lim, H. J. & Kim, M. EZH2 as a Potential Target for NAFLD Therapy. *Int J Mol Sci* 21, 8617 (2020).
37. Qu, L. *et al.* Histone demethylases in the regulation of immunity and inflammation. *Cell Death Discov* 9, 188 (2023).
38. Wu, Q.-J. *et al.* The sirtuin family in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 7, 402 (2022).
39. Pinton, G. *et al.* CDKN2A Determines Mesothelioma Cell Fate to EZH2 Inhibition. *Front Oncol* 11, (2021).
40. Tan, J., Yan, Y., Wang, X., Jiang, Y. & Xu, H. E. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 35, 161–174 (2014).
41. Zheng, S. *et al.* DZNep inhibits H3K27me3 deposition and delays retinal degeneration in the rd1 mice. *Cell Death Dis* 9, 310 (2018).
42. Aziz, S. *et al.* GSK126 an inhibitor of epigenetic regulator EZH2 suppresses cardiac fibrosis by regulating the *EZH2-PAX6-CXCL10* pathway. *Biochemistry and Cell Biology* 101, 87–100 (2023).
43. Yang, J., Fan, T. W. M., Brandon, J. A., Lane, A. N. & Higashi, R. M. Rapid analysis of S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH) isotopologues in stable isotope-resolved metabolomics (SIRM) using direct infusion nanoelectrospray ultra-high-resolution Fourier transform mass spectrometry (DI-nESI-UHR-FTMS). *Anal Chim Acta* 1181, 338873 (2021).
44. Gounder, M. *et al.* Tazemetostat in advanced epithelioid sarcoma with loss of INI1/SMARCB1: an international, open-label, phase 2 basket study. *Lancet Oncol* 21, 1423–1432 (2020).

45. Morschhauser, F. *et al.* Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 21, 1433–1442 (2020).
46. Groisberg, R. & Subbiah, V. EZH2 inhibition for epithelioid sarcoma and follicular lymphoma. *Lancet Oncol* 21, 1388–1390 (2020).
47. Orleni, M. & Beumer, J. H. Pharmacology and pharmacokinetics of tazemetostat. *Cancer Chemother Pharmacol* 93, 509–517 (2024).
48. Yang, Y., Liu, H. & Liu, D. Preventing high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders by hydrodynamic transfer of Il-27 gene. *Int J Obes* 47, 413–421 (2023).
49. Bastías-Pérez, M., Serra, D. & Herrero, L. Dietary Options for Rodents in the Study of Obesity. *Nutrients* 12, 3234 (2020).
50. de Souza, G. O., Wasinski, F. & Donato, J. Characterization of the metabolic differences between male and female C57BL/6 mice. *Life Sci* 301, 120636 (2022).
51. Stapleton, S., Welch, G., DiBerardo, L. & Freeman, L. R. Sex differences in a mouse model of diet-induced obesity: the role of the gut microbiome. *Biol Sex Differ* 15, 5 (2024).
52. Speakman, J. R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int J Obes* 43, 1491–1492 (2019).
53. Collino, M. *et al.* Variability in Myosteatosis and Insulin Resistance Induced by High-Fat Diet in Mouse Skeletal Muscles. *Biomed Res Int* 2014, 1–10 (2014).
54. Cannito, S. *et al.* Microvesicles released from fat-laden cells promote activation of hepatocellular NLRP3 inflammasome: A pro-inflammatory link between lipotoxicity and non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 12, e0172575 (2017).
55. Parlati, L., Régnier, M., Guillou, H. & Postic, C. New targets for NAFLD. *JHEP Reports* 3, 100346 (2021).

56. Geng, Y., Faber, K. N., de Meijer, V. E., Blokzijl, H. & Moshage, H. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? *Hepatol Int* 15, 21–35 (2021).
57. Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J. & Tveden-Nyborg, P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75, 3313–3327 (2018).
58. Blin, G. *et al.* Maternal Exposure to High-Fat Diet Induces Long-Term Derepressive Chromatin Marks in the Heart. *Nutrients* 12, 181 (2020).