

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE – XIX CICLO
UNIVERSITA' DEGLI STUDI "A. AVOGADRO" DEL PIEMONTE ORIENTALE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Relazione di dottorato III anno
Anno Accademico 2006/2007

**CLONAGGIO ED ESPRESSIONE DELLA PROTEINA CORE DELL'HCV: STUDIO IN
VITRO DEL SUO POSSIBILE RUOLO NELLO SVILUPPO DI EPATOCARCINOMA**

Responsabile scientifico
Prof. Mario Pirisi

Dottorando
Dr. Carlo Smirne

INTRODUZIONE

L'identificazione alla fine del 1989 del virus dell'epatite C (HCV) fu seguita dalla ampia diffusione di un test semplice e non eccessivamente costoso per la determinazione dei relativi anticorpi (anti-HCV), il che consentì di definire sempre meglio la storia naturale della infezione da HCV. Questa è seguita da guarigione spontanea solo in una esigua percentuale di casi, compresa tra il 20% e il 30% dei pazienti affetti.

Circa il 60-80 % dei pazienti sviluppano un'infezione cronica da HCV, che nel 15% dei casi evolve più o meno lentamente verso la cirrosi epatica e le sue gravi complicanze.

Con il progressivo migliorare delle conoscenze fu compreso che solo in una minoranza di casi la presenza di anticorpi anti-HCV è indicativa di immunizzazione e di avvenuta guarigione, in quanto la presenza di anticorpi coesiste con la presenza del virus, identificabile tramite la rilevazione del genoma virale circolante (HCV RNA sierico). È stato inoltre chiarito che molti soggetti anti-HCV positivi hanno normali livelli di alanina transaminasi (ALT), e che la maggioranza di essi (70-80%) presenta stabile HCV RNA positività. Pertanto queste persone sono viremiche e potenzialmente contagiose, nonostante la normalità della biochimica epatica. Si calcola che i portatori di HCV con ALT normali rappresentino il 20-30% circa di tutti i pazienti HCV positivi. In Italia la prevalenza è del 2-3% circa, con percentuali minori al Nord (0,7-1,5%), intermedie al Centro (2-3%), e progressivamente più elevate al Sud (5-12%). I dati epidemiologici dimostrano inoltre un effetto coorte, con netto incremento della prevalenza degli anticorpi nei soggetti più anziani.

Studi recenti hanno dimostrato che solo una minoranza di questi soggetti mostra una istologia normale alla biopsia epatica, e che nella maggior parte di essi è presente un danno epatico in genere modesto, che però in diversi casi può evolvere in fibrosi epatica o anche in cirrosi

A.

Il virus HCV

I. Caratteristiche del virus

Il virus dell'epatite C, che prima della sua identificazione era chiamato "virus dell'epatite non A non B", è un virus a singola elica, a polarità positiva, con un'organizzazione genomica che è simile a quella dei flavivirus e dei pestivirus; l'HCV costituisce un proprio genere, Hepacivirus, nella famiglia Flaviridae.

Il virione ha un diametro di 50-60 nm ed è dotato di un involucro lipoproteico. Il genoma dell'HCV contiene un unico gene che codifica per una poliproteina virale di circa 3000 aminoacidi. L'estremità 5' del genoma consiste in una regione non tradotta contenente un sito d'entrata interno ribosomiale adiacente ai geni che codificano per le proteine strutturali, come la proteina *core* e le due glicoproteine di superficie E1 e E2/NS1. La regione 5' non tradotta e il gene della proteina *core* sono molto simili anche tra genotipi differenti, a differenza delle proteine di superficie che sono codificate dalle regioni supervariabili, ritenute sedi di epitopi neutralizzanti ed espressione dell'influenza esercitata dai dispositivi immunitari dell'ospite sulla sopravvivenza di mutazioni che sfuggono alla neutralizzazione. L'estremità 3' del genoma codifica per le proteine non strutturali che funzionano come proteasi (NS2, NS3 e NS4A), elicasi (NS3) e RNA-polimerasi RNA dipendente (NS5B). Nonostante la struttura cristallina di NS3 e NS5 sia ormai nota, la funzione di proteine come p7 non è stata ancora definita con precisione.

Sono stati identificati sei diversi genotipi dell'HCV, così come differenti sottotipi all'interno dei vari genotipi. Questi differiscono tra loro per almeno il 30% della sequenza. Con il termine *quasispecie* si definiscono invece le popolazioni virali isolate all'interno dello stesso genotipo o sottotipo e nello stesso ospite, le cui sequenze differiscono in modo insufficiente (pochi punti percentuali) per poter definire un distinto genotipo. La diversità genotipica e delle quasispecie dell'HCV, che deriva dall'elevato tasso di mutazione di questo virus, interferisce con una efficace immunità umorale.

II. Ingresso del virus nell'ospite

Benché nel 40% dei casi di infezione da HCV la sorgente di infezione non venga identificata, si ritiene che la via più frequente di contagio sia quella parenterale. I virioni di HCV diffondono per via ematica e dopo circa 2 giorni dal contagio, come valutato negli scimpanzé, l'HCV-RNA è riscontrabile già nel fegato, sito primario di replicazione di HCV.

La proteina transmembrana CD81 è responsabile del legame con l'HCV e viene espressa sulla maggior parte delle cellule del nostro organismo, eccetto i globuli rossi e le piastrine.

Un'altra proteina deputata al legame con l'HCV è il recettore per la lipoproteina LDL (LDLr).

III. Tropismo cellulare e tissutale

Il fegato, in qualità di sito primario di replicazione dell'HCV, è l'organo che contiene una quantità più elevata di HCV-RNA. Tuttavia solo una piccola percentuale di epatociti (5-19%) sono positivi all'HCV-RNA una volta effettuata l'ibridazione in situ. Inoltre, l'espressione di antigeni dell'HCV è relativamente bassa (1-10%). Infatti solo una piccola percentuale di cellule (1-5%), come monoliti, le cellule dell'epitelio biliare o le cellule che rivestono i sinusoidi epatici, esprimono antigeni dell'HCV.

B. Diffusione della malattia

I. Epidemiologia

L'epatite C è una malattia diffusa a livello mondiale, con una prevalenza variabile in base alle aree geografiche. Nel mondo circa 170 milioni di persone sono affette dal virus dell'HCV, con un'incidenza più elevata di epatiti acute nei soggetti di età compresa tra i 20 e i 39 anni.

Inoltre la prevalenza di persone affette varia dallo 0,1% di paesi come l'Islanda e la Norvegia al 18,1% dell'Egitto.

Negli Stati Uniti circa l'1,8% della popolazione risulta essere positivo agli anticorpi anti-HCV e il virus dell'HCV è responsabile di circa il 20% delle epatiti acute, del 70% delle epatiti croniche e del 30% di cirrosi.

In Italia, l'HCV è responsabile della maggioranza delle epatiti croniche (50-80%) con differenze legate alla specificità dei reparti clinici e dei bacini d'utenza. Inoltre alcuni studi di popolazione hanno evidenziato che la prevalenza di pazienti positivi agli anticorpi anti-HCV aumenta con l'età.

Il CDC (Centro per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie) ha stimato che nel 1995, negli Stati Uniti, ci furono circa 28 mila nuovi casi di infezioni da HCV, questo paragonato con i 180 mila casi all'anno che si registravano negli anni '80. Questa notevole caduta di nuove infezioni da HCV è in gran parte dovuta agli esami di screening effettuati su pazienti donatori di sangue a partire dagli anni '80.

II. Fattori di rischio

Qualsiasi comportamento, occupazione o condizione medica che porti al contatto con sangue infetto da HCV può mettere a rischio di contagio da Epatite C. Oltre alle trasfusioni di sangue, l'utilizzo di prodotti del plasma è associato al rischio di infezione da HCV. In uno studio compiuto tra il 1991 e il 1996 su una popolazione di pazienti americani affetti da epatite C, la CDC ha rilevato che il 59 % dei pazienti con la forma acuta di epatite aveva un'anamnesi positiva per uso di droghe, scambio di siringhe o aghi infetti.

Tra i principali fattori di rischio non bisogna dimenticare i tatuaggi effettuati con aghi non sterili, i rapporti sessuali non protetti, l'agopuntura, gli interventi chirurgici e odontoiatrici. Circa il 10% dei pazienti con epatite C acuta non ha fattori di rischio epidemiologici conclamati.

C. Caratteristiche cliniche e storia naturale

Il virus HCV rappresenta una causa importante sia di epatite acuta sia di epatite cronica.

I. Epatite acuta

L'epatite C ha un periodo di incubazione media di sette settimane, valore che può oscillare dalle due alle 26 settimane.

I sintomi principali, che comprendono malessere generalizzato, nausea e dolore in ipocondrio destro, riscontro di urine scure e ittero sono caratteristici di circa un terzo dei pazienti affetti. La maggior parte dei pazienti infettati da HCV si presenta invece asintomatica o paucisintomatica.

I dati di laboratorio evidenziano un'elevazione delle transaminasi sieriche (ALT) in più dell'80% dei pazienti HCV positivi, con livelli che raggiungono e superano anche di 10 volte il valore normale. L'elevazione delle transaminasi solitamente coincide con la comparsa dei sintomi, ed entrambi tendono ad autorisolversi nel giro di 2-12 settimane. L'HCV-RNA può essere riscontrato nel siero di pazienti affetti in un periodo che solitamente si aggira intorno alle tre settimane trascorse dal contagio. Nelle forme di epatite C che guariscono definitivamente, l'HCV-RNA scompare dal siero e la malattia si risolve. Tuttavia questi pazienti, nonostante abbiano già contratto la malattia, non sono immuni da una eventuale reinfezione.

Molto raro è il riscontro di epatiti C con esordio fulminante.

In caso di epatite C acuta non è raccomandata l'effettuazione di una biopsia epatica in fase diagnostica. Comunque, il quadro istopatologico di un fegato durante un'epatite virale acuta del tipo C comprende un infiltrato linfocitario nel parenchima epatico, con epatociti caratterizzati da citoplasma eosinofilo, corpi acidofili, steatosi microvescicolare e attivazione delle cellule sinusoidali.

II. Epatite cronica

La principale caratteristica dell'HCV è quella di causare nella maggior parte dei casi una infezione persistente nel tempo. Nell'80% circa dei casi di infezione da HCV, la malattia persiste per più di 6 mesi o più sovente per tutta la vita.

I pazienti che hanno sviluppato una forma cronica di epatite C diventano fonte di infezione per altre persone e sono loro stessi a rischio di sviluppare complicanze epatiche importanti come la cirrosi e l'epatocarcinoma.

Molti pazienti affetti da epatite cronica di tipo C sono assolutamente asintomatici, e il riscontro della malattia avviene occasionalmente durante una visita medica o durante una donazione di sangue. Altri, tuttavia, sviluppano patologie epatiche croniche gravi nel giro di pochi anni o, più frequentemente, nel giro di alcuni decenni.

I pazienti affetti possono presentare un quadro sintomatologico tipico, che comprende astenia, anoressia, nausea, dolore localizzato all'ipocondrio destro, riscontro di urine scure o prurito generalizzato. L'astenia può in alcuni casi essere l'unico sintomo presente.

I livelli di transaminasi solitamente sono molto oscillanti, e possono variare da valori normali a valori persistentemente elevati. Non è detto tuttavia che valori normali di ALT corrispondano ad una fase iniziale della malattia.

È molto difficile prevedere l'epilogo di un'infezione cronica da HCV nel singolo paziente. Tuttavia è stato dimostrato che i pazienti affetti da HCV con un danno epatico ingente, sviluppano gravi sequele, come la cirrosi o l'epatocarcinoma.

I fattori più coinvolti nell'accelerazione dell'evoluzione della malattia sono rappresentati dall'età avanzata al momento dell'infezione, dal sesso maschile, dall'assunzione di alcolici, dalla coinfezione con HIV e HBV, dall'associazione con patologie metaboliche (diabete, obesità, etc.) e, secondo alcuni autori, anche dal genotipo virale, dalla carica virale e da probabilmente da una predisposizione genica. I sintomi che caratterizzano la cirrosi epatica, indicatori di un quadro di insufficienza epatica, comprendono astenia, debolezza muscolare, ritenzione idrica, ecchimosi dovute alla ridotta sintesi di vitamina K, emorragie del tratto gastroenterico superiore, ittero, prurito e bilirubinuria. In alcuni casi i pazienti possono rimanere asintomatici fino alla comparsa di emorragia da varici esofagee o ascite.

D.

Infezione da virus dell'epatite C ed epatocarcinoma

I. Epatocarcinogenesi

Il 15-20% dei pazienti con infezione persistente sviluppa una patologia epatica progressiva con possibile esito in cirrosi ed epatocarcinoma dopo 20-30 anni dall'infezione

Gli studi epidemiologici sull'associazione tra infezione da virus dell'epatite C e sviluppo di HCC sono iniziati in rapida successione dopo la messa a punto del primo saggio di rilevamento anticorpale specifico. L'infezione da HCV è stata dimostrata fattore di rischio indipendente anche da quella da HBV.

I possibili meccanismi di induzione di HCC da parte del virus HCV sono tuttavia poco noti trattandosi di un virus ad RNA nel cui ciclo replicativo, che avviene nel citoplasma, non è presente una fase a DNA né è nota la possibilità della presenza di integrazioni virali o di oncogeni virali. Si ritiene che un ruolo importante sia dato dalla persistenza virale per lo stimolo immunitario incessante che esercita, con induzione del processo cirrogeno. La persistenza all'interno dell'organismo sembra imputabile alla capacità del virus di mutare continuamente, sfuggendo così al controllo immunitario. Un'altra possibile spiegazione dell'alto numero di cronicizzazioni risiede nella sua tendenza ad infettare le cellule immuno-competenti alterando così la normale risposta alle infezioni, tra cui anche quella allo stesso HCV. Inoltre, l'HCV determina uno stress ossidativo cronico con possibile effetto mutageno sul DNA specie in quei pazienti che continuano ad assumere bevande alcoliche, e causa un processo di marcata angiogenesi epatica. Quest'ultima condizione è di per sé un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie quando occorra in organi adulti, e contribuisce alla crescita del tumore oltre che alla prognosi. I meccanismi molecolari possibili potrebbero vedere coinvolti la ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) e la cicloossigenasi inducibile (COX-2), oltre che il VEGF.

L'analisi in microarray di HCC ha suggerito che alcuni clusters di geni coinvolti nella crescita cellulare sono sovra-regolati (PCNA, membri della famiglia delle cicline: CDC20, CDK4; Myb), mentre altri geni della famiglia Wnt catenina- β e delle metalloproteinasi sono risultati modulati nella espressione in HCC.

II. Ruolo delle proteine virali

Ulteriori ipotesi sono relative ad un possibile ruolo indiretto di alcune proteine virali, in particolare la proteina core e l'NS5. Esse sono in grado di influenzare profondamente la biologia della cellula infettata attraverso la modulazione di *pathway* intracellulari di trasduzione di segnali proliferativi, antiproliferativi e metabolici. La espressione di HCV core nel fegato di topi transgenici si accompagna allo sviluppo di HCC. La proteina core di HCV interferisce con il metabolismo lipidico e modula la trascrizione, la proliferazione cellulare e la morte cellulare programmata: in particolare, interagisce con diverse vie di trasduzione dei segnali intracellulari (TNF- α , NF- κ B, attivazione della via indotte da stress ossidativi: chinasi MAPK, JNK/SAPK), provocando un'attivazione prolungata nel tempo, dopo stimolazione con fattori di crescita, delle chinasi Erk1 ed Erk2, la cui funzione è soprattutto pro-proliferativa. Mentre nel caso dell'attivazione di NF κ B il meccanismo di azione della proteina core non è chiaro, nel caso dell'attivazione delle MAPK è stato proposto che core agisca attraverso il legame con le proteine 14-3-3 e potenziando l'attività della chinasi Raf-1. La proteina del core, inoltre, inibisce e induce l'apoptosi Fas- e TNF- α , mediata contribuendo in tal modo ad una aumentata sopravvivenza o ad un incremento della proliferazione degli epatociti. Inoltre influenza la risposta immunitaria, riducendo ad esempio la capacità di risposta degli epatociti al TNF- α . Altri studi hanno dimostrato che la proteina del core virale è in grado di sia di inibire che attivare le funzioni di p53 e di interferire con la via del pRb dando una up-regolazione della proteina E2F-1. Recentemente è stato dimostrato che l'espressione di HCV core si associa sia a stress ossidativo che a ER-stress, con conseguente mobilitazione di calcio, modificazioni del potenziale mitocondriale, attivazione di NF κ B ed induzione di apoptosi. Anche il rapporto delle cicline tra loro verrebbe alterato per l'azione del virus C. Un ruolo diretto nell'induzione di HCC è stato evidenziato in topi transgenici per l'espressione di core in cui viene accelerata l'induzione di carcinoma epatico.

La proteina non strutturale NS5A di HCV inibisce l'attività della PKR, una chinasi indotta dall'interferone, conferendo resistenza e contribuendo alla persistenza dell'infezione, e rende le cellule resistenti all'apoptosi indotta da dsRNA esogeno. NS5a modula anche la trascrizione, la trasduzione di segnali mitogenici, il ciclo cellulare e l'apoptosi.

La proteina non strutturale NS3, invece, con la sua attività proteasica e di elicasi può trasformare fibroblasti in coltura, in particolare sembra che NS3 possa regolare l'attività catalitica della proteina chinasi AMP ciclico- dipendente come anche la localizzazione di p53.

E. Colture epatocitarie umane

Nell'ultimo decennio vi è stato un notevole incremento del numero delle pubblicazioni inerenti lo sviluppo di sistemi di coltura epatocitari. Numerosi sono infatti i vantaggi che tale sistema sperimentale è in grado di offrire, almeno da un punto di vista teorico: in primo luogo il risparmio del sacrificio di animali di laboratorio. Anche se si superassero le considerazioni etiche, il ricorso alla sola sperimentazione animale comunque non annullerebbe i rischi derivanti dalle differenze metaboliche presenti nelle diverse specie: i ratti, per esempio, sono un modello inattendibile per quanto concerne il metabolismo di fase I nell'uomo. Il modello sperimentale ideale sarebbe quello che ricrei perfettamente l'organizzazione tridimensionale del parenchima epatico, preservi la totalità delle funzioni metaboliche, consenta la raccolta e l'analisi della bile, e mantenga le cellule polarizzate e vitali per lungo tempo. Per tale motivo in passato si è tentato il ricorso a sistemi sperimentali quali il fegato isolato perfuso e, più recentemente, alle sezioni tissutali.

I modelli sperimentali alternativi rispetto a quelli sopra elencati hanno tutti la caratteristica di presentare le cellule in monostrato, con la perdita quindi delle interazioni presenti in vivo nella struttura tridimensionale. Un vantaggio offerto da queste colture è tuttavia la loro estrema semplicità: si tratta abitualmente di modelli costituiti da un unico tipo di cellula, funzionalmente integra, vitale ma posizionata al di fuori dell'organismo. Questo implica la possibilità di indagare le funzioni cellulari più fini, le diverse interazioni molecolari ed attività enzimatiche estraniandole da un contesto generale nel quale alcune informazioni potrebbero essere mascherate o minimizzate dalla presenza di inibitori oppure dall'effetto del metabolismo sistemico. Essendo il sistema così semplice, esso risulta inoltre facilmente modulabile, il che consente di creare condizioni di coltura adattabili alle necessità della sperimentazione.

Il modello in vitro oggi più largamente utilizzato è rappresentato dalla coltura primaria di epatociti. Con tale termine si usano indicare colture di cellule originate direttamente dall'organismo, che non sono andate necessariamente incontro a replicazione in vitro. Le colture primarie offrono il vantaggio della semplicità di preparazione e dalla possibilità di mantenere, fino a circa 72 ore dal loro isolamento, caratteristiche di polarizzazione e differenziazione. Il loro principale svantaggio consiste però proprio nel limitato arco di tempo nel quale la sperimentazione può essere condotta in condizioni di omogeneità del sistema sperimentale. Nonostante la nota capacità rigenerativa del fegato, solo nel 1981 si giunse allo sviluppo della prima linea cellulare umana, le Hep-G2, ottenute da un epatoma: la disponibilità di tale linea portò ad un notevole sviluppo degli studi inerenti gran parte delle funzioni epatocitarie. Tuttavia più le ricerche progredivano, più diveniva evidente che le Hep-G2, in quanto cellule neoplastiche, si distaccavano dalla normalità, risultando prive di alcune fondamentali funzioni presenti in vivo e di alcuni aspetti di differenziazione indispensabili per l'interazione con molecole o virus.

Pertanto, la necessità di un sistema colturale "normale" divenne sempre più urgente e si tentò di rimediare alla difficoltà di indurre la replicazione di epatociti posti in coltura primaria inserendo stimoli mitogeni nel sistema di coltura o all'interno delle cellule stesse. Utilizzando metodiche quali la cocoltura con cellule epiteliali di ratto ed il ricorso alla transfezione con oncogeni virali o con geni di origine virale (Simian virus 40 large tumor antigen gene), fu possibile ottenere la crescita e "l'immortalizzazione" di tali cellule in coltura, senza tuttavia consentire il mantenimento, in vitro, di tutti gli aspetti di differenziazione. Negli ultimi anni, infine, è stato pubblicato il primo lavoro relativo allo sviluppo di una coltura epatocellulare umana normale da parte del gruppo di Kono et al, in cui non vi era tra l'altro la necessità di utilizzare una cocoltura con cellule non epatocitarie: tali epatociti venivano descritti come in grado di mantenere, dopo più di un anno di coltura continua, la morfologia e le funzioni proprie degli epatociti differenziati. Tuttavia, a rigore, le cellule non potevano essere definite normali, in quanto l'esame del cariotipo aveva rivelato numerose anomalie quali poliploidia e delezioni significative nella struttura cromosomica. A nostra conoscenza, pur essendo passati più di 10 anni, non sono comunque molti i lavori successivi che siano stati raggiunti risultati comparabili.

Una ulteriore frontiera della scienza, ancora tutta da sviluppare, deriva dalla scoperta che durante l'organogenesi epatica le cellule staminali migrano dal midollo osseo nel fegato per differenziarsi in epatociti, e dal conseguente quesito se esse possano essere indotte a rigenerare o se giochino un ruolo nella ripopolazione degli epatociti. Questa potenzialità delle staminali dell'adulto, che sono di uso corrente nel trapianto di midollo osseo e di cute, renderebbe non necessario il ricorso alle staminali embrionali, dotate di maggiore plasticità e capacità autoriproduttiva, ma il cui impiego terapeutico è soggetto a severe limitazioni

etico-scientifiche. Per questo motivo, l'utilizzo di cellule staminali adulte, suscita grande interesse ed aspettative terapeutiche. Tra queste, particolare attenzione è stata riposta nell'utilizzo di tali cellule in alternativa al trapianto di fegato in soggetti affetti da gravi patologie epatiche (fibrosi, cirrosi e sclerosi). Esistono già alcuni studi pionieristici in cui cellule progenitrici ematopoietiche ed epatiche sono state isolate da sangue cordale umano ed espanse, saggiando diverse condizioni di coltura (differenziatesi per fattori regolatori epato-specifici, substrati cellulari -matrici organiche, "feeder layer"-, tempi dei passaggi in vitro). L'analisi delle sequenze genomiche dei markers specifici individuati durante il processo di differenziamento ed implicati nella sintesi delle molecole epatospecifiche sono ormai appannaggio di appositi programmi di bioinformatica e biostatistica: l'integrazione di metodiche biologiche, di genomica, proteomica e di bioinformatica permetterà probabilmente di individuare fattori critici per la regolazione in vitro del "commitment" epatocitario.

OBBIETTIVI DEL PROGETTO

Il mio progetto di dottorato ha lo scopo di caratterizzare e meglio definire il ruolo della proteina core dell'HCV nello sviluppo di epatocarcinoma.

A questo fine, le fasi sperimentali in successione logica sono:

- clonaggio della proteina del core
- studio dell'espressione e della localizzazione della proteina del core in diverse linee cellulari:
 - COS-7: derivata da rene di scimmia
 - HEK-293: derivata da cellule embrionali umane di rene
 - HepG2: derivata da epatocarcinoma umano
 - Huh-7: derivata da epatoma umano
 - HTC: derivata da epatoma di ratto
- messa a punto di un sistema di epatociti normali in coltura:
 - I) definire le condizioni di coltura che possono consentire lo sviluppo di un sistema epatocellulare, in grado di mantenere le caratteristiche morfologiche e funzionali proprie degli epatociti differenziati;
 - II) caratterizzare tale sistema in termini di integrità genomica e di modulazione della crescita in specifiche condizioni sperimentali, preliminari ad un loro eventuale utilizzo clinico, ad esempio per il fegato bioartificiale o per trapianto di epatociti.
- studio di eventuali differenze nell'espressione della proteina in funzione dello splicing cellulare

BREVE SINTESI DEI RISULTATI RAGGIUNTI NEI PRIMI 2 ANNI DI DOTTORATO

A. Materiali e metodi

- E' stato isolato ed amplificato il genoma virale dal siero di 5 pazienti HCV positivi (con genotipo 1b).
- I prodotti dell'amplificazione sono stati quindi clonati nel plasmide pMOS blue. Il DNA plasmidico è stato poi sequenziato nella regione dell'inserimento; dai batteri, che al sequenziamento hanno mostrato di contenere la sequenza corretta del gene, è stata ottenuta una Midi-preparazione di DNA plasmidico (p102).
- E' stata iniziata la messa a punto del subclonaggio del frammento di cDNA contenente il core in plasmidi batterici ingegnerizzati, così che il cDNA fosse posto sotto il controllo di promotori virali, in vista dell'espressione in cellule di mammifero.
- E' stata studiata l'espressione cellulare della proteina core in cellule COS-7 (tramite immunofluorescenza e western-blotting)
- E' stata studiato lo splicing della proteina del core nelle cellule COS-7 tramite:
 - Subclonaggio della sequenza del core e di E1 nel plasmide di espressione pDNR*
 - Espressione della sequenza del core e di E1 nelle cellule COS-7*
- E' stata studiato lo splicing della proteina del core nelle cellule HepG2 (tramite immunofluorescenza e western-blotting)

B. Discussione

- Gli esperimenti effettuati hanno dimostrato che la proteina del core ha un'espressione maggiore nelle cellule in cui la sequenza proteica è posta sotto il controllo del promotore dell'Adenovirus (rispetto al promotore del Citomegalovirus), per un probabile effetto inibitorio diretto della proteina del core sul promotore del Citomegalovirus. Questo fenomeno viene parzialmente revertito quando viene subclonata una regione più ampia della sequenza virale, contenente una parte della regione non tradotta al 5'.
- E' stato dimostrato uno splicing cellulare della proteina (core p21 e p19), ma solo nelle cellule trasfettate con la forma lunga di proteina (contenente anche la sequenza E₁ ed una parte della sequenza E₂).
- E' stata dimostrata una localizzazione solo citoplasmatica nelle cellule COS-7 (qualunque fosse il tipo di plasmide utilizzato), mentre gli esperimenti effettuati sulle cellule HepG2 avrebbero dimostrato una localizzazione anche nucleare.

MATERIALI E METODI (III ANNO)

A. Subclonaggio della sequenza del core

I. Digestione plasmidica

Il plasmide pDNR (contenente il promotore precoce del Citomegalovirus) ed il plasmide p102 (plasmide pMOS blue contenente la sequenza del core) sono

stati sottoposti a digestione con gli enzimi EcoR I e Sal I. Successivamente si è provveduto a pareggiarne le estremità aggiungendo alla reazione l'enzima Klenow. Dopo inattivazione dell'enzima, i plasmidi sono stati sottoposti a digestione con gli enzimi EcoR I e Hind III, e a successivo pareggiamento delle estremità. Il frammento contenente il core è quindi stato liberato tramite digestione con EcoR I. Il plasmide pCDNA 3.1 (contenente il core) è stato chiamato p110.

II. Ligazione e trasformazione batterica

I prodotti delle digestioni sono stati quindi separati su gel di agarosio ed i plasmidi pDNR, pMT2 ed i frammenti contenenti il core sono stati recuperati dal gel e purificati. La ligazione è stata effettuata mediante T4 DNA Ligasi ed incubata a 22°C; dopo 2 ore 5µl sono stati utilizzati per la trasformazione dei batteri competenti (heat-shock: incubazione a 42°C per 2 minuti e immediato raffreddamento su ghiaccio), mentre l'aliquota rimanente è stata incubata per altre per 16-18 ore, e quindi conservata a 4°C per eventuali ulteriori trasformazioni.

I batteri sono quindi stati fatti crescere su piastre in presenza di ampicillina. Dalle colonie cresciute sono state fatte alcune miniprep, poi sottoposte a digestione con EcoR I e Hind III per 30 min a 37°C.

B. Subclonaggio della sequenza del core e di E1

La sequenza codificante per le proteine del core e dell'envelope è stata ottenuta tramite digestione del plasmide pBRT7O3'X, gentilmente fornito dal Prof. Suzuki Tesuro (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo Giappone). Il plasmide di 13938 pb contiene l'intero genoma del virus HCV 1b, clone NIHJ1 (GeneBank: D_89815), inserito in corrispondenza del sito Hind III del plasmide pBR322. Il cDNA virale è di 9548 pb; la poliproteina è codificata a partire dal sito di taglio Stu I.

Il plasmide è stato sottoposto a digestione con gli enzimi Stu I ed Xho I. Dal pattern di restrizione dei frammenti prodotti è stata recuperata la banda di 2003 bp, contenente il core, E1 e parte di E2; il DNA ottenuto dal frammento è stato subclonato nel plasmide pDNR precedentemente digerito con gli enzimi Sma I e Xho I (plasmide p112).

C. Espressione in cellule eucariote

I. Linee cellulari

Gli esperimenti di espressione transiente già iniziati lo scorso anno sono stati proseguiti sulle linee cellulari HEK-293, originata da cellule embrionali umane di rene, e Huh7, derivata da epatoma umano. Tutte le linee sono state coltivate terreno di coltura DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium) addizionato di glutamina, penicillina, streptomina e siero bovino fetale. Le Huh7 sono state addizionate anche di aminoacidi non essenziali. Per la propagazione delle cellule, i monostrati cellulari sono stati disaggregati tramite digestione con una soluzione di tripsina per 5-10 min e quindi divise in nuove fiasche. Le linee cellulari sono state incubate a 37° C in presenza del 5% di CO₂.

II. Trasfezione

vedi protocollo della relazione del II anno.

D. Immunofluorescenza indiretta

I. Fissaggio e permeabilizzazione delle cellule

vedi protocollo della relazione del II anno

II. Immunoreazione

vedi protocollo della relazione del II anno

E. Western-blotting

I. Lisi cellulare

vedi protocollo della relazione del II anno

II. Elettroforesi delle proteine

vedi protocollo della relazione del II anno

III. Trasferimento delle proteine

vedi protocollo della relazione del II anno

IV: Immunoreazione

vedi protocollo della relazione del II anno

F. Sviluppo e caratterizzazione di una linea epatocitaria normale

I. Terreno di coltura

Il mezzo di coltura utilizzato per stimolare la crescita epatocitaria è stato denominato HCM (Hepatocyte Culture Medium) ed è costituito da un terreno base (Ham F12, Coon's modifications, GIBCO), commercialmente disponibile, nella cui composizione sono presenti tutti gli aminoacidi, sali minerali (calcio, rame, ferro, potassio, magnesio, zinco), vitamine, composti organici ed inorganici di diversa natura. A tale terreno-base vengono aggiunti alcuni elettroliti (sali di calcio, magnesio, bicarbonato di sodio e glucosio) ed alcuni componenti specifici per la crescita di epatociti, tra cui:

- Siero bovino fetale (Gibco, N.Y., USA)
- Insulina (Elanco, Indianapolis, Indiana), Transferrina (Sigma), Idrocortisone (Sigma), Glicil-Istidil-Lisina (Sigma) e Somatostatina (Sigma), un gruppo di sostanze denominato 5H
- Estratti di ipotalamo ed ipofisi (tessuti forniti dalla Pel Freez Biologicals, Rogers, Arkansas) preparati come descritto in precedenza ()
- Triiodotironina (Sigma)
- Rosso fenolo (Sigma)
- Streptomina (Gibco)
- Penicillina (Gibco)
- L-ornitina (1-2.5 Diaminopentanoic acid) (Sigma)

II. Terreno di differenziamento

Un diverso tipo di terreno è stato messo a punto al fine di ottenere la sopravvivenza a lungo termine delle cellule in coltura ma nel contempo un arresto della crescita cellulare. Il risultato atteso dal suo utilizzo era una maggiore differenziazione cellulare, con aumento dell'espressione di recettori di superficie, attivazione di vie metaboliche mantenute silenziose nel corso della replicazione, aumento delle granulazioni di glicogeno intracitoplasmatiche e quindi maggiore disponibilità di substrati per reazioni enzimatiche di ogni ordine.

Le modificazioni introdotte in tale terreno erano da un lato la sua semplificazione, ottenuta rimuovendo gli estratti di ipotalamo ed ipofisi ed il siero bovino e riducendo le concentrazioni ormonali, e dall'altro la modificazione delle concentrazioni di ioni, soprattutto Calcio e Magnesio, e di glucosio. Tale medium modificato è stato denominato HCM MOD.

III. Soluzioni utilizzate nelle diverse fasi della coltura

MOSH. Il MOSH o "Calcium and Magnesium free Hank's balance salt solution" rappresenta una soluzione tamponata estesamente utilizzata in tutte le operazioni che richiedano il risciacquo delle cellule o il loro mantenimento, per brevi periodi, fuori dell'incubatore senza medium.

CTC. Tale soluzione è stata utilizzata per il passaggio cellulare, ovvero per staccare le cellule adese alla superficie della piastra, minimizzando gli eventuali danni alla membrana citoplasmatica. La composizione base di tale soluzione è data da tripsina e collagenasi la cui azione tossica viene ridotta dall'aggiunta di siero di pollo. La composizione di un litro della soluzione è la seguente:

Hank's V stock solution. Tale soluzione costituisce fondamentalmente un sistema tampone atto a ricreare, in vitro, le caratteristiche elettrolitiche proprie dei fluidi biologici. Si tratta di uno dei costituenti base di un gran numero di soluzioni utilizzate nella coltura cellulare. La composizione, per ottenere una soluzione 20x, è la seguente:

Al fine di garantirne la sterilità, al momento della preparazione tutte le soluzioni su indicate, compresi i terreni, sono state fatte passare attraverso un filtro di diametro 0.2 μ .

IV. Allestimento della coltura primaria

Un frammento di tessuto epatico del peso approssimativo di 5 g, è stato ottenuto chirurgicamente da un paziente maschio di 61 anni, affetto da carcinoma del colon (stadio II secondo Dukes) nel corso di un intervento di resezione eseguito presso l'Istituto di Clinica Chirurgica dell'Università di Udine. Il paziente aveva fornito il proprio consenso informato per l'esecuzione della biopsia ed il suo successivo utilizzo per lo sviluppo di una coltura primaria. Il tessuto, è stato sospeso in MOSH, e quindi, dopo rimozione della capsula e dei frammenti vascolari di maggiori dimensioni, è stato frazionato meccanicamente prima di dare inizio alla sua digestione enzimatica con CTC, proseguita per due ore. Al termine, dopo una centrifugazione a 1000 rpm, condotta per 5 minuti, il soprannatante è stato aspirato ed eliminato, mentre il pellet cellulare è stato risospeso in terreno fresco e insemato in 6 piastre per coltura primaria. Circa 8 ml di terreno fresco HCM sono stati aggiunti in ciascuna delle piastre: il primo cambio è stato eseguito dopo circa una settimana dal piastramento.

Condizioni di coltura: le piastre sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C e con il 5% di CO₂. Il terreno (HCM) è stato cambiato due volte alla settimana, aggiungendo ad ogni cambio 8 ml di soluzione fresca.

V. Colture secondarie

Colonie cellulari epiteliali di aspetto poligonale sono state demarcate e successivamente isolate mediante uso di cilindri per clonaggio ("cloning cylinders"). Cilindri costituiti da materiale plastico sono stati sigillati alla base con grasso di silicone ed infine fatti aderire alla superficie della piastra, nelle zone precedentemente marcate. Il CTC è stato aggiunto fino al massimo volume consentito dal cilindro, e le piastre sono infine state riposizionate all'interno dell'incubatore per circa 30 minuti, fino cioè al completo distacco del monostrato cellulare. Infine la soluzione è stata aspirata ed il contenuto posizionato in piastre del diametro di 60 mm, cui erano stati precedentemente aggiunti 4 ml di terreno fresco.

Quando invece la crescita delle cellule all'interno delle piastre, primarie e secondarie, era giunta a confluenza, il passaggio è stato eseguito secondo un diverso protocollo. Il terreno veniva infatti aspirato e si procedeva ad un lavaggio della superficie cellulare con MOSH (8 ml circa). Dopo un minuto circa si procedeva all'aspirazione del MOSH e 2.5 ml di CTC (per piastre del diametro di 100 mm) venivano posizionati e lasciati agire per circa 1 ora in incubatore a 37 °C. La centrifugazione e la risospensione delle cellule sono state eseguite secondo quanto precedentemente descritto: il rapporto di ripiastramento è stato abitualmente di 1:4.

VI. Curva di crescita

L'analisi dei parametri di crescita della nostra coltura è stata eseguita tramite la costruzione di "curve di crescita" dopo circa 10 generazioni cellulari. Per ognuno dei tempi considerati sono stati preparati campioni cellulari in triplicato: il passaggio e la successiva conta cellulare sono stati eseguiti ogni due giorni. Sulla base dei grafici ottenuti sono stati desunti i parametri di crescita della popolazione mediante il calcolo del numero di duplicazione della popolazione (PDL). Il PDL indica il numero di generazioni compiute dalla popolazione, nell'intervallo di tempo considerato.

Nella fase di crescita logaritmica della curva, si considera un tratto approssimabile ad una retta; riferendosi ai

valori corrispondenti ai giorni estremi del tratto considerato si può applicare la formula $N_f/N_i=2^x$, dove N_f è il numero finale di cellule, N_i è il numero iniziale, x è il PDL.

Il tempo di duplicazione delle cellule in esame è il tempo necessario perché la popolazione cellulare raddoppi il numero dei suoi elementi ovvero perché una cellula origini due cellule figlie. Questo viene desunto considerando un intervallo di tempo, nella fase di crescita logaritmica, nel quale le cellule raddoppiano il loro numero e solitamente viene espresso in ore.

VII. Analisi della sintesi proteica

In piastre di 100 mm di diametro, contenenti cellule cresciute a confluenza, il terreno è stato aspirato e, dopo un lavaggio eseguito con MOSH, sono stati piastrati 8 ml di terreno di differenziamento (HCM MOD). Dopo 24, il terreno così "condizionato" in quanto rimasto a contatto con le cellule, è stato raccolto ed utilizzato per il dosaggio delle proteine totali utilizzando un metodo spettrofotometrico, solitamente applicato nel dosaggio delle proteine urinarie (Enzycolor, Proteine urinarie, Metodo Spettrofotometrico-POLI Diagnostici, Jersey City, USA). Il principio della reazione è il seguente: le proteine presenti nel campione reagiscono con il Rosso di Pirogallolo e con Molibdato in mezzo acido, formando, in modo proporzionale alla loro concentrazione, un complesso colorato che viene misurato spettrofotometricamente; la lettura viene eseguita a 600 nm.

VIII. Studio dell'mRNA

Dopo 10 e 20 generazioni cellulari, per giungere ad una ulteriore caratterizzazione cellulare, si è proceduto alla ricerca del mRNA codificante per proteine di specifica sintesi epatica. In dettaglio, si è ricercata la presenza di mRNA per albumina, alfa-fetoproteina, ferritina, transferrina, fattore IX della coagulazione. L'analisi è stata eseguita su un campione cellulare pari a 1×10^6 ; le cellule erano cresciute fino a confluenza al momento del passaggio ed erano state mantenute costantemente in terreno di crescita.

Per l'esecuzione dell'amplificazione di mRNA mediante la tecnica della reazione a catena delle polimerasi (PCR) sono necessari due passaggi preliminari quali l'estrazione genomica del total mRNA, eseguita con kit commerciali (Total quick RNA, Talent, Trieste, Italy) ed una retrotrascrizione, in quanto la PCR si può applicare solo su DNA.

Estrazione genomica. Il processo di estrazione consta di quattro distinti passaggi nei quali si ottiene, mediante l'aggiunta al campione di soluzioni di diversa composizione, dapprima la lisi cellulare, con precipitazione del materiale genomico sotto forma di complessi con il detergente, e successivamente la purificazione del mRNA dai detriti proteici e di DNA, mediante due distinti lavaggi con soluzioni contenenti cloroformio ed etanolo, nell'ordine. L'uso di provette di raccolta in cui viene ad accumularsi, mediante centrifugazione, il filtrato, facilita questi passaggi consentendo l'eliminazione ad ogni fase, del materiale indesiderato. Più in dettaglio, la procedura seguita prevedeva:

- aggiunta ad ogni campione di 700 μ l "Soluzione di lisi", contenente guanidinio isotiocianato, in una colonna di centrifugazione
 - incubazione per 10 minuti a 4°C
 - centrifugazione a 10,000 rpm per 15 secondi
 - eliminazione del filtrato ed aggiunta di 700 μ l di "Soluzione di lavaggio"
 - centrifugazione a 10,000 rpm per 1 minuto
 - eliminazione del filtrato ed aggiunta di 500 μ l di Etanolo al 70%
 - centrifugazione a 10,000 rpm per 1 minuto
 - inserimento della provetta di raccolta in una Eppendorf ed aggiunta di 100 μ l di acqua "RNAsi free".
 - agitazione per pochi secondi ed incubazione a 37°C per 5 minuti al fine di risospendere l'RNA raccolto
- Tutte le operazioni sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare tipo P2.

Retrotrascrizione. La sintesi di DNA complementare è stata ottenuta partendo da 4 μ l di estratto. Il primo passaggio consiste nel diluire 4 μ l di estratto in 25.5 μ l di acqua sterile. Tale miscela viene incubata per 10' a 65°C e posta immediatamente in ghiaccio al termine. Contemporaneamente viene preparata la mix di reazione come segue:

•Tampone 5X	10 μ l
•DTT 0.1 M	5 μ l
•Pd(N)6 (100 ng/ μ l, Pharmacia, Uppsala, Sweden)	1 μ l
•dNTP (1 mM, Pharmacia, Uppsala, Sweden)	1 μ l
•RT 10 UI (Transcriptasi inversa del virus della mieloblastosi murina)	1 μ l
•RNAsin 10 U.I. (Boehringer Mannheim, Germany)	1 μ l

Ad ogni campione vengono quindi aggiunti 20.5 μ l della mix di cui sopra e la retrotrascrizione viene effettuata per 1 ora a 37°C.

Amplificazione. Come precedentemente ricordato, la tecnica di amplificazione è stata applicata per la ricerca di mRNA codificante alcune proteine di specifica sintesi epatica. A tal scopo, la sequenza dei primers specifici è stata ricavata dalla consultazione elettronica della "Gene Bank" mentre la loro sintesi è stata ottenuta mediante utilizzo di un sintetizzatore di oligonucleotidi (Nucleotide Syntetizer Mod 320, Applied

Biosystem USA). I primers così ottenuti risultano ad una concentrazione pari a circa 500 ng/μl e vengono quindi diluiti in acqua ultrapura fino ad ottenere una concentrazione finale pari a 100 ng/μl. Infine, in un volume finale pari a 100 μl sono state eseguite le diverse amplificazioni utilizzando le specifiche coppie di primers. La composizione della miscela di reazione risultava la seguente:

•Campione estratto	3 μl
•dNTP 5 mM	1 μl
•Primer senso 100 ng/μl	1 μl
•Primer antisenso 100 ng/μl	1 μl
•Tampone 10 X	10 μl
•Magnesio	1 μl
•Acqua deionizzata	83.5 μl
•Taq Polymerase. 5 U.I.(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)	0.5 μl

La provetta "eppendorf" viene quindi ricoperta da 100 μl di olio minerale (Sigma Chemicals, St. Louis, USA) al fine da evitare l'evaporazione della mix nel corso del processo di amplificazione. Questo prevede infatti la ripetizione, per 30 volte, di un ciclo così costituito:

- Fase di denaturazione 1 minuto a 94°C
- Fase di accoppiamento 1 minuto a 55 °C
- Fase di estensione 1 minuto a 72°C

Qualora sia prevista l'esecuzione di una "Nested PCR" ovvero di una seconda amplificazione in cui i primers vengono codificati in modo da allinearsi a sequenze localizzate all'interno del frammento oligonucleotidico ottenuto con la prima amplificazione, il secondo round di PCR viene effettuato, alle stesse temperature, sempre per 30 cicli, partendo da 3 μl del primo amplificato.

Le sequenze dei primers utilizzati sono le seguenti:

Albumina

EX S:	5' -TGA AAT GGC TGA CTG CTG TG-3'	nt 401-421
EX AS:	5' -CAT CCC GAA GTT CAT CGA G-3'	nt 709-689
IN AS:	5' -GCA GCT TTA TCA GCA GCT TG-3'	nt 674-655
IN S:	5' -TGA AAT GGC TGA CTG CTG TG-3'	nt 401-421

L'amplificato atteso è di 273 bp

*Emi nested.

Fattore IX della coagulazione

EX S:	5' -TGG AAT GGT AAA GTT GAT GC-3'	nt 731-750
EX AS:	5' -CTC CTT GAC ATG AAT CTC TAC-3'	nt 1231-1209
IN AS:	5' -GCC CAC TGT GTT GAA ACT G-3'	nt 797-815
IN S:	5' -GCC AGC ACA GAA CAT GTT G-3'	nt 1197-1177

L'amplificato atteso è di 406 bp

Transferrina

EX S:	5'-CAG TGT CGG AGC ATG AGC CC-3'	nt 116-136
EX AS:	5'-GTG GCT CAG GTA CAC AG-3'	nt 514-495
IN AS:	5'-GCG TCA TTC CAT CCG ATG G-3'	nt 169-188
IN S:	5'-CCA GCG GAC CTG CCT AGA C-3'	nt 467-448

L'amplificato atteso è di 298 bp

Eritropoietina

EX S:	5'-CCT CTG GGC CTC CCA GTC-3'	nt 55-72
EX AS:	5'-CCC CTG TGT ACA GCT TCA-3'	nt 553-536
IN AS:	5'-GAC AGG TAC ATC TTG GAG GC-3'	nt 115-134
IN S:	5'-GTG AGT GTT CGG AGT GGA GC-3'	nt 479-460

L'amplificato atteso è di 363 bp

Alfafetoproteina

EX S:	5'-TGC GCA AGA ACT TTG CCA TG-3'	nt 7527-7546
EX AS:	5'-CTG TTT AGA TTT GGA GAT AG-3'	nt 14467-14447
IN AS:	5'-GGA GAA GTA CGG ACA TTC AG-3'	nt 7559-7579
IN S:	5'-TCT GCA TGA ATT ATA CAT TG-3'	nt 14425-14405

L'amplificato atteso è di 625 bp

Fibronectina

S:	5'-GCC ATT GAT GCA CCA T-3'
AS:	5'-TGT CTT TTT CCT TCC A-3'

L'amplificato atteso è di 250 bp

Elettroforesi. L'identificazione degli amplificati è stata condotta mediante corsa elettroforetica dei campioni in gel d'Agaroso al 1.5% in tampone TBE e dopo colorazione con Etidio Bromuro (). Quale tracciante dei pesi molecolari è stato utilizzato 1 μl di "1 Kb DNA Ladder" (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

IX. Ibridizzazione in situ dell'albumina

Per dimostrare il mantenimento della produzione di albumina da parte della nostra linea cellulare rendendola così riconoscibile in caso di xenotrapianto, riboprobe di cDNA corrispondenti ad una sequenza codificante l'albumina umana, dell'estensione pari a 2Kb (ATCC, Rockville, Maryland, USA), sono stati utilizzati per sintetizzare un trascritto SP6. Le cellule sono state fatte crescere fino a confluenza in capsule di Petri di 100 mm di diametro e sono state successivamente passate come precedentemente descritto. Il pellet ottenuto è stato sottoposto a centrifugazione (1000 rpm per 5 minuti) e successivamente fissato per 5 minuti prima di venire lavato per un minuto con ciascuna delle seguenti soluzioni: 0.2 N HCl, PBS e 0.3% Triton 100 X. Successivamente, una fase di digestione con Proteinasi K 100 µg/ml proseguita per due minuti a 37°C ha consentito di denaturare la membrana consentendo l'ingresso dei probe all'interno della cellula. Dopo un lavaggio per 30 minuti con il tampone di pre-ibridizzazione (2xSSC/formamide al 50%), l'ibridizzazione con il probe per l'albumina è stata eseguita a 42°C per 12 ore. Sono stati quindi eseguiti ripetuti lavaggi usando la soluzione 2xSSC a temperatura ambiente per 30 minuti, poi 0.1x SSC a 50°C per ulteriori 30 minuti. Infine anticorpi anti fosfatasi alcalina coniugata con anti-digossigenina diluiti 1:2000 sono stati applicati alla preparazione per un'ora e rimossi mediante lavaggio con tampone Tris. I probe sono stati visualizzati mediante l'uso del substrato Nitro-Blu-Tetrazolium/Bromo-Cloro-Indolyl-Fosfato (NTP/BCIP). I vetrini sono quindi stati risciacquati in acqua, colorati e montati in Glycergel.

X. Caratterizzazione morfologica

Colorazione con Ematossilina-Eosina. La prima valutazione morfologica delle cellule è stata effettuata mediante colorazione con Ematossilina ed Eosina. A tal fine, le cellule sono state fatte crescere sino a confluenza e successivamente mantenute in coltura, per circa 2 settimane, in terreno di differenziamento. Al termine di tale periodo, sono state staccate dalla piastra secondo la tecnica del passaggio (cfr; colture secondarie) ed infine risospese in soluzione fisiologica (PBS: NaCl 0.15 M, Tampone fosfato monobasico e bibasico di sodio 10 mM; pH 7.2-7.4). Si è proceduto quindi ai due successivi passaggi, ovvero:

•citocentrifugazione (posizionamento delle sospensioni cellulari in specifiche cellette che vengono successivamente montate su rotori di centrifuga: per effetto della forza centrifuga -1400 rpm per 10 minuti a 25°C- le cellule vengono ad attaccarsi sul vetrino portaoggetto, sul quale viene poi eseguita la colorazione. I vetrini vengono fissati e lasciati asciugare nel corso della notte. Il mattino seguente si procede quindi alla colorazione)

colorazione. Richiede una serie di passaggi 12uail fissazione, ripetuti lavaggi fino alla colorazione propriamente detta. Nell'ordine:

- Fissazione in alcool etilico a 95° per 10 minuti
- Lavaggio in acqua corrente
- Colorazione con Ematossilina di Mayer per 10 minuti
- Lavaggio in acqua per 10 minuti, fino a viraggio del colorante
- Lavaggio veloce in acqua distillata
- Passaggio in alcool etilico a 70° per 1 minuto
- Colorazione con Eosina alcoolica per 3 minuti
- Disidratazione progressiva in quattro fasi:
 - Passaggio in alcool etilico a 80°
 - Passaggio in alcool etilico a 95°
 - Passaggio in alcool etilico a 100°
 - Passaggio in Xilolo
- Montaggio del vetrino coprioggetto in balsamo

Analisi immunoistochimica. Al fine di caratterizzare ulteriormente la nostra popolazione cellulare, dopo dieci generazioni abbiamo eseguito un'indagine immunoistochimica con anticorpi specifici rivolti contro citocheratine ed integrine abitualmente presenti sulla superficie epatocitaria. Le cellule sono state cresciute in diverse condizioni:

- piastrate in capsule di Petri
- cresciute in "chamber slides" (Nalgene Nunc International, Naperville, USA) ovvero cellette in materiale plastico montate su vetrini portaoggetto.

L'uso delle due condizioni di coltura è stato dettato dalla ricerca della diversa espressione e localizzazione delle integrine nelle cellule fissate ed analizzate mentre a confluenza, con mantenimento cioè degli aspetti dettati dal contatto cellula-cellula, oppure dopo passaggio, condizione nella quale le cellule risultano isolate e non interagenti tra loro.

In entrambi i casi le cellule sono state mantenute in terreno di crescita fino al raggiungimento della confluenza, mentre successivamente sono state mantenute, per circa due settimane, in terreno di differenziamento.

I passaggi successivi hanno presentato alcune differenze a seconda del sistema di coltura utilizzato:

- le cellule cresciute in capsule di Petri sono state passate, raccolte e cito-centrifugate secondo la stessa metodica utilizzata per la colorazione con Ematossilina ed Eosina

•le cellule cresciute in chamber slides sono state sottoposte a lavaggio delicato con MOSH e si è proceduto alla analisi direttamente sul vetrino portaoggetto
E' stato quindi applicato il sistema anticorpo I, anticorpo II, avidina piu' enzima, substrato dell'enzima. I vetrini sono stati sottoposti ai seguenti passaggi:

- lavaggio con tampone fisiologico (PBS)
- fissazione in acetone a 4°C per 8 minuti
- incubazione in "siero normale non immune"(siero cioè dell'animale dal quale è stato prodotto l'anticorpo secondario in esame) per 20 minuti
- eliminazione, mediante assorbimento, dell'eccesso di siero
- incubazione con l'anticorpo primario per 1 ora
- lavaggio accurato; 5 minuti per due volte
- incubazione con l'anticorpo secondario, biotinilato per 30 minuti
- lavaggio di 5 minuti, ripetuto due volte
- incubazione con soluzione di Avidina legata alla Perossidasi, per 30 minuti
- lavaggio di 5 minuti, per due volte
- incubazione con il substrato cromogeno della perossidasi (Diaminobenzidina) per 10 minuti
- creazione di un leggero contrasto usando ematossilina di Mayer, per 2-3 minuti

Tale indagine è stata eseguita con i seguenti anticorpi:

- anti CAM 5.2: Anticorpo primario (monoclonale) di topo (Becton Dickinson, Plymouth, England): Anticorpo secondario di cavallo (Vector, Burlingame, USA)
- anti CK 8: Anticorpo primario (monoclonale) di topo (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany): Anticorpo secondario di coniglio (Dako, Glostrup, Denmark)
- anti CEA: Anticorpo primario (policlonale) di coniglio (Dako): Anticorpo secondario di maiale (Dako)

XI. Microscopia elettronica

Le cellule sono state cresciute sino a confluenza in piastre del diametro di 100 mm e mantenute in terreno di crescita sino al momento dell'analisi. E' stata quindi eseguita la fissazione a 4°C per 15 minuti con Glutaraldeide al 2.5% in un tampone sodio-fosfato (Glauert AM). Successivamente, le cellule sono state staccate meccanicamente dalla piastra, tramite utilizzo di una piccola spatola sterile ("scraper"). Ottenuto un pellet, la fissazione era stata proseguita, con la soluzione di cui sopra, per ulteriori due ore alla temperatura di 4°C. Dal pellet sono state ottenute infine sezioni di spessore inferiore ad 1 μm che sono state ulteriormente fissate per due ore a 4°C (Hayat) con una soluzione all'1% di Osmio tetraossido (Polysciences Inc., Warrington, PA). Le cellule sono quindi state colorate con 2% uranil acetato, disidratate in una serie graduale di lavaggi con etanolo, lavate, infiltrate ed imbibite in una resina plastica (Spurr). Dopo tali passaggi dai blocchetti sono state ottenute delle sezioni ultrasottili (50-70 nm) ed era stato eseguito un'ulteriore colorazione con piombo citrato. Le sezioni sono quindi state analizzate con un microscopio modello M902 della ditta Zeiss.

XII. Studio dei cromosomi

Definito il mantenimento delle caratteristiche morfologiche e di sintesi proprie degli epatociti, abbiamo valutato la "normalità" della nostra coltura continua sottoponendo le cellule ad analisi del cariotipo.

Le cellule sono state piastrate a bassa concentrazione, in numero di 5000 per vetrino coprioggetto: per ovviare alla sofferenza ed al rallentamento replicativo abitualmente osservati in colture a "bassa densità cellulare", 5 vetrini copri-oggetto sono stati posti in capsule di Petri del diametro di 100 mm. Dopo aver eseguito il passaggio delle cellule secondo la procedura precedentemente descritta (vedi colture secondarie), un ml di sospensione cellulare è stato piastrato su ogni vetrino: solo dopo due ore, ad adesione cellulare avvenuta, sono stati aggiunti 8 ml di terreno di crescita. Le cellule sono state quindi mantenute in incubatore, ed il numero di mitosi cellulari è stato monitorato: dopo due giorni di crescita le cellule sono state inviate al Laboratorio di Genetica, dove l'analisi è stata eseguita.

E' stata utilizzata la metodica abitualmente utilizzata per l'analisi delle cellule del liquido amniotico.

Procedura. Il primo passaggio di tale metodica è finalizzato a bloccare in metafase i cromosomi delle cellule in divisione: ciò è reso possibile dall'azione di depolimerizzazione attuata dalla Demecolcine ("Colcemid Solution", 10 g/ml, Gibco, N.Y., USA) sui microtubuli. In ciascuna delle capsule di Petri preparate come precedentemente descritto sono stati posizionati 5 ml di Demecolcine. Le piastre sono quindi state poste in termostato per 5 ore.

Si procede quindi all'allestimento dei preparati trattandoli con le seguenti soluzioni:

- soluzione ipotonica (KCl 0.073 M)
- prefissativo (2 volumi Soluzione Ipotonica, 3 volumi di fissativo)
- fissativo (1 volume di Acido Acetico, 3 volumi di di Metanolo)

Il protocollo prevede le seguenti operazioni:

- si rimuove il terreno di coltura
- si aggiungono nella piastra 10 ml di soluzione ipotonica, mantenendola per 9 minuti al fine di provocare il

rigonfiamento delle cellule e la dispersione dei cromosomi

- si aggiungono 10 ml di prefissativo per bloccare l'azione della soluzione ipotonica.
- si rimuovono la soluzione ipotonica ed il prefissativo e si aggiungono 10 ml di fissativo, mantenendolo per 5 minuti.

I vetrini portaoggetto vengono quindi prelevati dalle piastre e montati su vetrini portaoggetto con "Eukitt" (O. Kindler) per essere poi posti in una stufa dove vengono lasciati, a 40°C, per una notte. Si procede quindi alla colorazione con Giemsa al 5% ed all'osservazione al microscopio. Le metafasi vengono ricercate a 100 ingrandimenti e le migliori vengono fotografate a 1000 ingrandimenti. Di ogni campione vengono fotografate 6 mitosi e di ognuna di esse si misurano le coordinate per mezzo di una scala annessa al tavolino traslatore del microscopio, per poterli ritrovare e rifotografare in fluorescenza dopo colorazione con "Mostarda di Quinacrina". Per realizzare questa colorazione bisogna prima procedere alla decolorazione secondo i seguenti passaggi:

- immersione dei vetrini in fissativo, due volte per 5 minuti
- immersione in alcool etilico al 50% per 5 minuti
- immersione in acqua distillata, due volte per 5 minuti

I vetrini vengono quindi sottoposti a colorazione con "Mostarda di Quinacrina" per circa 30 minuti trascorsi i quali si procede al loro risciacquo sotto acqua corrente: vengono quindi montati i coprioggetto.

Le sei metafasi precedentemente fotografate vengono rifotografate in fluorescenza. Le metafasi si considerano ottimali quando i cromosomi sono ben separati, senza sovrapposizioni e con bandeggio evidente. Dalle fotografie delle metafasi scelte si procede al ritaglio dei cromosomi, al loro riordino ed alla numerazione per ricostruire il cariotipo cellulare.

XIII. Trasporto della bromosulfaleina

La bromosulfaleina (BSF) è un colorante in grado di muoversi da un compartimento cellulare ad un altro; essa cambia il proprio coefficiente di assorbimento secondo il pH, e può pertanto essere seguita con tecnica spettrofotometrica nei suoi spostamenti in compartimenti a diversa concentrazione idrogenionica. Numerosi sono i trasportatori che ne consentono l'ingresso all'interno della cellula: tuttavia l'unico elettrogenico è la bilitranslocasi, un enzima che media l'uptake della bilirubina dal circolo ematico all'interno degli epatociti. Abbiamo pertanto ricercato le modificazioni dell'assorbanza della BSF al fine di confermare il suo movimento attraverso la membrana di superficie delle cellule della nostra linea epatocitaria: abbiamo successivamente agito sul potenziale elettrico della membrana stessa al fine di dimostrare l'elettrogenicità di tale trasporto e la sua identità con quello della bilirubina.

Materiali. Le cellule sono state cresciute fino a confluenza in una capsula di Petri di 100 mm di diametro; sono state mantenute in terreno di crescita sino al momento del passaggio. Dopo centrifugazione il pellet è stato risospeso in PBS ed un'aliquota di sospensione cellulare pari a 25 µl è stata utilizzata quale campione. La miscela di reazione, volume finale 2.4 ml, presentava la seguente composizione:

- Sulfobromosulfaleina 26 µM
- Tampone fosfato (pH 7.8) 0.05 M
- NaCl 0.1 M

L'assorbanza è stata indagata con uno spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda (Sigma ZWS II) rispettivamente a 580/540 nm o a 580/500 nm

KCl 100mM è stato aggiunto alla miscela di reazione per dimostrare l'elettrogenicità del trasporto della BSF.

RISULTATI

A. Studio dell'espressione cellulare della proteina core nelle cellule Huh7 e HEK-293

Al momento l'espressione è stata analizzata solo in immunofluorescenza. Purtroppo, l'esperimento, ripetuto a tutt'oggi 5 volte, non ha ancora fornito risultati definitivi per una supposta scarsa efficienza di trasfezione dei plasmidi fin qui utilizzati (p110 e p112). Sembra comunque associata una duplice positività di espressione (citoplasmatica e nucleare) a livello delle cellule di derivazione epatocitaria (Huh7), mentre sembrerebbe confermata una localizzazione solo citoplasmatica a livello delle cellule di rene (HEK-293). Sono stati già raccolti i lisati cellulari, ma devono ancora essere effettuati gli esperimenti di Western-Blotting.

Recentemente, è stata acquisita dal Laboratorio di Patologia Generale (diretto dal Prof. Albano) la linea di epatoma di ratto HTC, su cui devono quindi ancora iniziare gli esperimenti programmati.

B. Messa a punta di un sistema di coltura epatocitaria

I. Colture primarie

La sospensione cellulare e dei piccoli frammenti tissutali residuati dopo la digestione enzimatica, sono stati distribuiti in piastre del diametro di 100 mm: a circa 24 ore dal piastramento è stato possibile osservare l'adesione delle prime cellule al substrato. I primi segni di crescita sono stati osservati nel corso della seconda settimana, dapprima a partire dai piccoli frammenti tissutali: piccole propaggini sono divenute visibili ai bordi dei frammenti seguiti dalla comparsa di piccoli gruppi cellulari disposti a corona intorno al nucleo tissutale. Con circa una settimana di latenza, le divisioni e la crescita sono state osservate anche a partire dalle cellule isolate. In entrambi i casi le sedi delle mitosi cellulari sono state demarcate sul fondo della piastra in modo da poter seguire giorno per giorno l'espansione della popolazione cellulare. La confluenza è stata raggiunta, per divisioni successive, circa 4 settimane dopo l'approntamento della colture primarie, rendendo quindi necessario il ricorso al passaggio per consentire l'ulteriore espansione della popolazione cellulare. La tecnica del passaggio è stata inizialmente applicata su popolazioni cellulari selezionate, demarcate ed isolate mediante l'uso di cilindri di clonazione: in tal caso pertanto le cellule sono state passate prima del raggiungimento della confluenza.

II. Colture secondarie

Le colture secondarie e le successive sono partite con una distribuzione uniforme delle cellule nelle nuove piastre: la maggior parte delle cellule piastrate ha aderito al nuovo substrato ed ha iniziato la replicazione.

Per tutto il periodo di osservazione si è evidenziato un andamento costante: la confluenza veniva raggiunta in una decina di giorni circa ed ogni piastra a confluenza presentava un numero di cellule pari a circa 2 milioni.

III. Differenziamento cellulare

Le cellule sottoposte al terreno di differenziamento, in tutti gli stadi di crescita in piastra considerati, hanno mostrato un blocco della moltiplicazione, mantenendo costante il loro numero e potendo essere mantenute in questa condizione per tempo prolungato, con tempo massimo accertato un mese.

IV. Curva di crescita e parametri relativi

La replicazione delle cellule è risultata costante dal momento dell'approntamento della primaria: il numero delle generazioni è risultato elevato ed i parametri di crescita sono risultati paragonabili a quelli delle prime fasi di coltura. I risultati riportati nella Figura 1 forniscono un esempio della costruzione di una curva di crescita relativo alle cellule esaminate alla 20° generazione. Si può notare:

- un calo del numero cellulare il giorno successivo al piastramento (non tutte le cellule si attaccano al substrato)
- una fase di crescita logaritmica (tra il I ed il V giorno)
- una fase di plateau (tra il V e l'XI giorno)

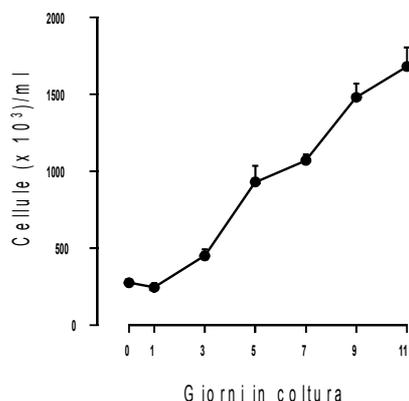


Figura 1. Curva di crescita.

Per quanto concerne il tempo di duplicazione relativo alla curva sopra indicata, si è considerato il raddoppiamento del numero cellulare dal valore di 400.000 a quello di 800.000 ottenendo un valore del tempo di duplicazione in circa 47 ore. Il calcolo del P.D.L. in tale intervallo di tempo è risultato pari a 1,93.

V. Dosaggio delle proteine totali

La Figura 2 riporta i risultati del dosaggio dell'albumina compiuto su diverse popolazioni cellulari, derivate dal selezionamento con cilindri di popolazioni demarcate e dal passaggio delle piastre primarie. Come controllo negativo è stato utilizzato del terreno di differenziamento non condizionato.

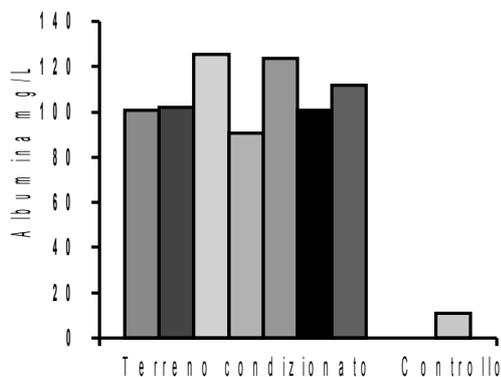


Figura 2. Concentrazione di albumina in campioni di terreno condizionato. Le barre a sinistra mostrano le diverse concentrazioni di albumina misurate, su 7 diverse piastre di Petri, con cellule portate a confluenza. Sulla sinistra la barra relativa al controllo negativo (terreno non condizionato).

VI. Analisi dell'mRNA

Le cellule esaminate provenivano dalla VIII generazione cellulare. La Figura 3 mostra i tracciati elettroforetici con le bande relative ai mRNA delle proteine da noi ricercate.

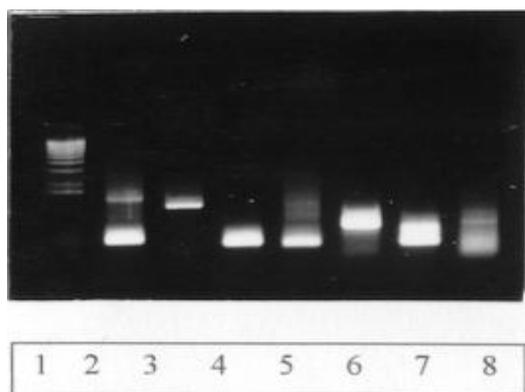


Figura 3. Espressione dell'mRNA.

- Corsia: 1 tracciante dei pesi molecolari
- 2 eritropoietina 363 bp
- 3 fattore IX della coagulazione 406 bp
- 4 transferrina 298 bp
- 5 fibronectina 250 bp
- 6 GAPDH
- 7 albumina 273 bp
- 8 alfa fetoproteina 625 bp

Dall'immagine sopra riportata si desumono le seguenti informazioni: le cellule mantengono la sintesi di albumina, transferrina, eritropoietina e fibronectina.

VII. Ibridizzazione *in situ* dell'albumina

L'ibridizzazione *in situ* dell'albumina eseguita su tessuto epatico umano, sulla linea cellulare Hep-G2 e sul nostro sistema cellulare epatocitario ha mostrato che, pur essendovi un netto decremento dell'intensità del segnale rispetto al tessuto epatico, non si osservano differenze rilevanti tra le popolazioni cellulari esaminate.

VIII. Analisi morfologica

Le cellule appaiono grandi (15-30 μm di diametro), poliedriche, piu' allungate ed irregolari quando disperse,

più piccole e regolari quando a confluenza. Quando isolate esse tendono a ricercare il contatto mediante la creazione di estroflessioni citoplasmatiche. I nuclei sono grandi, sferoidali, centrali, i nucleoli sempre ben evidenti. Il citoplasma si presenta granulare, ed il numero delle granulazioni tende ad aumentare quando le cellule sono poste in terreno di differenziazione.

Le cellule poste in terreno di differenziamento hanno mostrato a partire dal giorno successivo al cambiamento del terreno, una riduzione delle dimensioni, una regolarizzazione dei margini (cellule più piccole, poligonali e strettamente adiacenti tra loro) ed un aumento delle granulazioni interne.

Colorazione con Ematossilina ed Eosina. I citoplasmici delle cellule appaiono eosinofili, talora in modo netto ed uniforme, talora in modo più sfumato e granulare. I nuclei presentano invece la classica colorazione blu/viola; sono talora spostati a destra per effetto del processo di centrifugazione.

Analisi immunocistochimica. La natura epatocitaria della nostra linea cellulare è stata confermata dall'esecuzione dell'immunocistochimica: gli epatociti umani normali si colorano solo con anticorpi rivolti contro citocheratine di basso peso molecolare (CAM 5.2, CK 8) mentre la positività per CEA policlonale mostra una disposizione canalicolare, anch'essa tipica degli epatociti a confluenza. In dettaglio nella Figura 4 sono riportati i dati relativi alla colorazione con anticorpi anti CAM 5.2, CK 8 e CEA policlonale. La positività appare come una colorazione di colore rossastro identificabile nelle fotografie dei preparati.

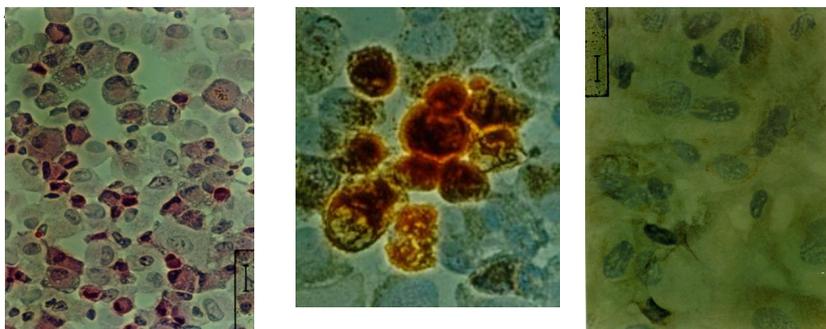


Figura 4. Immunocistochimica delle cellule per CAM 5.2 (A), CK 8 (B) e CEA policlonale (C). Vedi testo per i dettagli.

IX. Microscopia elettronica

La microscopia elettronica eseguita sulla nostra linea cellulare rivela la presenza di organelli intracellulari tipici degli epatociti umani. In alcuni ingrandimenti è possibile osservare la presenza di estroflessioni della membrana tipo microvilli, localizzate in corrispondenza delle superfici di contatto intercellulari (Figura 5).

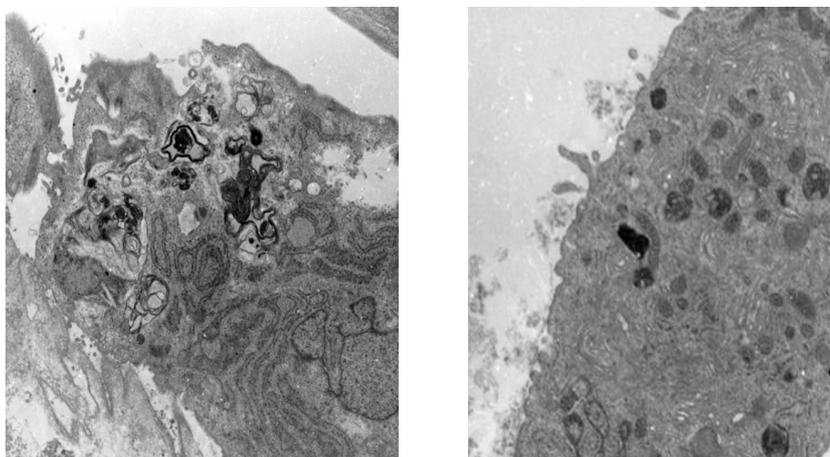


Figura 5. Microscopia elettronica. Le cellule mostrano nuclei con cromatina condensata alla periferia, un ricco RER, l'apparato di Golgi, mitocondri e microvilli.

X. Trasporto della bromosulfaleina (BSF)

La Figura 6 dimostra le modificazioni dei valori di assorbanza indotti dall'ingresso della BSF nelle cellule. Il rapido declino della curva indica infatti come la scomparsa della molecola avvenga rapidamente al contatto delle membrane cellulari. Nella figura si possono infatti riconoscere:

- la curva a: normale progressione dell'uptake della molecola da parte della cellula
- la curva b: effetto esercitato dall'aggiunta di KCl 100 mM alla mix di reazione

Come si può osservare, l'abbattimento del potenziale di membrana accelera l'ingresso del tracciante all'interno della cellula, modificandone il coefficiente di assorbimento, dimostrando in tal modo che il trasportatore in esame è elettrogenico.

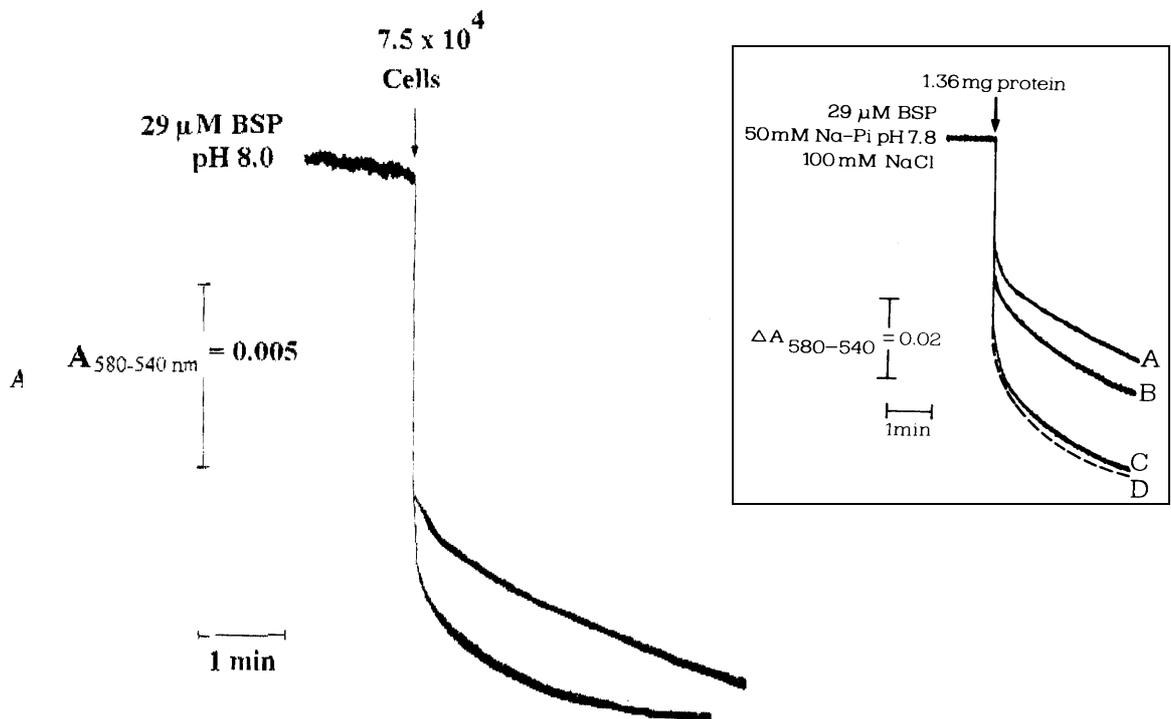


Figura 6. Trasporto della bromosulfaleina

XI. Studio dei cromosomi

La Figura 7 riporta la ricostruzione del cariotipo (cariogramma), con i cromosomi ordinati sulla prima alla 22° coppia, più la coppia di cromosomi XY. Sono visibili 44 cromosomi più la coppia XY: non si osservano delezioni o riarrangiamenti. Il cariotipo è pertanto definibile normale.

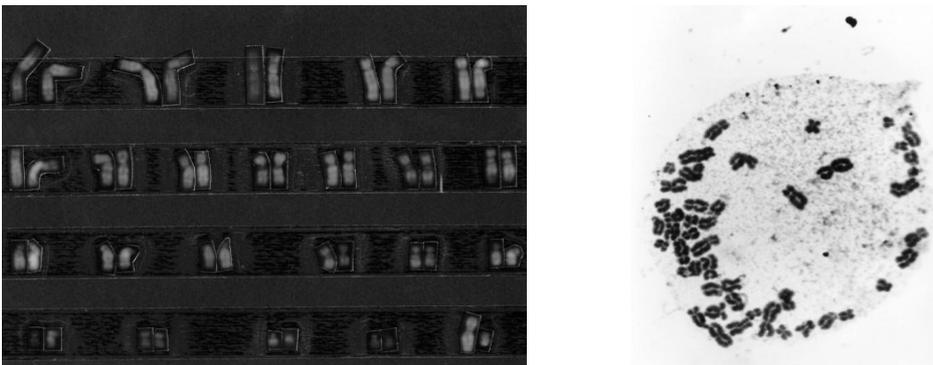


Figura 7. Citogenetica. La maggior parte delle cellule ha un cariotipo normale diploide. Sono anche riscontrabili occasionali cellule diploidi.

DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo descritto lo sviluppo di una nuova linea epatocitaria, ottenuta da tessuto umano normale grazie alle caratteristiche del terreno da noi formulato ed alle condizioni di coltura adottate: essa è stata denominata Human Normal Hepatocytes (HNN). Dalle colture primarie è stato infatti possibile ottenere colture secondarie, mediante passaggio, ed espandere successivamente la nostra popolazione. Le cellule si sono dimostrate in grado di crescere continuamente per oltre due anni, mantenendo la capacità di rallentare la propria replicazione sino alla quiescenza quando piastrate con un terreno di diversa composizione (HCM MOD). In terreno di crescita, hanno un numero di duplicazioni pari ad 1.97 nei primi tre giorni dopo piastramento e raggiungono la confluenza dopo due settimane dalla semina. L'albumina, una delle principali proteine di sintesi epatica, viene secreta e risulta dosabile nel mezzo di coltura con tecnica nefelometrica. L'analisi dell'mRNA eseguito mediante PCR ha dimostrato come risultino presenti i trascritti di una serie di proteine di sintesi epatica quali albumina, eritropoietina, fattore IX della coagulazione, transferrina; non si è invece riscontrata evidenza di espressione di α FP. Questi dati suggeriscono pertanto che le cellule si mantengano differenziate anche dopo lungo tempo in coltura e che risultino fenotipicamente epatociti.

Due dati meritano una più approfondita discussione: la positività della ricerca dell'eritropoietina e la negatività dell' α FP. La prima, come precedentemente ricordato, risulta abitualmente espressa in condizioni cliniche e sperimentali di rigenerazione epatica: essa non è classicamente prodotta dagli epatociti maturi quiescenti, ma non è sorprendente pertanto che sia espressa da cellule in corso di attiva replicazione. L' α FP è invece un'oncoproteina fetale, espressa dagli epatoblasti, dagli epatociti immaturi e da linee cellulari di epatoma. Secondo alcuni autori l'espressione di tale proteina correlerebbe con lo stato di differenziazione cellulare. Nel nostro caso, il riscontro dell'assenza dei trascritti per l' α FP confermerebbe l'assunto di trovarsi di fronte a epatociti maturi, che sotto opportuni stimoli sono risultate in grado di andare incontro a replicazione senza peraltro regredire ad una condizione "fetale" di totipotenza e dedifferenziazione. L'ibridizzazione in situ per l'albumina ha confermato la presenza di mRNA codificanti per l'albumina a livello citoplasmatico delle cellule in attiva replica in quantità pari a quella riscontrata nelle le Hep-G2 ma inferiore a a sezioni di tessuto epatico umano. Questo dato, che è stato eseguito su un pellet di cellule in attiva crescita, merita a nostro avviso una rivalutazione in due diverse condizioni colturali: cellule cresciute in chamber slides e sottoposte a terreno di differenziamento. Morfologicamente tali cellule mantengono caratteristiche proprie degli epatociti: la colorazione con ematossilina ed eosina evidenzia la presenza di nuclei grandi, livementi eccentrici in presenza di un citoplasma fortemente basofilo. La caratterizzazione immunoistochimica, che risulta positiva per CAM-5.2 e citocheratina 8, supporta ulteriormente la loro natura escludendone l'origine da cellule dei dotti biliari. L'analisi eseguita per il CEA su cellule fatte crescere fino a confluenza su vetrini portaoggetto ha identificati una disposizione canalicolare dell'antigene che è una caratteristica peculiare dei soli epatociti. La microscopia elettronica evidenzia un'architettura cellulare caratteristica: nucleo grande, leggermante periferico, apparato di Golgi abbondantemente sviluppato così come il reticolo endoplasmatico, numerosi mitocondri. Strutture microvillari suggestive di formazione canalicolare sono visibili in alcuni preparati. Infine, tali cellule mantengono la capacità di captare la BSF e l'ingresso di tale molecola all'interno della cellule avviene in modo elettrogenico: questo dato suggerisce pertanto che la bromosulfaleina penetri nella cellula tramite lo stesso recettore utilizzato dalla bilirubina. E' pertanto ipotizzabile che, quando approntate in un idoneo sistema, queste colture cellulari siano in grado di eliminare bilirubina umana da un mezzo. Tuttavia, l'elemento a nostro avviso più rilevante di tale coltura è data dalla sua integrità genomica anche dopo lungo tempo in coltura; questo ci consente infatti di ipotizzare che tali cellule sono in grado di esprimere fenotipicamente la totalità delle loro funzioni se portate all'appropriato grado di differenziazione ed interazione. Il sistema colturale da noi sviluppato si discosta da quelli precedentemente utilizzati fondamentalmente per la sua semplicità: non vi è stato infatti il ricorso a cocoltura, a immortalizzazione mediante transfezione con oncogeni, né a complesse interazioni cellula-matrice quali quelle che prevedono l'utilizzo del collagene gel sandwich o del matrigel (Kono). Pertanto l'elemento determinante per la crescita ed il mantenimento delle caratteristiche di differenziazione della nostra linea è da attribuirsi alle caratteristiche del terreno di crescita da noi formulato. La possibilità poi di modulare la replicazione e la differenziazione cellulare mediante l'uso del terreno di differenziazione costituisce un'altro prezioso vantaggio rendendo disponibile un modello in vitro sia di rigenerazione che di studio delle funzioni dell'epatocita maturo. La filosofia che sta alla base del disegno dei terreni è fondamentalmente il ricorso a basse concentrazioni di calcio, magnesio e siero fetale, più le opportune stimolazioni ormonali (estratti di ipotalamo ed ipofisi, 5H). I vantaggi offerti da tale "disegno" sono infatti quella di scoraggiare crescita di tipi cellulari differenti che hanno requisiti metabolici diversi (per esempio fibroblasti che non sopravvivono in presenza di basse concentrazioni di calcio), di impedire altresì alle cellule di formare complesse interazioni cellulari tramite giunzioni calcio-dipendenti, mantenendo pertanto la cellula spostata verso una condizione proliferativa, limitandone però la differenziazione. Per contro, il terreno di differenziazione (ottenuto eliminando il siero, gli estratti ed aumentando le concentrazioni degli elettroliti) è stato studiato per

consentire agli epatociti di instaurare interazioni complesse, con interscambio di segnali e molecole. Ciò permette alle cellule di giungere alla sintesi di fattori di crescita autocrini, con sostentamento reciproco per lungo tempo in un terreno "povero" da un punto di vista nutrizionale.

Il dato sicuramente mancante nello studio sinora svolto è quello relativo all'attività metabolica delle cellule. Come precedentemente ricordato, il principale sistema enzimatico presente a livello epatico è quello delle monoossigenasi: in esso rientra l'attività della famiglia enzimatica dei citocromi P450, l'elemento fondamentale del metabolismo di farmaci e tossici. Nell'uomo sono state caratterizzate fino ad ora almeno quattro famiglie che consentono quindi di classificare i diversi citocromi in P450 I, II, III, IV. All'interno di ogni famiglia vi sono inoltre una o più sottofamiglie, numerate con lettera alfabetica. La metabolizzazione di farmaci quali ciclosporina e tacrolimus avviene ad esempio a livello del citocromo P450 IIA. E' sicuramente importante analizzare estesamente tutte le vie metaboliche presenti a livello epatico: il nostro prossimo obiettivo consiste nel valutare il metabolismo di due sostanze, la ciclosporina ed le benzodiazepine verificando in tal modo il mantenimento dell'elementare efficienza metabolica da parte delle nostre cellule. Accanto a tale aspetto, e sotto certi aspetti connesso ad esso, va posto quello dello studio della tumorigenicità delle cellule: crescita in agar e monitoraggio dopo trapianto nel ratto sono gli studi preliminari che verranno eseguiti in previsione di un eventuale utilizzo per fini clinici di tali cellule. Un altro aspetto di estremo interesse è inoltre quello relativo alla sintesi ed alla secrezione di sali biliari ed al catabolismo della bilirubina: pur non consentendo il sistema colturale in monostrato l'analisi delle caratteristiche della bile, è tuttavia ipotizzabile che opportune condizioni di crescita possano favorire la polarizzazione degli epatociti e la comparsa di attività secretorie specifiche.

I principali indirizzi futuri di ricerca e le relative applicazioni possono essere riassunte come segue: studio della differenziazione cellulare in diverse condizioni di coltura; studio dell'infettabilità in vitro con virus epatotropi umani; utilizzo di tali cellule per il "supporto bioartificiale del fegato"; utilizzo di tali cellule per il trapianto epatocitario.

L'origine e la natura stessa dell'epitelio biliare sono tuttora oggetto di ampio dibattito in campo scientifico. Recentemente si è dimostrato, in colture epatocitarie immortalizzate di ratto (Cell), come la stimolazione degli epatociti con fattori di crescita e l'interazione con diversi componenti della matrice (collagene gel sandwich o Matrigel) determini la differenziazione delle cellule in senso biliare. Studi in vivo hanno inoltre chiaramente dimostrato come cellule embrionali di pancreas di ratto, trapiantate nel fegato di ratti Fisher dipeptidil dipeptidasi IV deficienti, siano in grado di differenziarsi in epatociti, esprimendo proteine specifiche del fegato e divenendo totalmente integrate nel parenchima epatico (Dabeva PNAS 1997). Inoltre, in condizioni sperimentali precise (induzione di un'atrofia delle strutture acinari del pancreas mediante una dieta priva di rame) l'epitelio pancreatico prolifera ed assume caratteristiche morfologiche e funzionali proprie dell'epitelio epatico (Rao Am J of Pathol 1989). L'affascinante ipotesi che tutti tali studi sollevano è quella dell'esistenza di un'unica cellula progenitrice in grado di proliferare e differenziarsi diversamente assumendo i fenotipi consentiti dal comune sito di origine endodermico. E' quindi evidente come la messa a punto di condizioni di coltura differenziate, intese come disegno di terreni e interazione con la matrice, possano fornire contributi a questo settore della ricerca. Il secondo punto fa menzione della possibile applicazione di tali cellule nel settore virologico. Non esistono, al momento attuale, sistemi di coltura in vitro di virus epatotropi umani: benché brillantemente pubblicati (Bchini, J of Virology), i risultati relativi all'infettabilità da parte del virus dell'epatite B (HBV) sia nelle cellule Hep-G2 che nelle colture primarie di epatociti, dopo trattamento con dimetil solfossido (Gripon, J of Virology), non sono risultati ripetibili. Anche per quanto concerne il virus dell'epatite C vi è un unico studio ad oggi pubblicato, nel quale si afferma di aver ottenuto la replicazione a lungo termine di tale virus in epatociti fetali umani (Iacovacci, Hepatology). Le applicazioni di un efficace modello di replicazione virale in vitro sono numerose: gli studi sulla penetrazione dei virus all'interno degli epatociti non hanno ancora consentito di identificare con certezza un recettore specifico, benché si ipotizzi un ruolo dell'Annessina V per l'HBV e del recettore dell'LDL per l'HCV. Altrettanto rilevante è inoltre il possibile utilizzo di tale sistema per la messa a punto di nuove terapie antivirali.

Per quanto concerne più strettamente le possibili applicazioni cliniche, vi sono due possibili campi di utilizzo: il supporto bioartificiale del fegato ed il trapianto epatocitario. Il primo è rappresentato da un bioreattore che nella cui struttura sono inclusi dei cilindri al cui interno si trovano microfibre cave con parete porosa che vengono attualmente riempite con epatociti suini. La funzione di questo complesso sistema è duplice: esso unisce l'attività detossificante alla fase di sintesi e consente pertanto di supportare il paziente con insufficienza epatica fulminante fino al momento della ripresa funzionale dell'organo o del trapianto ortotopico di fegato. Recentemente (Lancet) è stata tuttavia identificata la presenza di retrovirus endogeni presenti negli epatociti suini che sarebbero in grado di infettare anche l'uomo: da qui pertanto l'impossibilità nel proseguire l'utilizzo degli epatociti suini e la ricerca di una diversa e più sicura fonte di epatociti. Stante la difficoltà nel reperimento di organi da destinare a trapianto, non risulta ipotizzabile il ricorso a colture primarie di epatociti da destinare a tale uso. E' invece ipotizzabile il ricorso a linee epatocitarie, anche non continue, che rispondano a due requisiti indispensabili: l'essere di derivazione umana, funzionalmente integre e non risultare tumorigeniche. Gli stessi requisiti devono a maggior ragione essere soddisfatti nel caso di possibili applicazioni di linee o ceppi epatocitari a scopo di trapianto. E' di recente pubblicazione il ricorso al trapianto

epatocitario quale terapia di un difetto congenito del metabolismo della bilirubina (Fox, New England): è verosimile che in futuro il trapianto epatocitario possa divenire una terapia definitiva per patologie congenite del metabolismo o di supporto in attesa del trapianto di fegato. Anche in questo caso, come nel precedente, il problema resta quello del reperimento di una fonte di epatociti "sicuri" da destinare a tale uso senza risurre la già carente disponibilità di organi da destinare al trapianto di fegato.

PROGRAMMI FUTURI

- Intendiamo vedere se la differenza di efficienza di trasfezione, osservata tra cellule di rene di scimmia e cellule di origine epatica umana, sia specie-specifica od organo-specifica, completando il set di esperimenti nella linea HTC di epatoma di topo.
- Ci proponiamo di analizzare in Western Blot frazioni cellulari isolate di nuclei e citoplasma delle cellule HepG2 e Huh7 trasfettate, in modo da verificare l'effettiva localizzazione della proteina, anche se questo tipo di esperimento presenta numerose difficoltà legate all'elevata quantità di materiale cellulare necessario.
- Ci proponiamo poi di ripetere gli esperimenti di immunofluorescenza con tecnica confocale, utilizzando marcatori specifici per il reticolo endoplasmatico e/o la membrana nucleare, in modo tale da evitare confondimenti legati all'utilizzo di un'analisi di tipo bidimensionale per visualizzare strutture tridimensionali.
- Ci proponiamo infine di passare dall'utilizzo di linee cellulari trasformate, quali sono le COS-7 e le HepG2, al sistema epatocitario umano normale messo a punto, per valutare quali siano gli effetti diretti della proteina core su queste cellule. A questo proposito resta però da mettere a punto una elettroporazione efficiente in E. Choli del BAC (Bacterial Artificial Chromosome, contenente il genoma dell'Adenovirus deleto dei geni E1-E3) ricombinato con il plasmide shuttle pDNR.

BIBLIOGRAFIA

1. Bchini R, Capel F, Dauguet C, Dubanchet S, Petit MA. In vitro infection of human hepatoma (Hep-G2) cells with hepatitis B virus. *J Virol*, June 1990: 3025-3032.
2. Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, Guguen-Guillouzo C. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol*, 62 (11): 4136-4143.
3. Iacovacci S, Manzin A, Barca S, Sargiacomo M, Serafino A, Valli B, Macioce G, Hassan HJ, Ponzetto A, Clementi M, Peschle C, Carloni G. Molecular characterization and Dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology* 1997; 26: 1328-1337.
4. Glauert AM. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. New York: North Holland Publishing Co, 1975: 12-16.
5. Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SR, Hurston E, Novikoff PM, Hixson DC, Gupta S, Shafritz DA. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 7356-7361.
6. Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD. Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 5860-5864.
7. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy: biological application. Boca Raton: CRC, 1989: 52-54.
8. Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res*

1969; 26: 31-43.

9. Nakamura J, Okamoto T, Schumacher IK, Tabei I, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Fox I.J. Treatment of surgically induced acute liver failure by transplantation of conditionally immortalized hepatocytes. *Transplantation* 1997; 63; 11: 1541-1547.
10. Sacci JB, Schriefer ME, Resau JH, Wirtz RA, Detolla LJ, Markham RB, Azad AF. Mouse model for exoerythrocytic stages of *Plasmodium Falciparum* malaria parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89; 3701-3705.
11. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of Diseased Mouse Liver by Hepatic Cell Transplantation. *Science* 1994; 263: 1149-1152.
12. Ponder Parker C, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, Ledley FD, Chowdhury JR, Woo SLC. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 1217-1221.
13. Persico M, Sottocasa GL. Measurement of sulfobromophthalein uptake in isolated reat hepatocytes by a direct spectrophotometric method. *Biochim. Biophys. Acta* 1987; 930: 129-134.
14. Guillonzo A, Morel F, Langouet S, Maheo K, Rissel M. Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds. *J Hepatol* 1997; 26(Suppl. 2): 73-80.
15. Kono Y, Yang S, Letarte M, Roberts EA. Establishment of a human hepatocyte line derived from primary culture in a collagene gel sandwich culture system. *Exp. Cell Research* 1995; 221, 478-485.
16. Roberts EA., Letarte M, Squire J, Yang S. Characterization af human hepatocytes lines derived from normal liver tissue. *Hepatology* 1994; 19: 1390-1399.
17. Gripon P, Diot C, Thezè N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, Guguen Guillonzo C. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of Dimethyl Sulfoxide. *J Virol* 1988; 62(11): 4136-4143.
18. Bchini R, Capel F, Dauguet C, Dubanchet S, Petit MA. In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. *J Virol* 1990; 64(6): 3025-3032.
19. Zu Putlitz J, Roberts EA, Wieland S, Kono Y, Blum HE. Hepatitis B virus replication and viral antigen syntesis in hepatocyte lines derived from normal human liver. *Virus Research* 1997; 52: 177-182.
20. Rappaport AM. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr. Path.* 1976; 157: 215-243.
21. Fried W, Barone J, Schade S, Anagnostu A. Effects of carbon tetrachloride on extrarenal erythropoietin production in rats. *J Lab Clin Med.* 1979; 93(5): 700-5.
22. Fried W. The liver as a source production extrarenal erythropoietin production and function. *Blood* 1972; 40: 671-677.
23. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PW, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar Syndrome Type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 14, 1422-1426.
- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
- 7.
- 8.
- 9.
- 10.
- 11.
- 12.
- 13.
- 14.
- 16.
- 17.
- 18.
24. Ruggieri A, Murdolo M, Rapicetta M. Induction of FAS ligand expression in a human hepatoblastoma cell line by HCV core protein. *Virus Res* 2003; 97:103-110.
25. Ruggieri A, Murdolo M, Harada T, Miyamura T, Rapicetta M. Cell cycle perturbation in a human hepatoblastoma cell line constitutively expressing hepatitis C virus core protein. *Arch Virol* 2004; 149:61-74.

26. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells*. 2006; [Epub ahead of print]
27. Tang XP, Zhang M, Yang X, Chen LM, Zeng Y. Differentiation of human umbilical cord blood stem cells into hepatocytes in vivo and in vitro.
28. *World J Gastroenterol*. 2006;12(25):4014-9.

PUBBLICAZIONI ANNO 2006

1. C. Fabris, C. Smirne, P. Toniutto, C. Colletta, R. Rapetti, R. Minisini, E. Falletti, M. Pirisi. Assessment of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and normal alanine aminotransferase values: the role of the AST to platelet ratio index. *Clin Biochem* 2006 Apr;39(4):339-43.
2. M. Pirisi, E. Salvador, Z. Bisoffi, M. Gobbo, C. Smirne, C. Gigli, R. Minisini, G. Fortina, G. Bellomo, E. Bartoli. Unsuspected strongyloidiasis in hospitalized elderly patients with and without eosinophilia. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12(8):787-92.
3. G. Bellone, C. Smirne, A. Carbone, A. Buffolino, T. Scirelli, A. Prati, D. Solerio, M. Pirisi, G. Valente, M. Nano, G. Emanuelli. KIT/stem cell factor expression in premalignant and malignant lesions of the colon mucosa in relationship to disease progression and outcomes. *Int J Oncol* 2006 Oct;29(4):851-9.
4. G. Bellone, A. Carbone, V. Busso, T. Scirelli, A. Buffolino, C. Smirne, A. Novarino, O. Bertetto, L. Tosetti, G. Emanuelli. Antagonistic Interactions Between Gemcitabine and 5-Fluorouracil in the Human Pancreatic Carcinoma Cell Line Capan-2. *Cancer Biol Ther.* 2006 Oct 4;5(10) [Epub ahead of print].
5. G. Bellone, A. Carbone, C. Smirne, T. Scirelli, A. Buffolino, A. Novarino, A. Stacchini, O. Bertetto, G. Palestro, C. Sorio, A. Scarpa, G. Emanuelli, U. Rodeck. Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J Immunol.* 2006 Sep 1;177(5):3448-60.
6. C. Smirne, A. Carbone, M. Pirisi, G. Bellone. Imatinib mesylate: new perspectives in the treatment of solid tumours. *Expert Opin Ther Targets* 2006, in press.
7. C. Colletta, C. Smirne, C. Marini, M. Pirisi. Liver biopsy and non-invasive alternatives in relationship to the duration of antiviral treatment for hepatitis C. *J Clin Gastroenterol.* 2006, in press.
8. P. Toniutto, C. Fabris, D. Bitetto, E. Falletti, C. Avellini, E. Rossi, C. Smirne, R. Minisini, M. Pirisi. Role of AST to platelet ratio index in the detection of liver fibrosis in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006, in press.

ABSTRACTS ANNO 2006

1. P. Toniutto, C. Fabris, D. Bitetto, E. Falletti, C. Avellini, E. Rossi, S. Fumagalli, C. Smirne, R. Minisini, M. Pirisi. Angiotensin converting enzyme I/D genes and liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 39° Riunione generale annuale dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF). Roma, 16- 17 Febbraio 2006. *Dig Liver Dis* 2006; 38 (3): A49.
2. R. Minisini, P. Toniutto, M. Burlone, F. Caldera, C. Fabris, E. Biletta, R. Rapetti, D. Bitetto, L. Aguggia, C. Smirne, M. Pirisi. Occult hepatitis B virus infection and donor age in relationship to fibrosis progression of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Gesellschaft für Virologie Jahrestagung 2005. Monaco, Germania, 15-18 marzo 2006: 258.*
3. F. Caldera, C. Smirne, R. Minisini, C. Fabris, M. Bigliocca, D. Bitetto, E. Biletta, S. Grazioli, P. Toniutto, M. Pirisi, E. Falletti. Outcome of hepatitis B virus infection in relation to the Apolipoprotein H and E gene polymorphisms. *Gesellschaft für Virologie Jahrestagung 2005. Monaco, Germania, 15-18 marzo 2006: 262.*
4. C. Smirne, C. Fabris, P. Toniutto, F. Caldera, R. Mella, D. Bitetto, S. Fumagalli, E. Rossi, R. Minisini, E. Ceriani, F. Corlianò, M. Pirisi. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism and liver fibrosis in chronic hepatitis C. 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL).Vienna, Austria, 26-30 aprile 2006. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl. 2): S205-6.
5. M. Burlone, R. Minisini, C. Fabris, F. Caldera, D. Bitetto, E. Falletti, C. Smirne, S. Grazioli, P. Toniutto, M. Pirisi. Apolipoprotein H and E gene polymorphisms and outcome of hepatitis B virus infection. 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL).Vienna, Austria, 26-30 aprile 2006. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl. 2): S169.
6. R. Rapetti, C. Colletta, C. Vandelli, R. Minisini, L. Aguggia, C. Smirne, M. Vandelli, S. Fangazio, M. Bigliocca, P. Toniutto, C. Fabris, M. Pirisi. Analysis of factors involved in fibrosis progression among hepatitis C virus carriers with normal alanine aminotransferases. 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL).Vienna, Austria, 26-30 aprile 2006. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl. 2): S175.
7. S. Grazioli, R. Minisini, P. Toniutto, C. Fabris, R. Rapetti, L. Franchini, E. Falletti, C. Smirne, P. Mario. Differential effects of cyclosporine and tacrolimus on tissue growth factor beta-1 mRNA expression by

the human hepatic cell lines HuH7 and LX-2. 61° Annual Meeting AASLD. Boston, USA, 27-31 ottobre 2006, accepted.

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI ANNO 2006

1. Corso SIGE-AISF "Ipertensione portale". Chianciano Terme (SI), 18-21 gennaio 2006.
2. 8° Corso pre-meeting AISF "Update on primary and secondary liver cancer". Roma, 15 febbraio 2006.
3. Corso "Aggiornamenti in Epatologia". Belgirate (VB), 11 marzo 2006.
4. Corso "Aggiornamenti in Epatologia. Le epatiti virali e le epatiti autoimmuni". Camogli (GE), 24-25 marzo 2006.
5. Corso "Gestione multidisciplinare dell'infezione da HCV nel paziente tossicodipendente HIV negativo". Torino, 18-19 maggio 2006.
6. Corso interattivo di ecografia internistica "Ultrasuoni nel Castello di Gargonza". Monte San Savino (AR), 2-7 giugno 2006.
7. Convegno "Aggiornamenti in tema di epatocarcinoma. La diagnosi". Novara, 9 giugno 2006.
8. EASL Monothematic Conference. Genetics in liver diseases. Modena, 23-24 giugno 2006.
9. Convegno "Aggiornamenti in tema di epatocarcinoma. La terapia". Novara, 15 settembre 2006.
10. 39° Riunione generale annuale dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF). Roma, 16-17 febbraio 2006.
Oratore nella sessione "Angiotensin converting enzyme I/D genes and liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C".

SEMINARI DOTTORATO SEGUITI ANNO 2005/2006

1. Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits. 18 novembre 2005.
2. mechanisms of transcriptional regulation and disease. 25 novembre 2005.
3. HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications. 23 novembre 2005.
4. Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation. 19 gennaio 2006.
5. Anticorpi Ricombinanti: un potente Tool Biotechologico. 15 febbraio 2006.
6. Tecniche di biologia e genetica molecolare nella diagnostica del carcinoma del colon. 20 febbraio 2006.
7. The natural course of preclinical type 1 diabetes. 20 marzo 2006.
8. Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia. 13 marzo 2006.
9. La prevenzione della trasmissione verticale di HIV in Africa sub sahariana. L'esperienza del programma dream (Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition). 23 marzo 2006.
10. Aspetti immunogenetici e terapeutici della "hairy cell leukemia". 6 aprile 2006.
11. L'epatite autoimmune. 18 maggio 2006.
12. Sperm Mediated Gene Transfer. Storia e Applicazioni. 30 maggio 2006.
13. Mesulin: a stretch sensing molecule controllino adaptative cardiac remodeling to pressure overload. 15 giugno 2006.
14. Ruolo eziologico dei papillomavirus umani (HPV) nello sviluppo di lesioni neoplastiche nel distretto genitale. 19 giugno 2006.
15. DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design. 5 luglio 2006.
16. The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis. 11 settembre 2006.
17. La rete di regolazione delle attività anti-angiogenetiche degli interferoni. 29 settembre 2006.