

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**

**“AMEDEO AVOGADRO”**



**DOTTORATO DI RICERCA**

**IN**

**MEDICINA MOLECOLARE**

**XXII° CICLO**

**CARATTERIZZAZIONE DEGLI EPITOPHI CONFORMAZIONALI  
RICONOSCIUTI DA AUTO-ANTICORPI DIRETTI VERSO IL  
CITOCROMO P450 2E1 NELL'EPATITE CRONICA C (CHC)**

**CANDIDATO**

**SALVATORE SUTTI**

**TUTOR**

**PROF. EMANUELE ALBANO**

**ANNO ACCADEMICO 2006/2007**

## **INDICE**

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>SCOPO DEL PROGETTO DI DOTTORATO</b>	<b>5</b>
<b>ATTIVITÀ SVOLTA NEL PRIMO ANNO E RISULTATI</b>	
<i>Studio del ruolo dell'autoreattività anti-CYP2E1 nella patogenesi e nella progressione del danno epatico</i>	<b>6</b>
<i>Analisi della struttura molecolare di CYP2E1 e mappatura dei principali epitopi conformazionali riconosciuti dagli auto-anticorpi anti-CYP2E1</i>	<b>9</b>
<b>CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>14</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>19</b>
<b>ATTIVITÀ FORMATIVA</b>	<b>22</b>
<b>CONGRESSI</b>	<b>25</b>
<b>PUBBLICAZIONI</b>	<b>26</b>

## **INTRODUZIONE**

Il virus dell'epatite C (HCV), identificato con tecniche di biologia molecolare dal gruppo di Michael Houghton nel 1989 (1), rappresenta attualmente la principale causa di epatopatia cronica nel mondo (2). L'incidenza annua di infezioni sintomatiche è stimata intorno ad 1-3 casi/100000 abitanti (3). Occorre tuttavia considerare che l'epatite acuta C decorre comunemente in maniera clinicamente silente. Si stima che l'infezione da HCV interessi approssimativamente il 3% della popolazione mondiale (4), mentre in Europa la prevalenza si attesta intorno all'1%. L'infezione da HCV non presenta un decorso clinico o una storia naturale caratteristici, ma piuttosto un ampio spettro di lesioni epatiche, quadri clinici e prognosi estremamente eterogenei. Dei soggetti infettati solo una minima parte guarisce spontaneamente (15-25%), mentre in circa il 75-85% dei casi si assiste alla persistenza della viremia ed al successivo sviluppo di epatite cronica, anch'essa spesso clinicamente silente (5-7). Caratteristica dell'infezione da HCV è infatti la tendenza alla cronicizzazione, legata principalmente alla capacità del virus di sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite (8-9). La più importante complicanza dell'epatite cronica C è lo sviluppo di cirrosi, che può insorgere rapidamente, dopo 1-2 anni dall'infezione, o lentamente, entro le prime due decadi. Inoltre, l'infezione cronica da virus dell'epatite C è spesso associata a numerose manifestazioni extraepatiche di auto-immunità, quali scialoadenite linfocitica, lichen piano, poliarterite nodosa, glomerulonefrite, tiroidite e crioglobulinemia mista (10). L'esistenza di un'alterata omeostasi del sistema immune in pazienti con epatite C è ulteriormente suggerita dall'elevata prevalenza di anticorpi non-organo specifici. In particolare, anticorpi anti-muscolo liscio e anti-nucleo sono presenti rispettivamente nel 14-66% e nel 6-41%. Al contrario, anticorpi anti-cellule parietali gastriche, anti-mitocondrio e anti-citoplasma dei neutrofili si riscontrano meno frequentemente (11). La rilevanza clinica di questi anticorpi, come pure i meccanismi responsabili della perdita della tolleranza al self, sono scarsamente caratterizzati. Numerosi autori hanno suggerito che il rilascio di antigeni intracellulari, in seguito al danno epatico indotto dal virus, possa indurre una risposta auto-immune con produzione di auto-anticorpi; tuttavia, le specificità antigeniche delle reazioni auto-immuni associate all'epatite cronica C non sono ancora del tutto definite.

Gli auto-anticorpi associati all'infezione da HCV che attualmente sono meglio caratterizzati sono gli anticorpi anti-microsomi epatici e renali di tipo I (anti-LKM-I) diretti verso il citocromo P450 2D6, rilevabili fino al 10% dei pazienti con CHC (10-12). La possibilità che gli auto-anticorpi anti-LKM-I possano contribuire al danno epatico indotto da HCV è suggerita da numerose evidenze sperimentali. In particolare, Muratori e colleghi hanno dimostrato che gli anti-LKM-I presenti in pazienti con infezione da HCV riconoscono il CYP2D6 espresso sul versante esterno della membrana plasmatica epatocitaria (13). Inoltre studi strutturali hanno indicato che i principali

epitopi del CYP2D6, riconosciuti dagli anti-LKM-I, sono esposti sulla superficie del citocromo (14) e che si tratta sia di epitopi lineari sia conformazionali che condividono un'omologia strutturale con proteine dell'HCV (15-16). Oltre al CYP2D6, altri membri della superfamiglia del citocromo P450 (CYPs) sono riconosciuti da auto-anticorpi associati alla CHC; in particolare, Dalekos et al. (17) hanno osservato la presenza di auto-anticorpi anti-CYP2A6 rispettivamente nel 8% dei pazienti LKM-I positivi e in circa il 2% degli LKM-I negativi; in aggiunta è stata evidenziata auto-reattività diretta verso il CYP2E1 ed il CYP3A4 (18).

Il consumo cronico di alcol è un fattore che favorisce la progressione dell'CHC ed incrementa, indipendentemente dalla durata dell'infezione (19), da due a tre volte il rischio di cirrosi; tuttavia, nei pazienti infetti da HCV anche un consumo moderato di alcol promuove stress ossidativo e la progressione verso la fibrosi (20-21). Circa il 40% dei pazienti con epatopatia alcolica presenta elevati titoli di auto-anticorpi anti-CYP2E1 (22), che correlano con la gravità del danno epatico, suggerendo un possibile ruolo del danno auto-immune nei pazienti con abuso alcolico. La capacità dell'HCV e dell'alcol di indurre reazioni auto-immunitarie dirette verso varie isoforme di CYPs ha indotto ad investigare la presenza ed il possibile contributo dell'auto-reattività verso il CYP2E1 nei pazienti infetti da HCV.

A questo proposito, studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che i pazienti con epatite cronica C (CHC) presentano sia titoli di auto-anticorpi anti-CYP2E1 ( $p < 0,0001$ ), che frequenze di positività significativamente superiori rispetto ai controlli sani (40% vs 3%, diff% 37%, 95% IC 25-47%) (23). La specificità antigenica di tali anticorpi è stata confermata dalla loro capacità di immunoprecipitare il CYP2E1 umano purificato. A differenza dei pazienti epatopatici alcolisti, studiati precedentemente, in cui gli auto-anticorpi anti-CYP2E1 riconoscono esclusivamente epitopi conformazionali (24), una consistente frazione di pazienti con epatite cronica C riconosce CYP2E1 non solo in saggi ELISA o in immunoprecipitazione, ma anche in condizioni denaturanti e riducenti (western blotting), suggerendo la presenza di anticorpi diretti anche verso epitopi lineari, costituiti da brevi sequenze aminoacidiche.

Inoltre, abbiamo osservato che gli auto-anticorpi anti-CYP2E1 presenti nel siero di pazienti con epatite cronica C sono capaci di riconoscere il citocromo presente sulla superficie cellulare di epatociti non-permeabilizzati, suggerendo la possibilità che questi auto-anticorpi anti-CYP2E1 possano innescare una citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC), con conseguente danno cellulare.

***SCOPO DEL PROGETTO DI DOTTORATO***

- Costituzione di un'ampia sieroteca di pazienti con HCV, in collaborazione con Centri Ospedalieri presenti sul territorio nazionale, e screening dei pazienti con metodiche immunologiche.
- Caratterizzazione della specificità antigenica degli auto-anticorpi anti-CYP2E1, valutazione della loro rilevanza clinica e loro associazione con altri auto-anticorpi organo- o non-organo specifici evidenziabili in pazienti con epatite cronica C.
- Studio del ruolo dell'auto-reattività anti-CYP2E1 nella patogenesi e nella progressione del danno epatico.
- Determinazione del possibile impiego degli auto-anticorpi anti-CYP2E1 come marker predittivo nell'evoluzione della lesione epatica e del potenziale utilizzo come strumento diagnostico.
- Analisi della struttura molecolare di CYP2E1 e mappatura dei principali epitopi conformazionali riconosciuti dagli auto-anticorpi anti-CYP2E1.
- Individuazione degli epitopi lineari di CYP2E1 maggiormente riconosciuti dagli auto-anticorpi anti-CYP2E1.
- Valutazione dell'immunità cellulare anti-CYP2E1 e suo contributo nella patogenesi della patologia.

## ***ATTIVITÀ SVOLTA NEL PRIMO ANNO E RISULTATI***

### **Studio del ruolo dell'autoreattività anti-CYP2E1 nella patogenesi e nella progressione del danno epatico**

La sieropositività per LKM-I (auto-anticorpi anti-CYP2D6) riveste una certa rilevanza clinica in quanto i pazienti con infezione cronica da HCV, con alti titoli di auto-anticorpi anti-LKM-I, tendono a presentare sia un danno epatico più severo, sia più gravi effetti collaterali in risposta al trattamento con interferone (25-26). Sebbene alcune evidenze sperimentali suggeriscano la possibilità che gli auto-anticorpi anti-LKM-I possano contribuire al danno epatico indotto da HCV (26), il loro specifico contributo patogenetico ed i meccanismi molecolari responsabili della perdita della tolleranza al self sono ancora scarsamente caratterizzati. Inoltre, la bassa prevalenza di questi auto-anticorpi (0-10%) nella popolazione HCV ne limita il loro utilizzo come marker prognostici per il rischio di progressione del danno epatico in corso di epatite cronica C.

Al contrario le IgG dirette verso CYP2E1, associate all'epatite cronica C, sono presenti nel 40% dei pazienti da noi esaminati (23), suggerendo che l'autoreattività anti-CYP2E1 possa contribuire in larga misura alla patogenesi del danno epatico e per tale ragione abbia una notevole rilevanza clinica.

In effetti, i nostri studi hanno mostrato che, sebbene il grado di steatosi, necro-infiammazione (grading) e di fibrosi (staging) non differissero significativamente tra pazienti con e senza autoreattività anti-CYP2E1, i pazienti con epatite di interfaccia periportale o perisettale di grado moderato o severo (Ishak's score >1) avevano titoli significativamente più elevati ( $p=0,025$ ) di IgG anti-CYP2E1 rispetto ai pazienti con epatite di interfaccia periportale o perisettale di grado lieve (Ishak's score  $\leq 1$ ). Una marginale differenza nell'autoreattività anti-CYP2E1 ( $p=0,07$ ) era inoltre evidente in relazione all'estensione della necrosi e dell'infiammazione focale. Inoltre, sebbene i pazienti con autoreattività anti-CYP2E1 presentassero elevati livelli sierici di immunoglobuline totali, l'analisi multivariata ha confermato che i titoli anti-CYP2E1 erano indipendentemente associati con la severità dell'epatite di interfaccia periportale/perisettale.

Contemporaneamente al processo di mappatura degli epitopi conformazionali riconosciuti dagli anti-CYP2E1, l'obiettivo principale dell'attività di dottorato di questo primo anno è stato duplice:

- l'ampliamento e lo screening in ELISA di un maggior numero di pazienti HCV già ben caratterizzati dal punto di vista biochimico, clinico e istopatologico;
- valutazione della specificità anticorpale (epitopi conformazionali vs lineari) in relazione al danno epatico.

A tal fine, abbiamo valutato l'autoreattività anti-CYP2E1 in condizioni riducenti e denaturanti (western blotting) di 35 sieri HCV che presentavano elevati titoli di auto-anticorpi anti-CYP2E1 in ELISA. In particolare, l'intensità di ogni banda di reattività anti-CYP2E1 in Western Blotting è stata valutata tramite videodensitometria ed un punteggio semiquantitativo (score 0-3) è stato attribuito ad ogni siero sulla base della propria reattività rispetto al siero policlonale anti-CYP2E1 di controllo.

Sorprendentemente, i nostri dati hanno mostrato che i pazienti con scarsa reattività anti-CYP2E1 in Western blotting, cioè con IgG verso epitopi conformazionali, presentavano un punteggio di grading (infiammazione) e di staging (fibrosi e/o cirrosi) significativamente ( $p < 0,05$ ) superiori ai pazienti con reattività anti-CYP2E1 elevata in Western blotting, cioè con IgG verso epitopi lineari (Figura 1). Ciò suggerisce che una parte della autoreattività anti-CYP2E1, cioè quella diretta verso gli epitopi lineari, sembra avere uno scarso significato clinico, potendo quindi costituire un fattore di confondimento per il possibile impiego a scopo diagnostico di test capaci di evidenziare auto-anticorpi anti-CYP2E1 in relazione alla progressione della patologia.

Ulteriori studi in un maggior numero di pazienti sono necessari per confermare e ulteriormente caratterizzare il contributo della reattività verso questi epitopi conformazionali nella patogenesi dell'infezione cronica da HCV.

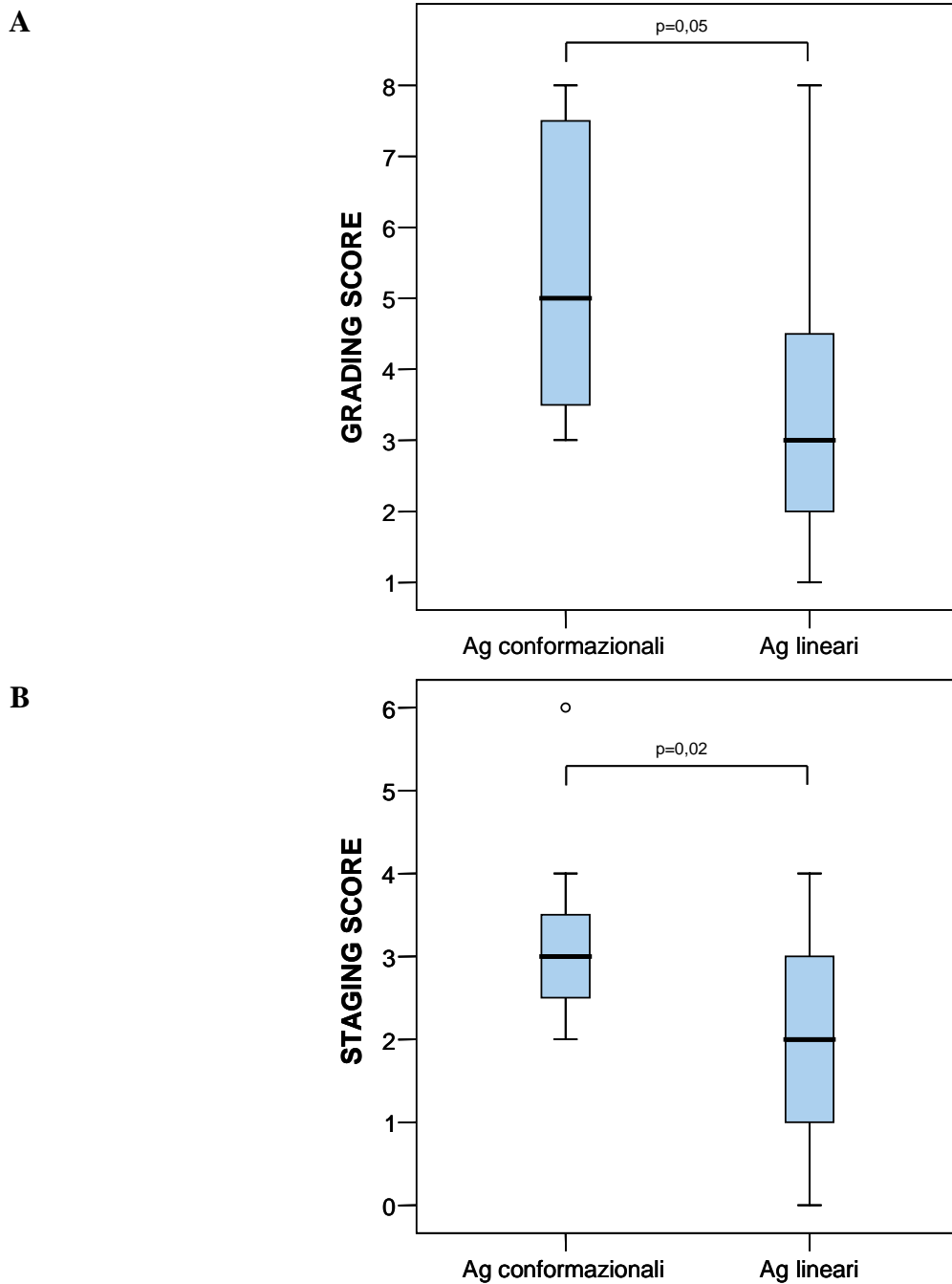


Figura 1: Diagrammi a scatola dello score di necroinfiammazione (A) e fibrosi (B) nei pazienti con infezione cronica da HCV con alti titoli di auto-anticorpi anti-CYP2E1 in ELISA, suddivisi sulla base della reattività anti-CYP2E1 valutata in condizioni denaturanti e riducenti. Una scarsa o, viceversa, un'elevata reattività verso CYP2E1 in Western blotting corrispondono ad anticorpi verso epitopi rispettivamente conformazionali o lineari. Le scatole comprendono i valori tra il 25° e il 75° percentile, le linee in neretto rappresentano le mediane, le linee al di fuori delle scatole si estendono dal 10° al 90° percentile (80% dei valori), mentre le osservazioni estreme sono rappresentate da cerchi. I valori sopra le scatole indicano la percentuale dei soggetti con auto-anticorpi i cui titoli superano la soglia di positività, calcolata come 95° percentile della popolazione dei controlli.



### **Analisi della struttura molecolare di CYP2E1 e mappatura dei principali epitopi conformazionali riconosciuti dagli auto-anticorpi anti-CYP2E1**

Stante l'associazione fra epitopi conformazionali e danno epatico severo (necroinfiammazione e fibrosi), la caratterizzazione degli antigeni bersaglio si rende necessaria in quanto potrebbe fornire ulteriori indizi circa il contributo patogenetico degli auto-anticorpi anti-CYP2E1 nei pazienti con epatite cronica C.

Per l'individuazione degli epitopi conformazionali riconosciuti dagli auto-anticorpi anti-CYP2E1, abbiamo utilizzato un nuovo approccio sviluppato recentemente nel nostro laboratorio. La metodica consiste nella singola sostituzione aminoacidica (di un aminoacido carico con alanina, poiché dotata di scarso ingombro sterico) mediante mutagenesi sito-diretta, espressione in batteri della forma mutata, purificazione e valutazione della conservazione della struttura tridimensionale tramite lettura dello spettro del citocromo dopo riduzione con CO (vedi sezione *Metodi*). Il coinvolgimento del residuo aminoacidico nella reattività anti-CYP2E1 viene valutata comparando la capacità dei sieri di immunoprecipitare la forma wild-type del citocromo rispetto a quella mutata, recante quella particolare sostituzione aminoacidica.

Preliminarmente, per gli esperimenti di immunoprecipitazione sono stati utilizzati il CYP2E1 wild-type ricombinante umano espresso in laboratorio (come descritto nella sezione *Metodi*) oppure forme mutate di CYP2E1 già disponibili presso il Laboratorio di Patologia Generale (vedi Tabella 1), impiegate precedentemente per valutare la reattività anti-CYP2E1 nei pazienti con Patologia Epatica Alcolica.

<b>N</b>	<b>mutazione</b>
1	Glu272 → Ala272
2	Glu320 → Ala320
3	Arg331 → Ala331
4	Lys342 → Ala342
5	Arg344 → Ala344
6	Lys420 → Ala420

*Tabella 1: Elenco isoforme mutate di CYP2E1 espresse in E. Coli utilizzate per gli esperimenti di immunoprecipitazione.*

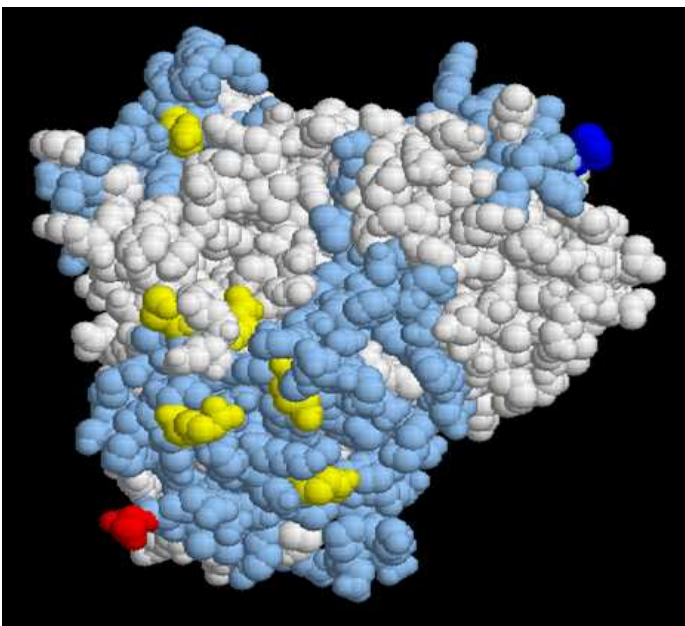
A tale scopo, sono stati quindi selezionati 8 sieri di pazienti CHC con anticorpi diretti verso epitopi conformazionali, selezionati in quanto presentavano reattività verso il CYP2E1 correttamente avvolto (ELISA ed Immunoprecipitazione) ma non verso CYP2E1 denaturato e ridotto (Western Blotting). I nostri dati hanno mostrato che le mutazioni con alanina di Lys342, Arg344 e Lys420, e

in misura minore di Glu320 e Arg331, interferivano in varia misura con il riconoscimento di CYP2E1 da parte degli auto-anticorpi (Tabella 2).

	wt	Lys-342	Lys-420	Glu-320	Glu-272	Arg-331	Arg-344
<b>CHC8</b>	100	23	45	86	81	100	20
<b>CHC7</b>	100	27	58	48	58	100	100
<b>CHC5</b>	100	65	25	82	61	7	100
<b>CHC4</b>	100	86	79	100	84	61	31
<b>CHC6</b>	100	77	77	98	52	57	58
<b>CHC2</b>	100	61	87	53	92	67	100
<b>CHC3</b>	100	57	78	55	97	100	77
<b>CHC1</b>	100	100	69	84	75	95	65

*Tabella 2: Effetto di singole sostituzioni aminoacidiche sul riconoscimento di CYP2E1 ricombinante umano da parte di sieri di 8 pazienti con CHC. Le intensità delle bande sono state misurate tramite videodensitometria e i risultati sono stati espressi come percentuale di reattività residua delle forme mutate rispetto al CYP2E1 wild-type. I quadrati grigi indicano una riduzione compresa tra il 40-50%, mentre quelli neri una riduzione >50%.*

Sebbene le mutazioni introdotte interessassero aminoacidi localizzati in regioni tra loro distanti nella struttura secondaria, la simulazione al computer ha rivelato che questi aminoacidi, dopo l'avvolgimento della molecola, vengono a trovarsi in stretta prossimità, identificando un'area di circa 2,5-3,0 nm sulla superficie di CYP2E1 compatibile con la presenza di un epitopo conformazionale, localizzato tra le eliche J' e K'', nella porzione C-terminale di CYP2E1 (Figura 2).



*Figura 2: Modello molecolare di CYP2E1 (modalità spacefill) raffigurante le regioni studiate in immunoprecipitazione. In blu e rosso sono colorate rispettivamente l'estremità N- e C-terminale, in giallo i residui aminoacidici mutati (Glu272, Glu320, Arg331, Lys342, Arg344, Lys420). L'aminoacido isolato colorato in giallo corrisponde a Glu272.*

È interessante notare che questo epitopo mappa nella stessa area di uno dei due epitopi maggiori caratterizzati nei pazienti con epatopatia alcolica ed epatite da alcol (24). Tuttavia l'epitopo da noi identificato sembra coinvolgere una zona più vasta rispetto a quello coinvolto nella malattia epatica alcolica; questo dato, unitamente all'osservazione che pazienti HCV, a differenza dei pazienti alcolisti, presentano auto-anticorpi anti-CYP2E1 non associati al consumo alcolico e diretti anche verso epitopi lineari, suggerisce l'ipotesi di un diverso meccanismo di perdita della tolleranza al self.

Tuttavia, i dati evidenziano che la mutagenesi degli aminoacidi (Glu272, Glu320, Arg331, Lys342, Arg344, Lys420) che costituiscono l'epitopo da noi identificato, non influenza o altera solo minimamente la reattività di alcuni sieri. Questo suggerisce che altre regioni della molecola possano essere coinvolte nel mediare il riconoscimento da parte delle IgG anti-CYP2E1.

Uno degli aspetti cruciali per l'individuazione di ulteriori epitopi candidati consiste nel selezionare preliminarmente, tra i vari bersagli potenziali della molecola, quei residui aminoacidici le cui caratteristiche (chimico-fisiche, localizzazione, e accessibilità) siano maggiormente compatibili con il legame anticorpale anti-CYP2E1.

La selezione degli aminoacidi candidati è un processo multistep che integra differenti approcci, quali una revisione sistematica della letteratura, l'analisi bioinformatica e i dati sperimentali ottenuti in esperimenti di immunofluorescenza, ELISA e immunoprecipitazione.

Nella Tabella 3 è riportata la lista completa degli aminoacidi carichi di CYP2E1 rimasti al termine del processo di selezione, con l'indicazione e la stima semiquantitativa della loro accessibilità alla superficie della molecola, valutata tramite analisi al computer. La localizzazione di questi potenziali bersagli è indicata in Figura 3.

E205	K275 (++)	K342 (++)	K422 (++)
H232 (+)	E276 (++)	D343	D425 (++)
R233 (++)	K277 (++)	R344 (++)	K428
K234 (++)	H278	E346 (++)	K434 (++)
K237 (++)	E281 (++)	D351	R435
E241	R282 (++)	H355	E440 (++)
K243 (+)	D287 (+)	H370	R444 (++)
E244 (++)	E302	E371 (+)	E446
E248 (++)	R309	R374 (++)	H457 (+)
R249	K317 (+)	D375 (++)	K461 (++)
K251 (++)	E320 (++)	R379 (++)	D465 (++)
E252 (++)	E322	D394	K467 (++)
H253 (+)	E323 (++)	D399 (+)	D468 (++)
H254 (++)	K324 (++)	E402 (++)	D470 (++)
D258 (++)	H326 (+)	E407 (++)	R484 (++)
R263 (++)	E327 (++)	K408 (++)	K486 (++)
D264	E328	K410 (++)	R492 (++)
D267	D330 (++)	E412 (++)	
E272 (++)	R331 (++)	E417 (++)	
E274 (++)	R337 (++)	K420 (++)	

Tabella 3: Elenco degli aminoacidi potenzialmente coinvolti nel legame anti-CYP2E1. Tra parentesi è indicata una stima dell'accessibilità del residuo, valutata analizzando il modello di CYP2E1.

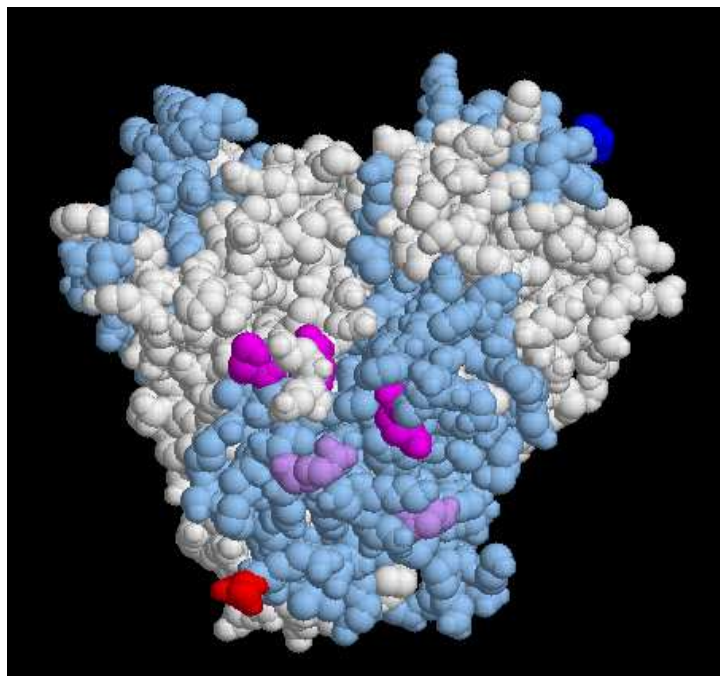


Figura 3: Modello molecolare tridimensionale di CYP2E1. In blu e rosso sono colorate rispettivamente l'estremità N- e C-terminale; in grigio e in azzurro sono indicate rispettivamente le regioni escluse dall'analisi e quelle che invece hanno soddisfatto i criteri di selezione; in fucsia sono colorati gli aminoacidi Lys342, Lys420, Arg344 mentre in lilla i residui Arg331 e Glu320.

In conclusione, questo studio preliminare ha permesso di identificare una serie di amminoacidi che potenzialmente potrebbero essere coinvolti nell'interazione antigene-anticorpo e che saranno valutati nel corso di questo progetto di Dottorato.

## ***CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE***

### **Alla luce dei risultati ottenuti emerge chiaramente che:**

- lo sviluppo di autoreattività anti-CYP2E1, in particolare verso epitopi conformazionali, è associato ad un maggior danno epatico nei pazienti con epatite cronica C;
- uno dei bersagli principali riconosciuto dagli anticorpi anti-CYP2E1 è localizzato tra le eliche J' e K'', nella porzione C-terminale del citocromo.

### **In futuro:**

- Dall'analisi del modello molecolare appare chiaro che altri epitopi potrebbero essere interessati nel legame con gli auto-anticorpi anti-CYP2E1. Ci proponiamo quindi di investigare il contributo di ulteriori residui aminoacidici emersi nel processo di selezione descritto precedentemente.
- Inoltre, al fine di confermare e studiare in maggior dettaglio il contributo degli anti-CYP2E1 nel danno epatico, intendiamo estendere a breve termine le nostre analisi ad un più ampio numero di pazienti già ben caratterizzati da un punto di vista clinico, biochimico e istopatologico.

## **MATERIALI E METODI**

### ***ALLINEAMENTO DELLE SEQUENZE AMINOACIDICHE DI DIFFERENTI ISOFORME DEL CITOCROMO P450 E GENERAZIONE DI UN MODELLO MOLECOLARE DI CYP2E1.***

Le sequenze aminoacidiche, in formato FASTA, di differenti isoforme di citocromo P450, quali CYP1A2 umano (P05177), CYP2B6 umano (P20813), CYP2C5 di coniglio (P00179), CYP2C9 umano (P11712), CYP2D6 umano (P10635), CYP2E1 di ratto (P05182) e CYP2E1 umano (P05181), contenute nel database Swiss-Prot/TrEMBL accessibile al sito web ExPasy (<http://www.expasy.org>), sono state allineate utilizzando il programma di allineamento multiplo di sequenze proteiche ClustalW, disponibile al sito web dell'Istituto Europeo di Bioinformatica EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). La rappresentazione grafica degli allineamenti è stata ottenuta utilizzando il software BOXSHADE versione 3.21, disponibile al sito web EMBnet ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

Per generare un modello molecolare di CYP2E1 è stato utilizzato il server automatico di modellazione per omologia di struttura SWISS-MODEL, accessibile dal server web ExPasy (<http://www.expasy.org/swissmod/>), fornendo il codice SWISS-PROT di CYP2E1 umano (P05181) e indicando come template la struttura di CYP2C5 di coniglio (codice ExpDB 1DT6A), che condivide una discreta omologia di sequenza aminoacidica (54,1%) con il CYP2E1. La minimizzazione dell'energia del modello è stata ottenuta usando l'algoritmo GROMOS96; la radice dell'errore quadratico medio (Root Mean Square Error, RMSE) e le distanze interatomiche sono state calcolate usando il software DeepView-SwissPdbViewer (versione 3.7). La simulazione di CYP2E1 era paragonabile con altri modelli di CYP2E1 descritti in letteratura (RMSE compreso tra 0,170 e 0,185 nm) basati su CYP2C5 di coniglio o citocromi batterici (<http://joneslab.wsu.edu/>). La visualizzazione grafica è stata ottenuta utilizzando il software RasTop (versione 2.6.4) di Philippe Valadon (La Jolla, CA).

### ***SELEZIONE DEI RESIDUI AMINOACIDICI CANDIDATI PER GLI ESPERIMENTI DI MUTAGENESI***

I possibili epitopi riconosciuti dagli auto-anticorpi anti-CYP2E1 sono stati identificati combinando una revisione sistematica della letteratura con tecniche bioinformatiche e sperimentali. Poiché gli auto-anticorpi anti-CYP2E1 sono in grado di riconoscere il citocromo esposto sulla membrana epatocitaria, utilizzando il modello molecolare di CYP2E1, sono state inizialmente escluse le porzioni di sequenza codificanti per aminoacidi non esposti sulla superficie della molecola e quindi non accessibili. L'utilizzo dell'algoritmo di antigenicità di Jameson-Wolf (27), calcolato con il

software bioinformatico GCG (Wisconsin Sequence Analysis Package, Accelrys Inc, San Diego, CA), ha permesso di selezionare le regioni con caratteristiche chimico-fisiche (idrofilicità, probabilità del residuo di trovarsi sulla superficie esterna della molecola, flessibilità e localizzazione del residuo in una particolare struttura secondaria) più compatibili con la possibile natura di epitopo. Dato l'elevato numero di epitopi che questa procedura è in grado di individuare, si è reso necessario adottare ulteriori criteri di selezione.

I citocromi P450 costituiscono una superfamiglia di eme-proteine implicate nel metabolismo di numerose molecole endogene ed esogene. Esse sono classificate in base alla percentuale di omologia della sequenza aminoacidica in famiglie (>40%) e in sottofamiglie (>55%).

Sono state quindi allineate le sequenze aminoacidiche di numerose isoforme di citocromi P450 umani appartenenti a famiglie diverse, o nell'ambito della stessa famiglia CYP2 alle sottofamiglie CYP2B, CYP2C, CYP2D e inoltre sono state anche allineate due proteine di specie differenti (CYP2C5 di coniglio e CYP2E1 di ratto). L'utilizzo di sequenze appartenenti ad altre famiglie e specie si è reso necessario per ottimizzare il loro allineamento, dal momento che i citocromi presentano un'ampia variabilità a livello della porzione N-terminale, contrariamente a quella C-terminale che risulta invece altamente conservata. Si è quindi proceduto a ridurre il numero dei possibili aminoacidi bersaglio escludendo regioni che presentavano specifiche caratteristiche: sono state eliminate anche le porzioni altamente conservate, e quindi certamente non specifiche per il CYP2E1. Poiché la maggior parte degli epitopi precedentemente identificati in altri citocromi erano localizzati prevalentemente nella porzione C-terminale della molecola, i primi 200 residui aminoacidici sono stati esclusi dalle successive analisi. Tale scelta è anche giustificata dal fatto che questa porzione della molecola (elica B) è implicata nel legame tra CYP e membrana cellulare e risulta quindi scarsamente accessibile al legame degli anticorpi. Inoltre, lo studio degli epitopi lineari e/o conformazionali riconosciuti da auto-anticorpi anti-CYP presenti in altre patologie ha consentito di focalizzare l'attenzione su specifiche regioni. Infine, considerando che gli auto-anticorpi anti-CYP2E1 umano dei pazienti con CHC sono in grado di riconoscere anche il CYP2E1 di ratto ma non il CYP2D6 umano, dalle regioni candidate fin qui identificate si sono potute escludere quelle differenti dal CYP2E1 di ratto e quelle omologhe al CYP2D6 umano. Tale processo ha consentito di ridurre in maniera sostanziale il numero di aree potenzialmente coinvolte nel legame con gli auto-anticorpi anti-CYP2E1.

La strategia da noi elaborata prevede la mutazione di aminoacidi carichi (arginina, lisina, istidina, acido glutammico e acido aspartico), presenti all'interno di queste zone, con aminoacidi neutri dotati di scarso ingombro sterico, come ad esempio l'alanina. Questo approccio permette di ottenere

forme di CYP2E1 con una corretta struttura terziaria ma con mutazioni a livello degli epitopi candidati.

### ***PREPARAZIONE DI CYP2E1 RICOMBINANTE UMANO WILD-TYPE MEDIANTE ESPRESSIONE IN E. COLI***

Il plasmide di espressione pCWori+ contenente l'inserto codificante per il CYP2E1 wild-type è stato gentilmente donato dal Prof. Magnus Ingelman-Sundberg della Divisione di Tossicologia Molecolare, Istituto di Medicina Ambientale, Istituto Karolinska, Stoccolma, Svezia. In particolare alla sequenza del CYP2E1 sono stati aggiunti 6 residui di istidina all'estremità C-terminale e, per ottimizzare l'espressione, sono stati eliminati i nucleotidi codificanti i primi 18 aminoacidi. Cellule Supercompetenti XL1 Blue di E. Coli (70 µl) sono state transfettate per shock termico con 1 µl della soluzione di CYP2E1 wild-type plasmidico e successivamente selezionate con piastre LB agar contenenti ampicillina. Singole colonie sono state ulteriormente cresciute per 16 h a 37°C e 10 h a 4°C in terreno LB più ampicillina. 2 ml di queste colture sono stati aggiunti ad una soluzione contenente 178 ml di TB-medium (Bacto-Tryptone 1,2% (w/v), estratto di lievito 2,4% (w/v) , glicerolo 0,4% (v/v)), 20 ml di buffer potassio-fosfato 0,17 M (0,17 M di-idrogenofosfato di potassio, 0,72 M idrogenofosfato di di-potassio), 200 µl di ampicillina (50mg/ml), 200 µl di tiamina (1 M), 200 µl di acido δ-amino levulinico o d-ALA (0,5 M) e 200 µl di FeCl<sub>3</sub> (25 mM). La miscela di reazione è stata quindi incubata a 37°C in agitazione continua. La crescita batterica è stata monitorata spettrofotometricamente. Al raggiungimento di una densità ottica (o.d.) di 0,7 unità, alla miscela sono stati aggiunti 200 µl di IPTG (1 M) e 20 µl di imidazolo (0,5 M) a cui è seguita una successiva incubazione a 30°C in agitazione continua per 24 h.

### ***PURIFICAZIONE E MISURAZIONE DI CYP2E1 WILD-TYPE UMANO***

Le colture sono state trasferite in tubi da centrifuga e raffreddate in ghiaccio per 15 minuti. Dopo centrifugazione a 2800 g per 12 minuti a 4°C, i pellet sono stati risospesi in buffer TSE a 4°C (Tris-Acetato 50 mM a pH 7,6, saccarosio 250 mM, EDTA 0,25 mM) e in 0,25 mg/ml di lisozima. Dopo un'incubazione di 30-60 minuti in ghiaccio, gli sferoblasti sono stati recuperati per centrifugazione a 2800 g per 12 minuti a 4°C, risospesi in 100 mM di potassio fosfato buffer a pH 7,6, 6 mM di Mg-Acetato, 20% di glicerolo, 25 µl/ml di inibitori di proteasi (Hoffmann-La Roche) e lisati per sonicazione. I lisati batterici sono stati quindi centrifugati a 12000 g per 12 minuti a 4°C. Dopo



trasferimento dei surnatanti in tubi da ultracentrifuga e centrifugazione a 100000 g per 60 minuti a 4°C, i pellet sono stati prima risospesi in 2 ml di 50 mM di sodio fosfato buffer a pH 7,4, 300 mM di NaCl, 5 mM di imidazolo, 20% di glicerolo, 1% di sodio deossicolato e 1 mM di PMSF, omogeneizzati, incubati per 20 minuti e di nuovo centrifugati a 100000 g per 60 minuti a 4°C. I surnatanti sono stati quindi incubati con 0,5 ml di resina al Nickel (QIAGEN) per 1 h a 4°C e le miscele resina-campione sono state applicate alle colonne per la successiva separazione. Le colonne sono state lavate 4 volte con 4 ml di 50 mM di sodio fosfato buffer a pH 7,4, 300 mM di NaCl, 10 mM di imidazolo, 20% di glicerolo, 0,1% di sodio deossicolato e le frazioni contenenti il CYP2E1 sono state eluite con 0,5 ml di 50 mM di Tris-HCl a pH 7,4, 100 mM di NaCl, 500 mM di imidazolo, 20% di glicerolo, 1 mM di CaCl<sub>2</sub> e 0,1% di sodio deossicolato. La quantità ed il corretto folding di CYP2E1 wild-type sono stati controllati tramite lettura spettrofotometrica a 450 nm in presenza di sodio ditionito e CO, in accordo con il protocollo originale di Omura e Sato (28).

#### ***MISURAZIONE DEGLI AUTO-ANTICORPI ANTI-CYP CON SAGGIO IMMUNOENZIMATICO IN FASE SOLIDA***

Per la ricerca degli auto-anticorpi anti-CYP sono state utilizzate delle piastre di polistirene per ELISA (Nunc-Immuno Maxi-Sorp, Nunc, S/A, Roskilde, Denmark). Metà dei pozzetti sono stati ricoperti con 18,5 nM di CYP2E1 (espresso in laboratorio) o di CYP2D6 umano ricombinante purificato (Oxford Biochemicals Inc. Oxford, MI, USA) solubilizzati in buffer bicarbonato 0,1 M a pH 9,6 ed incubati overnight a 4°C. I rimanenti pozzetti sono stati riempiti con lo stesso volume di solo buffer bicarbonato. I siti di legame non specifici sono stati bloccati con 0,3 ml di coating buffer contenente il 3% (w/v) di BSA in PBS a pH 7,4 per 1 h a 37°C. I sieri dei pazienti (0,2 ml diluiti 1:50 in coating buffer) sono stati piastrati in duplicato ed incubati per 1 ora a 37°C. Dopo cinque lavaggi con PBS 0,25% (v/v) Triton X-100, ai pozzetti sono stati aggiunti 0,2 ml di siero anti-human di capra coniugato con perossidasi (diluizione 1:5000 in coating buffer) (Dako S.p.A., Milano, Italy). Dopo 1 h di incubazione a 37°C e ulteriori cinque lavaggi con PBS 0,25% (v/v) Triton X-100, la reattività anticorpale è stata valutata tramite l'aggiunta di una miscela di reazione contenente 0,4 mg/ml di 1-phenylendiamine, 0,4 µl/ml di perossido di idrogeno (30%), 5,1 mg/ml di acido citrico e 6,1 mg/ml di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anidro), a pH 5,0. I risultati sono stati espressi come densità ottica (o.d.) a 490 nm dopo aver sottratto alla reattività anti-CYP quella di background dei rispettivi pozzetti con il solo tampone bicarbonato.

### ***VALUTAZIONE DELL'AUTOREATTIVITÀ ANTI-CYP2E1 TRAMITE WESTERN BLOT ED IMMUNOPRECIPITAZIONE***

Il CYP2E1 ricombinante umano ( 9,6 pmol ) è stato solubilizzato in 15 µl di SDS buffer a pH 6,8 ( SDS 4% (w/v), 0,2 mol/l di Tris-HCl, 26% di glicerolo (v/v)) e usato per elettroforesi SDS/PAGE (90 minuti a 100 V, stacking gel al 4% e resolving gel al 10%). Dopo trasferimento su gel di nitrocellulosa Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Amersham, UK) (60 minuti a 100 V), la membrana è stata incubata con sieri umani (diluiti 1:100) o con un siero anti-istidina (diluizione 1:2000) (Amersham Biosciences, Amersham, UK). Il legame degli anticorpi è stato rivelato con immunoglobuline anti-human (diluizione 1:5000) o anti-mouse (diluito 1:2000) coniugate con perossidasi e reagente Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) e con apparecchiatura VersaDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA).

10 pmol di CYP2E1 wild-type o mutato sono stati disciolti in RIPA buffer (50 mmol/l di Tris/HCl, 1% di NP-40, 0,25% di sodio deossicolato, 150 mmol/l di NaCl e 1 mmol/l di EDTA a pH 7,4) a cui sono stati aggiunti 5 µl di siero umano (volume finale 100 µl con diluizione finale siero 1:20) ed incubati per 16 ore a 4°C su rotore orbitale. Dopo incubazione per 2 ore a 4°C con 50 µl di proteina A-sepharosio CL4B (1:1 sospensione in PBS) (Amersham Biosciences, Amersham, UK), gli immunocomplessi legati vengono recuperati tramite centrifugazione, lavati tre volte con 1 ml di PBS e sottoposti a western blot, utilizzando come anticorpo rivelatore della proteina CYP2E1 un siero anti-istidina di topo. L'intensità delle bande ottenute con le differenti forme mutate di CYP2E1 è stata misurata tramite videodensitometria, utilizzando il software Quantity One versione 4.5.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), ed espressa come percentuale di intensità residua rispetto al CYP2E1 wild-type.

### ***ANALISI DEI DATI E STATISTICA***

Per l'analisi statistica dei dati è stato impiegato il software statistico SPSS versione 12.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Le differenze tra i gruppi sono state stimate con test non parametrico Mann-Whitney e con test Chi-quadro. L'intervallo di confidenza è stato calcolato usando il software CIA versione 2.1.1 (T Bryant, University of Southampton, UK). L'adattamento alla distribuzione normale è stato valutato con i test di Kolmogorov-Smirnov e di Shapiro-Wilk. In presenza di una consistente deviazione dall'ipotesi di normalità, questa è stata corretta attraverso trasformazione logaritmica.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1) Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome" 1989 *Science* **244**, 359-362
- 2) Boyer N., Marcellin P. "Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C". 2000 *J. Hepatol.* **32**, 98-112
- 3) Alter M.J. "Epidemiology of hepatitis C" 1997 *Hepatology* **26**, 62S-65S
- 4) Alter M.J. "Epidemiology of hepatitis C in the West". 1995 *Semin. Liver Dis.* **15**, 5-14
- 5) Alberti A., Morsica G., Chemello L., Cavalletto D., Noventa F., Pontisso P., Ruol A. "Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV". 1992 *Lancet* **340**, 697-698
- 6) Mattsson L., Sonnerborg A., Weiland O. "Outcome of acute symptomatic non-A, non-B hepatitis: a 13-year follow-up study of hepatitis C virus markers" 1993 *Liver* **13**, 274-278
- 7) Barrera J.M., Bruguera M., Ercilla M.G., Gil C., Celis R., Gil M.P., Onorato del Valle M., Rodes J., Ordinas A. (1995) *Hepatology* **21**, 639-644
- 8) Houghton M., Weiner A., Han J., Kuo G., Choo Q.L. "Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C" 1991 *Hepatology* **14**, 381-388
- 9) Weiner A.J., Geysen H.M., Christopherson C., Hall J.E., Mason T.J., Saracco G., Bonino F., Crawford K., Marion C.D., Crawford K.A., Brunetto M., Barr P.J., Miyamura T., McHutchinson J., Houghton M. "Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections." 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3468-3472
- 10) Strassburg C.P., Vogel A., Manns M.P. "Autoimmunity and hepatitis C". 2003 *Autoimmun. Rev.* **2**, 322-331
- 11) Bogdanos D.P., Mieli-Vergani G., Vergani D. "Non-organ-specific autoantibodies in hepatitis C virus infection: do they matter?" 2005 *Clin. Infect. Dis.* **40**, 508-510.
- 12) Straussburg CP, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002; **22**:339-352.
- 13) Muratori L., Parola M., Ripalti A., Robino G., Muratori P., Bellomo G., Carini R., Lenzi M., Landini M.P., Albano E., Bianchi F.B. "Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane". 2000 *Gut* **46**, 553-561.
- 14) Ma Y., Thomas M.G., Okamoto M., Bogdanos D.P., Nagl S., Kerkar N., Lopes A.R., Muratori L., Lenzi M., Bianchi F.B., Mieli-Vergani G., Vergani D. "Key residues of a

- major cytochrome P450D6 epitope are located on the surface of the molecule.” 2002 *J. Immunol.* **169**, 277-285.
- 15) Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. “LKM-I autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase”. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1370-1378.
  - 16) Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdamos DP, Muratori L, et al. “Cytochrome P450D6<sub>193-212</sub>: a new immuno-dominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease.” *J Immunol* 2003; **170**:1481-1489.
  - 17) Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S, et al. “Cytochrome P450 2A6: a new hepatitic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection .” *J Hepatol* 2003; **39** : 800-806.
  - 18) Miyakawa H, Kitazawa E, Kikuchi K, Fujikawa H, Kawaguchi N, Abe K et al. “Immunoreactivity to various human cytochrome P450 proteins of sera from patients with autoimmune hepatitis, chronic hepatitis B, and chronic hepatitis C”. *Autoimmunity* 2001; **33**:23-32.
  - 19) Safdar K, Schiff ER. “Alcohol and hepatitis C”. *Semin Liver Dis* 2004; **24**:305-315.
  - 20) Westing J, Lagging LM, Spak F, Aires N, Svenssons E, Lindh M, et al. “Moderate alcohol intake increases fibrosis progression in untreated patients with hepatitis C virus infection”. *J Vir Hepatol* 2002; **9**:235-241.
  - 21) Rigamonti C, Mottaran E, Reale E, Rolla R, Cipriani V, Capelli F, et al. “Moderate alcohol consumption increases oxidative stress in patients with chronic hepatitis C”. *Hepatology* 2003; **38**:42-49.
  - 22) Vidali M, Stewart SF, Rolla R, Daly AK, Chen Y, Mottaran E, et al. “Genetic and epigenetic factors in autoimmune reactions toward cytochrome P4502E1 in alcoholic liver disease”. *Hepatology* 2003; **38**:42-49.
  - 23) Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, Serino R, Moia S, Alchera E, Carini R, Rigamonti C, Sartori M, Albano E “Detection of auto-antibodies against cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in chronic hepatitis C” *J Hepatol* **46** (2007) 605-612.
  - 24) Vidali M, Hidestrand M, Eliasson E, Mottaran E, Reale E, Rolla R, Occhino G, Albano E and Ingelman-Sundberg M. “Use of Molecular Simulation for Mapping Conformational CYP2E1 Epitopes”. *J Biol Chem* 2004; **279**:50949-50955.
  - 25) Giostra F, Manzin A, Lenzi M, Francesconi R, Solfrosi L, Manotti P, Muratori L, Zauli D, Clementi M, Bianchi FB. “Low hepatitis C viremia levels in patients with anti-

- liver/kidney microsomal antibody type 1 positive chronic hepatitis.” 1996 *J Hepatol* **25**, 433-438.
- 26) Vergani D. “LKM antibody: getting in some target practice.” 2000 *Gut* **46**, 449-450.
- 27) Jameson B.A., Wolf H. “The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants.” 1988 *Comput. Appl. Biosci.* **4**, 181-186.
- 28) Omura T., Sato R. “The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its Hemoprotein nature.” 1964 *J. Biol. Chem.* **329**, 2370-2378.

***ATTIVITÀ FORMATIVA***

- 10 gennaio 2007 “Gene silencing by RNA interference (RNAi)”. Prof.ssa Paola Defilippi. Centro di biotecnologie molecolari Univ. di Torino.
- 12 gennaio 2007 “Autoantibodies in systemic sclerosis : from clinical subsets to pathogenetic functions”. Prof. Carlo Chizzolini Department of Internal Medicine Geneva University Hospital.
- 17 gennaio 2007 “Detection of MiRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions”. Prof. Michele Caselle Univ. Torino.
- 1 febbraio 2007 “Gene Therapy strategies for Phenylketonuria”. Beat Thöny Dr.sc.nat. ETH.
- 22 febbraio 2007 “Fragile X syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis. Prof. Claudia Bagni Dipartimento di Biologia Università di Roma “Tor Vergata”.
- 6 marzo 2007 “Analisi statistica per la ricerca medica e scientifica” seminari SPSS Milano.
- 9 marzo 2007 “Vita, opere e miracoli dell’epatocita: differenziamento, transizione epitelio-mesenchima ed interazione con cellule staminali”. Prof. Marco Tripodi Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia. Univ. La Sapienza Roma.

- 14 marzo 2007 “Protein macroarrays, development of new supports for improved sensitivity”. Dr. Marina Cretich Istituto di chimica del riconoscimento molecolare-ICRM CNR Milano.
- 16 marzo 2007 “Microarrays di tessuti: una strategia per identificare nuovi biomarcatori tumorali”. Dott.ssa Maria Capra Unità di patologia molecolare IFOM- Istituto FIRC oncologia molecolare Milano.
- 16 marzo 2007 “Drosophila as a model for aging and cancer”. Prof. Dirk Bohmann Department of biomedical genetics University of Rochester USA.
- 27 marzo 2007 “Automazione e razionalizzazione del lavoro in laboratorio” Sede Eppendorf S.r.l Milano.
- 29 marzo 2007 “Marcatori farmacogenomici nel carcinoma coloretale: quali prospettive per una terapia personalizzata. Prof. Enrico Mini Dipartimento di farmacologia preclinica e clinica “M. Aiazzi Mancini” Università degli studi di Firenze.
- 16 maggio 2007 “Difetti genetici del pre-B cell receptor” Simona Ferrari Università di Bologna.
- 25 maggio 2007 “The regulation of hematopoietic stem cells by smad signaling” Prof. Stefan Karlsson Center for stem cell biology and cell therapy. Lund university, Sweden.
- 28 maggio 2007 “Translating basic science into therapeutic strategies for Shwachman Diamond syndrome” Prof. Steve Ellis University of Louisville Kentucky.

- 4 giugno 2007 “Sindromi autoinfiammatorie” Prof. Martini Università di Genova.
- 14 giugno 2007 “La genesi dei gliomi e i suoi risvolti prognostici e terapeutici” Prof. Davide Schiffer Università di Torino.
- 21 giugno 2007 “Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and the prediction of alternative splice transcripts” Dr Flavio Mignone Università di Milano.
- Ciclo seminari “START CUP” Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”
- CORSO di Inglese
- CORSO di “Statistica Medica per le Scuole di Specializzazione ed i Dottorati” Prof. Magnani.



**CONGRESSI**

*Il sottoscritto intende partecipare nei prossimi mesi ai seguenti congressi:*

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver,  
Milan, Italy, April 23-27, 2008

Inflammation and Autoimmunity: Bridging Public and Private Research. European  
BioAlpine Convention 2007 - Colleretto Giacosa (TO) Italy, 6-7 November

***PUBBLICAZIONI***

***Articoli***

Vidali M., Tripodi M.F., Ivaldi A., Zampino R., Occhino G., Restivo L., **Sutti S.**, Marrone A., Ruggiero G., Albano E., Adinolfi L.E. “Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C.” [accepted]

Occhino G., Ivaldi A., Hietala J., **Sutti S.**, Vidali M., Niemela O., Albano E. “Immune responses to oxidative stress-derived antigens sustain inflammation in Alcoholic Liver Disease.” [submitted]

***Abstracts***

Occhino G., Ivaldi A., Hietala J., **Sutti S.**, Vidali M., Niemela O., Albano E. “Immune responses induced by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in Alcoholic Liver Disease.” ESBRA 2007 11<sup>th</sup> Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism – Berlin – Germany, 23 – 26 Settembre 2007. *Alcohol and Alcoholism* 42(S1):i43(OC8-2), 2007.