

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**

**“AMEDEO AVOGADRO”**



**DOTTORATO DI RICERCA**

**IN**

**MEDICINA MOLECOLARE**

**XXII° CICLO**

**RUOLO DEGLI AUTO-ANTICORPI ANTI-CYP2E1**

**NELL'INFEZIONE CRONICA C**

**CANDIDATO**

**SALVATORE SUTTI**

**TUTOR**

**PROF. EMANUELE ALBANO**

**ANNO ACCADEMICO 2007/2008**

## *INDICE*

INTRODUZIONE.....	3
SCOPO.....	5
MATERIALI E METODI.....	6
RISULTATI.....	14
DISCUSSIONE.....	27
CONCLUSIONI.....	32
BIBLIOGRAFIA .....	33
ATTIVITÀ FORMATIVA ANNO ACCADEMICO 2007-2008 .....	36
PUBBLICAZIONI.....	38

## **INTRODUZIONE**

L'infezione cronica da virus dell'epatite C è spesso associata a numerose manifestazioni extraepatiche di autoimmunità, quali scialoadenite linfocitica, lichen piano, poliarterite nodosa, glomerulonefrite, tiroidite e crioglobulinemia mista (1). 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 (2).

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 autoimmune con produzione di autoanticorpi. Questa ipotesi ben si accorda con l'osservazione che differenti virus sono capaci di indurre pattern simili di autoanticorpi e che lo stesso virus si associa con autoanticorpi diretti verso numerosi componenti cellulari. Tuttavia il danno epatico non è sempre associato con risposte autoimmuni (3).

In aggiunta agli autoanticorpi non-organo specifici descritti sopra, i pazienti con infezione da HCV possono sviluppare autoanticorpi anti-microsomi epatici e renali di tipo I (LKM-1) diretti verso il citocromo P450 isoforma 2D6 (CYP2D6). Sebbene questi autoanticorpi siano osservati solo nello 0-11% dei pazienti (4), la sieropositività per LKM-1 riveste un ruolo particolarmente importante. Infatti i pazienti con infezione cronica da HCV con alti titoli di autoanticorpi anti-LKM-1 tendono a presentare sia un danno epatico più severo, sia più gravi effetti collaterali in risposta al trattamento con interferone (5-6). La possibilità che gli autoanticorpi anti-LKM-1 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-1 presenti in pazienti con infezione da HCV riconoscono il CYP2D6 espresso sul versante esterno della membrana plasmatica epatocitaria (7). Inoltre studi strutturali hanno indicato che i principali epitopi del CYP2D6 riconosciuti dagli anti-LKM-1 sono esposti sulla superficie del citocromo (8).

Gli anticorpi anti-LKM-1 presenti nel siero di pazienti con epatite da virus C riconoscono epitopi lineari e conformazionali (1). L'analisi di sequenza di questi epitopi ha rivelato omologie strutturali con alcune proteine dell'HCV (9-10). Recentemente, Marceau e collaboratori hanno dimostrato che i sieri di pazienti affetti da epatite cronica C, positivi per anticorpi anti-LKM-1, riconoscono epitopi conformazionali del CYP2D6, compresi tra gli amminoacidi 254 e 288, che cross-reagiscono con le proteine NS3 e NS5 del virus HCV (11). Questi dati sembrano suggerire

che il mimetismo molecolare tra il virus HCV e le proteine degli epatociti possa essere responsabile della perdita della tolleranza al self.

Oltre al CYP2D6 altri membri della superfamiglia del citocromo P450 (CYP) rappresentano dei bersagli antigenici per gli autoanticorpi associati all'epatite cronica da HCV. In particolare, Dalekos e colleghi hanno riportato la presenza di autoanticorpi anti-CYP2A6 nell'8% e nel 2% di pazienti infetti da HCV rispettivamente anti-LKM-1 positivi e negativi (12). Inoltre, una minoranza di pazienti con infezione cronica da HCV presenta titoli di autoanticorpi diretti verso CYP3A4 (13).

Recentemente, studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che circa il 40% dei pazienti con epatite cronica C presenta autoanticorpi diretti verso l'isoforma alcol-inducibile 2E1 del citocromo P450 (CYP2E1) (14). Questi autoanticorpi non cross-reagiscono con CYP2D6 e non sono associati a età, genotipo virale e consumo alcolico. Sebbene, inoltre, gli autoanticorpi anti-CYP2E1 riconoscano l'isoforma espressa sul versante esterno della membrana cellulare epatocitaria (14), l'analisi statistica non ha evidenziato associazioni significative fra la presenza dell'autoreattività anti-CYP2E1 ed aumentati livelli di transaminasi o gravità del danno all'esame istologico. Tuttavia, uno studio preliminare di caratterizzazione antigenica ha rivelato che gli autoanticorpi anti-CYP2E1 associati all'epatite cronica C presentano un'ampia eterogeneità di bersagli antigenici. Infatti, alcuni sieri mostrano una preferenziale reattività verso epitopi lineari del citocromo, mentre altri riconoscono esclusivamente epitopi conformazionali.

La presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 è stata documentata anche in pazienti con epatite indotta dal gas anestetico alotano (15) e in un sottogruppo di pazienti con patologia epatica alcolica in stadio avanzato (16). Studi condotti in queste popolazioni hanno evidenziato che questi autoanticorpi riconoscono specificatamente epitopi conformazionali presenti alla superficie molecolare di CYP2E1 (17).

Queste osservazioni ci hanno spinto ad investigare, in un'ampia popolazione di pazienti, la specificità antigenica degli autoanticorpi associati all'epatite cronica C e a valutarne il possibile significato sulla progressione del danno epatico indotto dal virus. Inoltre, parte dell'attività scientifica di questo secondo anno di Dottorato è stata dedicata allo studio dei meccanismi molecolari potenzialmente responsabili della perdita della tolleranza al self degli autoanticorpi anti-CYP2E1.

### ***SCOPO***

- Validazione dei risultati precedentemente ottenuti relativi alla prevalenza degli autoanticorpi anti-CYP2E1 in un'ampia coorte di pazienti con infezione cronica C.
- Studio del ruolo dell'auto-reattività anti-CYP2E1 nella patogenesi e nella progressione del danno epatico.
- Caratterizzazione della specificità antigenica degli auto-anticorpi anti-CYP2E1: identificazione di epitopi conformazionali maggiori.
- Studio dei meccanismi potenzialmente responsabili della perdita della tolleranza al self verso CYP2E1 nei pazienti con infezione cronica C.

## **MATERIALI E METODI**

### **Reclutamento di pazienti e controlli**

Per questo studio sono stati esaminati 137 pazienti affetti da epatite cronica C (CHC) afferiti consecutivamente all'Ospedale Maggiore della Carità di Novara. L'infezione da virus C è stata confermata dalla rilevazione di anticorpi anti-HCV, utilizzando un test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) di seconda generazione (Ortho Diagnostic System, Milano, Italy), e dell'HCV-RNA tramite kit Amplicor HCV (Roche Diagnostic System). Il genotipo virale è stato determinato impiegando il kit INNO-Lipa (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium), secondo le indicazioni del produttore. Tutti i pazienti erano negativi per la presenza di antigeni di superficie del virus HBV e di anticorpi anti-HIV e non erano affetti da altra patologia epatica. Il consumo alcolico giornaliero è stato valutato al momento del ricovero, utilizzando un questionario standardizzato descritto da Corrao e colleghi (18). Le caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione in studio sono mostrate in Tabella 1. 65 controlli sani senza infezione da HCV provenienti dalla stessa area geografica, e comparabili per sesso ed età alla popolazione in studio, sono stati reclutati tra il personale ospedaliero e universitario. Tutti i controlli presentavano un consumo alcolico entro i limiti indicati dalle linee guida WHO.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico e tutti i pazienti inclusi nello studio hanno fornito il loro consenso informato scritto. I campioni di sangue (5 ml) sono stati prelevati la mattina a digiuno per la preparazione del siero. Tutti i gruppi non assumevano alcol almeno nelle 24 ore precedenti il prelievo.

La biopsia epatica è stata effettuata in 113 pazienti all'inizio dello studio con tecnica di Menghini. Nei restanti pazienti, la presenza di controindicazioni severe associate alla cirrosi epatica ha precluso l'analisi. Ogni biopsia è stata valutata in cieco da un anatomopatologo per grading e staging, secondo la classificazione di Ishak (19).

	<b>Pazienti CHC</b>
Pazienti (Maschi/Femmine)	137 (81/56)
Età (anni)	55,3 (44,9-65,0)
Consumo alcolico (g/die)	0,0 (0,0-40,0)
Indice di massa corporea (BMI)	24,3 (22,0-27,0)
Volume corpuscolare medio eritrocitario (MCV) (fl)	89,0 (85,0-92,3)
Aspartato aminotransferasi (AST) (U/l)	56,0 (39,0-84,0)
Alanino aminotransferasi (ALT) (U/l)	81,0 (45,0-133,0)
$\gamma$ -glutamiltanspeptidasi ( $\gamma$ GT) (U/l)	42,0 (22,0-79,0)
Fosfatasi alcalina (ALP) (U/l)	165,0 (134,0-240,0)
Bilirubina ( $\mu$ mol/l)	0,80 (0,58-1,14)
Attività protrombinica (INR)	1,05 (1,00-1,14)
Albumina (g/dl)	4,2 (4,0-4,4)
Gammaglobuline (g/dl)	1,50 (1,25-1,80)
Sideremia ( $\mu$ mol/l)	112,0 (76,0-152,0)
Transferrina (mg/dl)	217,0 (158,0-265,8)
Ferritina (ng/ml)	188,0 (69,2-365,3)
Steatosi (pos)	68 (49,6%)
Necro-infiammazione (grading)	4 (3-6) (1-11)
Fibrosi (staging)	2 (2-4) (0-6)

Tabella 1: Caratteristiche biochimiche e cliniche dei pazienti investigati. I valori sono espressi come mediana e range interquartile (IQR). Per gli indici istologici di grading e staging è indicato anche il range di variabilità.

### **Misurazione degli autoanticorpi anti-CYP2E1 con saggio immunoenzimatico in fase solida (test ELISA)**

Per la ricerca degli autoanticorpi anti-CYP2E1 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 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 blotting 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 policlonale di coniglio anti-CYP2E1 (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Il legame degli anticorpi è stato rivelato con immunoglobuline anti-human (diluizione 1:5000) o anti-rabbit (diluizione 1:10000) 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). La reattività dei sieri verso CYP2E1 denaturato e ridotto è stata espressa come percentuale della reattività del siero policlonale di controllo.

Per gli esperimenti di immunoprecipitazione 10 pmol di CYP2E1 wild-type o mutato (vedi sezione successiva) 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 sono stati recuperati tramite centrifugazione, lavati tre volte con 1 ml di PBS e solubilizzati in 40 µl di SDS buffer pH 6,8 e analizzati e sottoposti a western blot, come descritto precedentemente, utilizzando come anticorpo rivelatore della proteina CYP2E1 un siero anti-istidina di topo (diluizione 1:2000), diretto verso la coda di istidina (His-6) della proteina. 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.



### Generazione di un modello molecolare di CYP2E1

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 4.0 (<http://www.expasy.org/spdbv/>). La visualizzazione grafica è stata ottenuta utilizzando il software RasTop (versione 2.2) di Philippe Valadon (La Jolla, CA).

### Preparazione di CYP2E1 ricombinante umano wild-type e isoforme mutate mediante espressione in E. Coli

Il plasmide di espressione pCWori+ (20) contenente l'insero 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 (21).

Per l'espressione delle isoforme mutate di CYP2E1 (vedi Tabella 2) sono stati utilizzati plasmidi disponibili presso il nostro laboratorio e preparati come descritto precedentemente (17).

N	mutazione
1	Lys324 → Ala324
2	Arg331 → Ala331
3	Lys342 → Ala342
4	Glu346 → Ala346
5	Lys420 → Ala420
6	Phe421 → Ala421

Tabella 2: Elenco delle isoforme mutate di CYP2E1 espresse in E. Coli ed utilizzate per gli esperimenti di immunoprecipitazione.

Cellule Supercompetenti XL1 Blue di E. Coli (70 µl) sono state transfettate per shock termico con 1 µl delle soluzioni di CYP2E1 plasmidico wild-type o mutato 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 umano wild-type e mutato**

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 delle isoforme di CYP2E1 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 (22).

### **Analisi di potenziali cross-reazioni tra CYP2E1 e proteine di HCV**

Le sequenze aminoacidiche, in formato FASTA, del citocromo umano P450 isoforma 2E1 (P05181) e di differenti genotipi virali, 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 la maggiore omologia con il CYP2E1 sono state selezionate porzioni proteiche di NS5B appartenenti ai sottotipi di HCV 1b (P26663) e 3a (Q81495).

Dopo aver individuato una buona omologia di sequenza tra il peptide 324-346 di CYP2E1 ed il peptide della proteina virale NS5B 422-480, abbiamo valutato la presenza di un'eventuale omologia a livello strutturale. A tal fine, avvalendoci del modello molecolare del CYP2E1 descritto nel paragrafo precedente, e tramite l'ausilio del software RasTop, abbiamo isolato la sequenza aminoacidica di interesse e generato un modello tridimensionale della regione contenente il peptide 324-346. Similmente abbiamo utilizzato il modello tridimensionale della proteina virale NS5B genotipo 1b (codice 1C2P), l'unica al momento disponibile nella banca dati RCSB Protein Data Bank (PDB) accessibile dal sito internet <http://www.rcsb.org>, per generare un modello tridimensionale del peptide virale 422-480. Infine, utilizzando il software DeepView-SwissPdbViewer, abbiamo confrontato i due modelli così realizzati, per valutare l'esistenza di motivi strutturali omologhi. L'analisi al computer ha dimostrato che i due modelli tridimensionali presentavano una buona sovrapposizione (RMSE = 0,062 nm).

### **Clonaggio della porzione proteica della RNA-polimerasi RNA-dipendente (NS5B) di HCV omologa al CYP2E1 umano**

Per generare la porzione nucleotidica di NS5B omologa al CYP2E1 umano sono state inizialmente realizzate due reazioni successive di PCR. La prima reazione è stata eseguita in un volume finale di 20  $\mu$ l, in assenza di DNA come stampo, ed utilizzando per la miscela di reazione: primer forward e reverse di 70 bp (Tabella 3) tra loro parzialmente sovrapponibili (18 bp) 0.5  $\mu$ M,  $T_m$  56°C (Biomers),  $MgCl_2$  1.5 mM (Fermentas), dNTPs 0.5 mM (Fermentas), Dream Taq polymerase 0.5 U/ $\mu$ l (Fermentas). Il programma di amplificazione per la reazione in esame, eseguito in termociclatore TECHNE TC312, è il seguente:

94 °C	5 min	1 ciclo
94 °C	1 min	
56 °C (T <sub>m</sub> )	30 sec	20 cicli
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	1 ciclo

Gli amplificati ottenuti, dopo aggiunta del colorante “Orange G” DNA Loading Buffer (6X), sono stati analizzati attraverso elettroforesi orizzontale su gel d’agarosio 1.5% (45 minuti a 100 V) in TAE (40 mM Tris, 40 mM acido acetico, 1 mM EDTA pH 8), e rivelati con GelRed (10000X) (Biotium, Hayward, CA). Per l’acquisizione delle immagini della corsa elettroforetica è stato utilizzato il sistema GelDoc Imaging XR System (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA).

I campioni sono stati successivamente purificati dal gel di agarosio avvalendosi del kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). Un’aliquota di ciascun campione è stata sottoposta ad un’ulteriore corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,5% (45 minuti 100 V) per controllare la resa dello step di purificazione, e quantificata al transilluminatore (BioRad UVGen), mediante confronto con un maker di DNA (GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus).

I campioni di DNA così purificati, ottenuti con la prima reazione polimerasica, sono stati utilizzati come stampo per una seconda reazione di PCR, alle stesse condizioni precedentemente descritte, utilizzando primers forward e reverse (0.5 µM, T<sub>m</sub> 50°C) (Biomers) parzialmente sovrapposti (18 bp) (Tabella 3) alla sequenza di DNA stampo complementare. In particolare, il primer forward comprende la sequenza codificante per un linker glicina-serina, mentre entrambi gli oligonucleotidi recano un sito di riconoscimento per gli enzimi di restrizione utilizzati successivamente per consentire l’inserimento del prodotto di amplificazione in un vettore di espressione. Gli amplificati risultanti sono stati sottoposti ad elettroforesi orizzontale su gel di agarosio 1.5% (45 minuti a 100 V), purificati e quantificati come descritto precedentemente.

<b>Primers per NS5B 1b</b>
<b>1-1F:</b> 5'-ctttctccatccttctagctcaggaacaactgaaaaagccctagattg <u>tcagatctacggggcctg</u> -3'
<b>2-1R:</b> 5'- <u>catggagtcgttcaatgatctgaggtaggtagtcaagtggctcaatggagtaacaggccccgtagatctgac</u> -3'
<b>3-2F:</b> 5'-gctag <u>gcgcgc</u> cat <u>ggaggagggtggctcc</u> caggatgattctgatgactcacttcttccatccttctag-3'
<b>4-2R:</b> 5'-cgat <u>gctagc</u> acctggagagtaactgtggagtgaaaatgcgctaaggccatggagtcgttcaatgatc-3'
<b>Primers per NS5B 3a</b>
<b>1-1F:</b> 5'-cacacttttctccatactccaatcccaggagatacttgatgccccctt <u>gactttgaaatgtacggg</u> -3'
<b>2-1R:</b> 5'- <u>gagctttcaatgattgctggtaaatccagcggagtgacagaataagtggccccgtacatttcaaatgc</u> -3'
<b>3-2F:</b> 5'-gctag <u>gcgcgc</u> cat <u>ggaggagggtggctcc</u> cgatggtgatgatgacacacttttctccatac-3'
<b>4-2R:</b> 5'-cgat <u>gctagc</u> tactggagagtaactgtggaccgagaacgcgcttagaccatggagtctttcaatgattgc-3'

Tabella 3: Elenco dei primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione di NS5B 1b e NS5B 3a; in blu sono rappresentate le sequenze per l'enzima di restrizione ed in verde i linkers glicina-serina. Le sequenze sottolineate indicano le regioni sovrapponibili.

Il templatò di 214 bp è stato poi sottoposto a reazione di sequenza (BigDye terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem) e analizzato con sequenziatore automatico (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer).

Successivamente, una versione modificata del vettore di espressione pGex4T-1, gentilmente fornita dal gruppo del Prof. Sblattero, e lo stesso inserto sono stati digeriti attraverso enzimi di restrizione BssHII e NheI e successivamente sottoposti a reazione di ligazione con DNA ligasi per l'inserimento del frammento di DNA nel vettore di clonaggio.

### **Analisi dei dati e statistica**

Per l'analisi statistica dei dati è stato impiegato il software statistico SPSS versione 15.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Le differenze tra i gruppi sono state stimate con test non parametrico Mann-Whitney o Kruskal-Wallis e con test Chi-quadro o test esatto di Fisher. L'intervallo di confidenza è stato calcolato usando il software CIA versione 2.1.1 (T Bryant, University of Southampton, UK). L'effetto indipendente delle variabili significative all'analisi univariata e multivariata è stato calcolato usando l'analisi di regressione logistica. 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, quando possibile, attraverso trasformazione logaritmica.

## RISULTATI

### Titoli e caratterizzazione degli autoanticorpi anti-CYP2E1: studio del ruolo dell'autoreattività anti-CYP2E1 nella patogenesi e nella progressione del danno epatico in pazienti con infezione cronica C

Recentemente, in uno studio preliminare, abbiamo dimostrato che circa il 40% dei pazienti con infezione cronica C (CHC) presentano titoli elevati di autoanticorpi diretti verso l'isoforma 2E1 del citocromo P450 (CYP2E1). Data l'importanza che l'autoreattività anti-CYP2E1 sembra avere nella progressione del danno in altre patologie epatiche, quali ad esempio la patologia epatica alcolica, l'epatite da alcol, l'epatite ricorrente dopo trapianto in pazienti CHC, abbiamo deciso di studiare la prevalenza ed il significato clinico di questi autoanticorpi in un'ampia coorte di pazienti con infezione cronica C.

A tale scopo, la presenza di autoanticorpi circolanti diretti verso il CYP2E1 ricombinante umano è stata valutata con metodica ELISA in 137 pazienti con epatite cronica C e in 65 controlli comparabili per età, sesso e provenienza geografica.

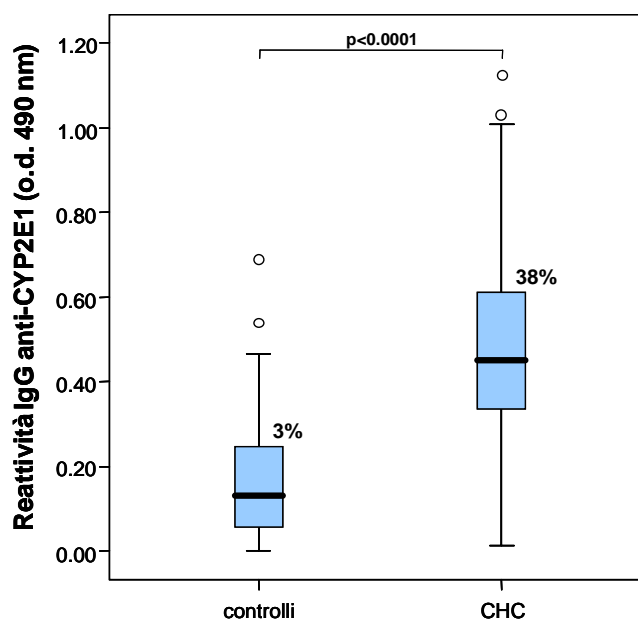


Figura 1: Diagrammi a scatola delle reattività IgG verso CYP2E1 del gruppo di controllo e dei pazienti con infezione cronica da HCV. I risultati sono espressi come unità di densità ottica a 490 nm. Le scatole comprendono i valori tra il 25° e il 75° percentile, le linee in neretto rappresentano le mediane, 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 autoanticorpi i cui titoli superano la soglia di positività, calcolata come 97° percentile della popolazione dei controlli (differenza di positività 35%, 95% IC 24-46%).

I titoli di autoanticorpi anti-CYP2E1 erano significativamente aumentati nei pazienti con epatite cronica C rispetto ai controlli (o.d. 490nm  $0,427 \pm 0,255$  vs  $0,174 \pm 0,159$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 1). L'analisi delle frequenze ha mostrato che autoanticorpi anti-CYP2E1 a titoli superiori al

97° percentile della popolazione dei controlli erano evidenziabili in 52 (38%) pazienti affetti da HCV (Figura 1).

A conferma di precedenti osservazioni preliminari, la presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 non era associata con BMI, consumo alcolico o aumento di transaminasi e  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasi. Inoltre, sia la presenza di steatosi, sia lo score di necroinfiammazione (grading) e di fibrosi (staging) erano comparabili nei pazienti positivi o negativi per l'autoreattività anti-CYP2E1.

Nonostante il 38% dei sieri mostrassero autoanticorpi anti-CYP2E1 in ELISA, 23/52 (44%) presentava una riduzione pari al 90% o maggiore nell'autoreattività anti-CYP2E1 in condizioni denaturanti e riducenti (Western blotting). Tuttavia, tutti i 52 sieri conservavano la capacità di immunoprecipitare il CYP2E1 umano purificato in condizioni native (Figura 2). Questi risultati hanno suggerito che è possibile identificare e analizzare un sottogruppo di pazienti con infezione cronica C sulla base della loro capacità di riconoscere preferenzialmente epitopi conformazionali di CYP2E1.

Questa differenza di specificità anticorpale non era associata con un particolare genotipo virale. Inoltre i pazienti con autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 rispetto ai pazienti anti-CYP2E1 negativi o con autoanticorpi diretti verso gli epitopi lineari non presentavano sostanziali differenze relativamente alle caratteristiche cliniche o biochimiche.

Tuttavia, all'esame istologico, lo score di necroinfiammazione (grading) era significativamente elevato nei pazienti con autoanticorpi anti-CYP2E1 diretti verso gli epitopi conformazionali (Figura 3). Inoltre, questi pazienti presentavano una maggior prevalenza di necroinfiammazione di gravità moderata (grading  $\geq 4$ ): 93% vs 56% con una differenza del 37% (95%IC 12-49%),  $p=0,008$ . In particolare, la presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 verso epitopi conformazionali era associata con un rischio aumentato di necroinfiammazione (O.R. 10,9; 95%IC 1,4-86,5). In aggiunta, il sottogruppo di pazienti con infezione cronica C e autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 presentava sia una maggior prevalenza (39% vs 13%, diff 26%, 95%IC 3-53%;  $p=0,037$ ) che un aumentato rischio (O.R. 4,3; 95%IC 1,2-16,1) di necrosi della lamina limitante epatocitaria ( $G1 \geq 2$ ), un importante marker morfologico di progressione verso la cirrosi.

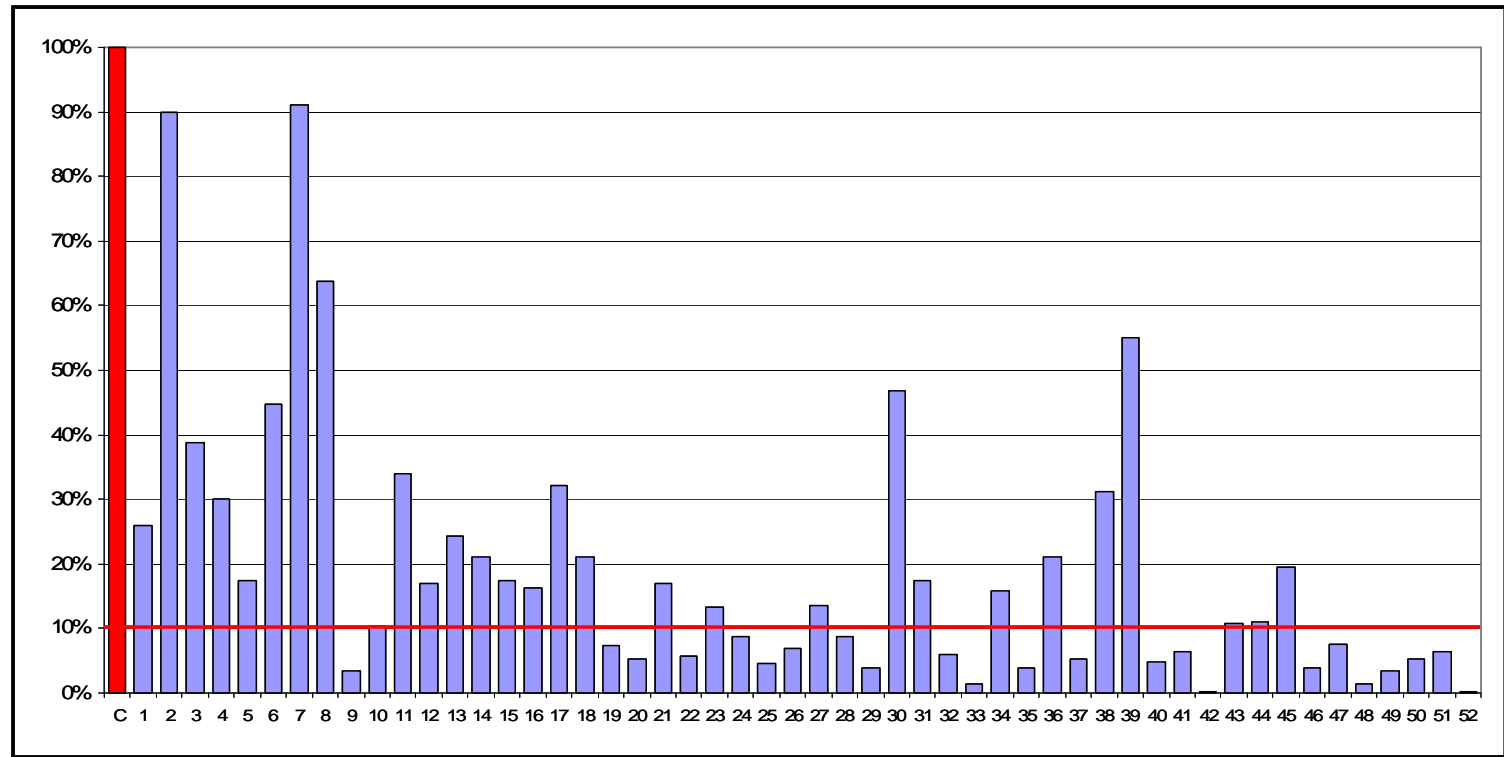
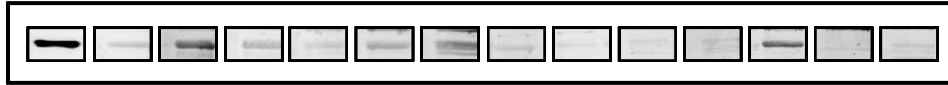


Figura 2: Autoreattività IgG anti-CYP2E1 valutata in condizioni denaturanti e riducenti (Western blotting). Le intensità delle bande sono state misurate tramite videodensitometria ed i risultati espressi come percentuale della reattività di controllo di un siero policlonale. La linea orizzontale indicante la perdita di reattività maggiore o uguale al 90% in Western blotting, rappresenta la soglia utilizzata per identificare tra i pazienti positivi per autoreattività anti-CYP2E1 quelli con autoanticorpi diretti preferenzialmente verso epitopi conformazionali. In alto sono raffigurati alcuni blot di esempio.



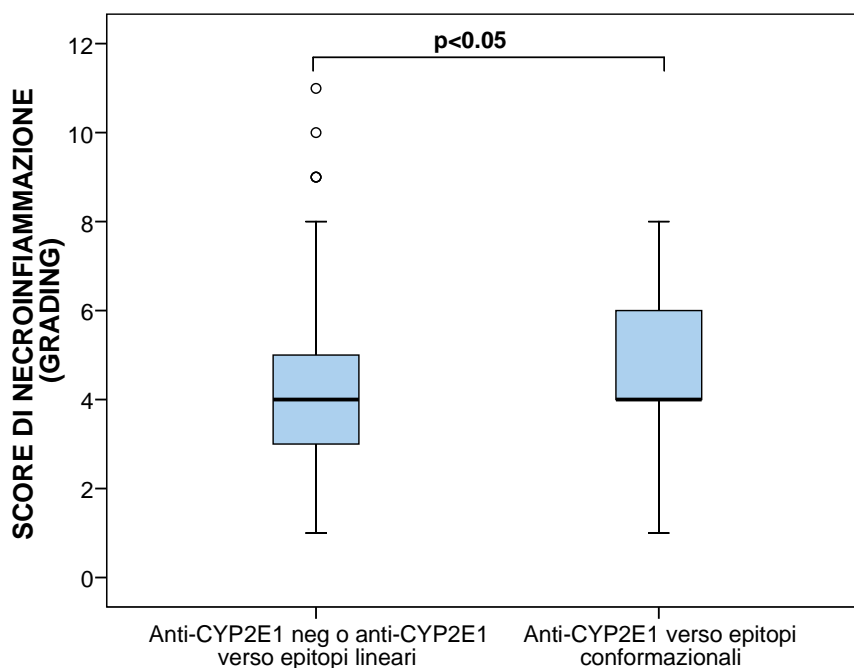


Figura 3: Diagrammi a scatola dello score di necroinfiammazione nei pazienti con anti-CYP2E1 negativi o con autoanticorpi diretti verso gli epitopi lineari e pazienti con autoanticorpi verso epitopi conformazionali di CYP2E1. Le scatole comprendono i valori tra il 25° e il 75° percentile, le linee in 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.

All'analisi univariata l'età ( $p=0,035$ ) e la presenza di autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 ( $p=0,023$ ), ma non la positività anti-CYP2E1 ( $p=0,741$ ) erano significativamente associati con la necroinfiammazione di grado moderato; tuttavia, l'analisi multivariata ha evidenziato che la presenza di anticorpi verso epitopi conformazionali rimane l'unico predittore indipendente di necroinfiammazione.

Anche il grado di fibrosi (staging) e la prevalenza di fibrosi di grado moderato/severo (staging>2) erano significativamente aumentati (75% vs 43%, diff 32%, 95%IC 8-49%;  $p=0.013$ ) nei pazienti CHC con autoreattività verso gli epitopi conformazionali di CYP2E1 (Figura 4). In particolare, il sottogruppo di pazienti con infezione cronica C e autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 presentava un aumentato rischio (O.R. 4,0; 95%IC 1,3-11,7) di fibrosi moderata/severa.

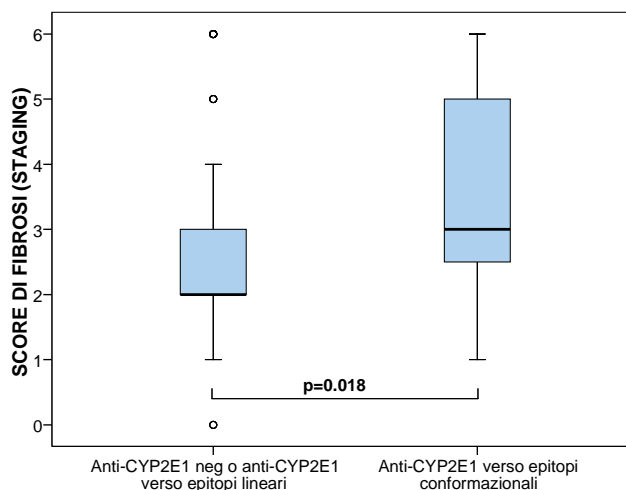


Figura 4: Diagrammi a scatola dello score di fibrosi nei pazienti con anti-CYP2E1 negativi o con autoanticorpi diretti verso gli epitopi lineari e pazienti con autoanticorpi verso epitopi conformazionali di CYP2E1. Le scatole comprendono i valori tra il 25° e il 75° percentile, le linee in neretto rappresentano 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.

L'analisi dei fattori associati allo sviluppo di fibrosi di grado moderato/severo ha evidenziato che l'età ( $p < 0,001$ ), la steatosi ( $p = 0,038$ ), la necroinfiammazione ( $p < 0,001$ ) e la presenza di autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 ( $p = 0,013$ ) erano significativamente associati con la fibrosi di grado moderato/severo; tuttavia, l'analisi multivariata ha evidenziato che solo il grado di necroinfiammazione e l'età sono predittori indipendenti di fibrosi moderata/severa.

I nostri risultati suggeriscono quindi che la presenza di autoanticorpi verso specifici epitopi conformazionali può rappresentare un fattore di rischio per la progressione ad un danno epatico più severo nei pazienti con infezione cronica C che sviluppano autoreattività anti-CYP2E1.

### Caratterizzazione della specificità antigenica degli auto-anticorpi anti-CYP2E1: identificazione di epitopi maggiori

Per caratterizzare gli epitopi riconosciuti dagli autoanticorpi anti-CYP2E1, un modello molecolare di CYP2E1 è stato generato tramite simulazione al computer, utilizzando il server di modellazione automatico SWISS-MODEL come descritto nella sezione Materiali e Metodi. In Figura 5 è possibile osservare il CYP2E1 modellato sulla struttura di CYP2C5 di coniglio, che condivide un'omologia di sequenza con CYP2E1 umano del 54,1%. Il modello tridimensionale di CYP2E1 così generato era sovrapponibile alla struttura di CYP2C5 (RMSE = 0,017 nm), ad eccezione del loop tra Lys277 e Tyr285 e dell'elica tra Pro213 e Pro222. In particolare quest'ultima regione è stata sostituita dalla corrispondente sequenza di CYP2C3 per favorire la cristallizzazione di CYP2C5. 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 o citocromi batterici (<http://joneslab.wsu.edu/>).

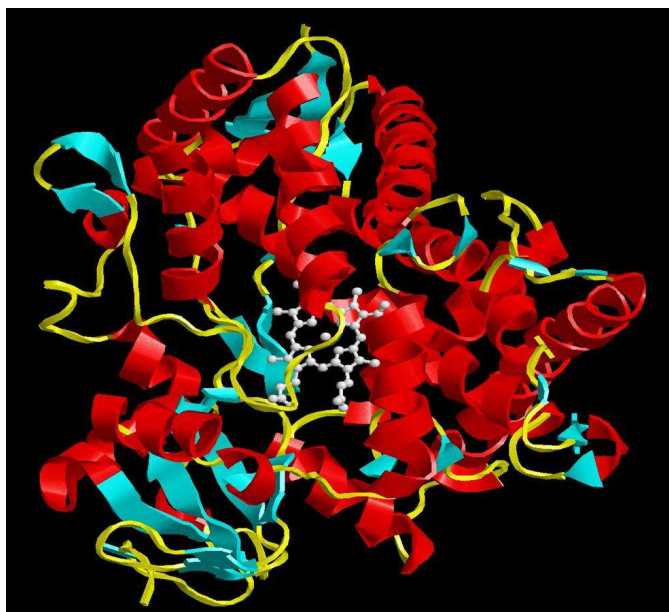


Figura 5: Struttura molecolare tridimensionale di CYP2E1, generata tramite simulazione al computer utilizzando il server di modellazione SWISS-MODEL e la struttura di CYP2C5 di coniglio. I colori giallo, azzurro e rosso indicano rispettivamente i loop, i  $\beta$ -foglietti e le  $\alpha$ -eliche. Al centro della figura è visibile il gruppo eme associato alla molecola del citocromo CYP2E1.

Per caratterizzare la specificità antigenica degli epitopi conformazionali riconosciuti dagli autoanticorpi anti-CYP2E1 presenti nei pazienti con infezione cronica C, abbiamo utilizzato una nuova metodologia sviluppata nel nostro laboratorio e descritta precedentemente. In breve, dopo aver escluso regioni altamente conservate nella famiglia dei citocromi, i possibili epitopi candidati sono stati selezionati combinando una revisione sistematica della letteratura unitamente ad analisi bioinformatiche e verifiche sperimentali. Gli aminoacidi così identificati sulla superficie molecolare

di CYP2E1 sono stati sostituiti con alanina, dotata di scarso ingombro sterico, tramite la tecnica di mutagenesi in situ. Questo approccio ha permesso di ottenere forme di CYP2E1 con una corretta struttura terziaria ma con mutazioni a livello degli epitopi candidati (si veda per maggiori dettagli riferimento 17). La sezione Materiali e Metodi riporta la lista completa delle isoforme utilizzate con il dettaglio dell'aminoacido mutato.

Per questo lavoro, le forme di CYP2E1 sono state espresse in batteri e, grazie alla coda di istidina, purificate utilizzando colonne con una resina al nichel. Le concentrazioni di CYP2E1 wild-type e mutati, dopo espressione e purificazione, sono state calcolate tramite lettura spettrofotometrica a 450 nm, utilizzando il metodo originale di Omura e Sato (22). Questo controllo ha permesso inoltre di verificare la conservazione dopo la mutagenesi della struttura terziaria di CYP2E1, requisito indispensabile per la ricerca di epitopi conformazionali. Infatti, la presenza di un picco a 450 nm contraddistingue molecole di citocromo normalmente ripiegate con un corretto inserimento del gruppo eme.

Per valutare l'effetto di singole sostituzioni aminoacidiche sulla capacità antigenica dell'intera molecola di CYP2E1, abbiamo valutato in immunoprecipitazione 20 sieri con anti-CYP2E1 conformazionali paragonando la reattività verso CYP2E1 wild-type rispetto ai titoli verso le isoforme mutate Lys324, Arg331, Lys342, Glu346, Lys420 e Phe421. È stata inoltre utilizzata una forma mutata di CYP2E1 contenente 4 sostituzioni aminoacidiche ad alanina dei residui Lys243, Glu244, Glu248 e Lys251 localizzati a livello dell'elica G. Questi 4 aminoacidi sono stati selezionati perché situati sulla superficie molecolare di CYP2E1 in un'area altamente antigenica, e la cui sostituzione non modifica il corretto folding dell'intero citocromo. La Tabella 4 mostra che uguali quantità di CYP spettrale wild-type o mutato sono immunoprecipitate dai differenti sieri in misura maggiore o minore, verosimilmente a causa dell'affinità variabile indotta dalla singola sostituzione aminoacidica. In particolare, considerando variazioni nella reattività anticorpale dell'ordine del 50%, abbiamo osservato che le sostituzioni di Lys324 e Arg331, da sole o in combinazioni, erano le più efficaci, modificando la reattività verso il CYP2E1 di 17 dei 20 sieri testati (85%). La reattività dei restanti 3 sieri era invece modificata dalla mutagenesi a carico dei residui Lys342 e Glu346 (Tabella 4). Queste stesse mutazioni erano inoltre efficaci in altri 7 sieri. Le sostituzioni a carico di Lys420 e Phe421 erano più soggette a variazioni, coinvolgendo solo 8 sieri (40%) (Tabella 4). Al contrario, è interessante notare che tutti i sieri immunoprecipitavano in ugual misura l'isoforma mutata di CYP2E1 recante le 4 sostituzioni aminoacidiche nell'elica G (dati non mostrati). Inoltre, nessuna delle sostituzioni aminoacidiche ha alterato il riconoscimento di CYP2E1 da parte dei sieri con anticorpi diretti preferenzialmente verso gli epitopi lineari. La simulazione al computer, utilizzando il modello molecolare di CYP2E1, ha rivelato che i residui

mutati che influenzavano il legame anticorpale, sebbene distanti nella sequenza aminoacidica, vengono a trovarsi in stretta prossimità dopo il ripiegamento della proteina, identificando un possibile epitopo conformazionale in un'area larga circa 1.9-2.0 nm in un sito antigenico formato dalla giustapposizione delle eliche J', K'' e L (Figura 6).

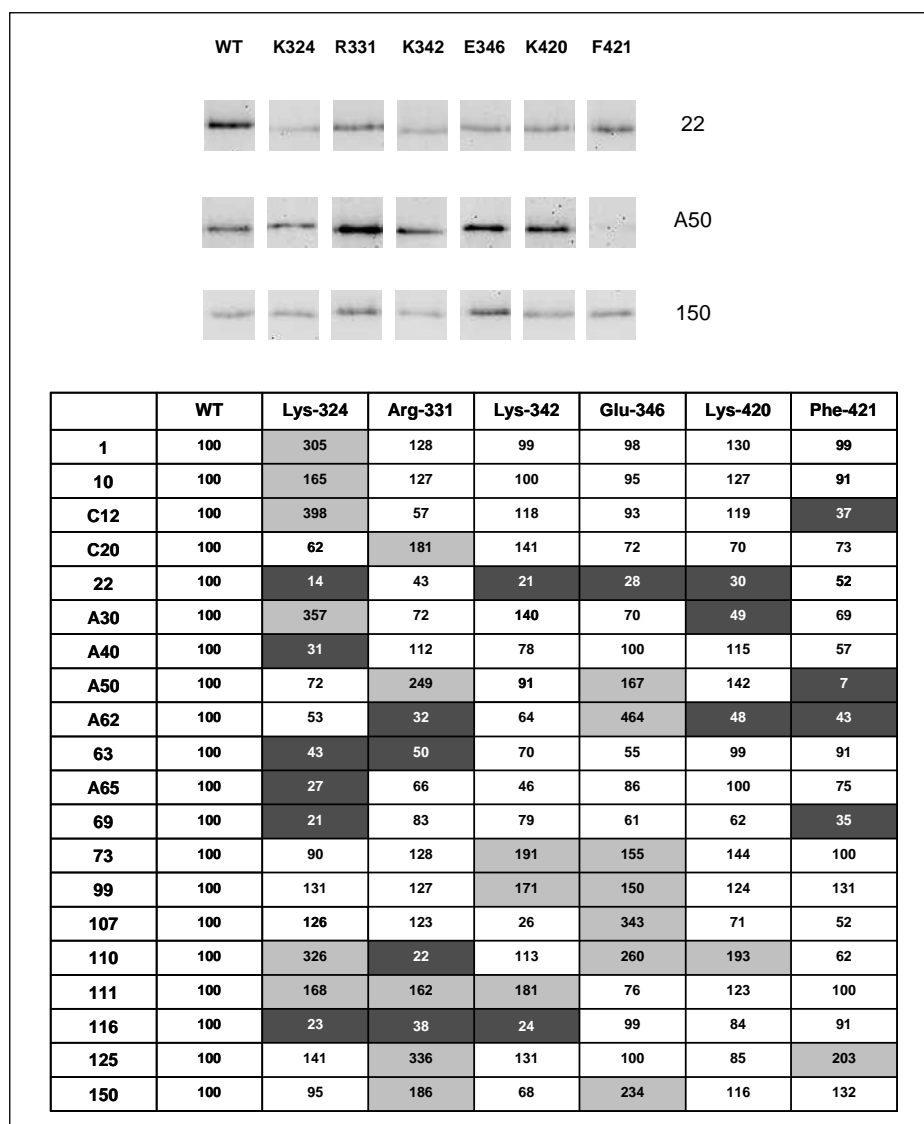


Tabella 4: Effetto di singole sostituzioni aminoacidiche sul riconoscimento di CYP2E1 ricombinante umano da parte di sieri di 20 pazienti con CHC e anticorpi anti-CYP2E1 diretti verso epitopi conformazionali. Le intensità delle bande sono state misurate tramite videodensitometria e i risultati sono stati espressi come percentuale di reattività residua delle forme mutate rispetto al CYP2E1 wild-type. I quadrati grigi e quelli neri indicano rispettivamente un aumento o una riduzione maggiore del 50%. In alto alcuni immunoblot di CYP2E1 wild-type e mutato dopo immunoprecipitazione con alcuni sieri.

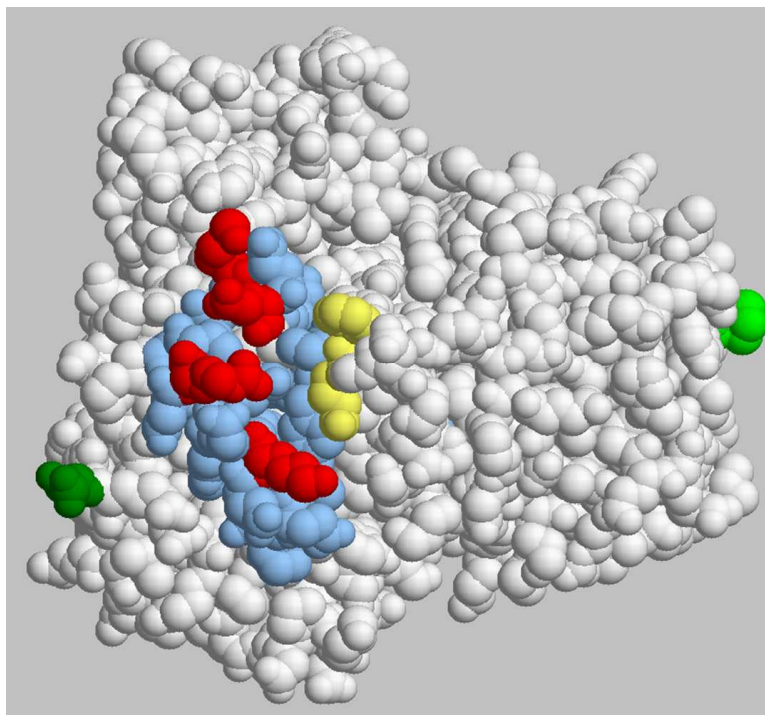


Figura 6: Modello molecolare tridimensionale di CYP2E1 (modalità spacefill). In verde chiaro e verde scuro sono colorate rispettivamente le estremità N- e C-terminale. Al centro, tra le eliche J', K'' e L in azzurro, è possibile osservare l'epitopo candidato con i residui aminoacidici Lys-324, Arg-331, Lys-342, Glu-346 (rosso) e Lys-420 e Phe-421 (giallo) interessati dal processo di mutagenesi.

## Studio dei meccanismi potenzialmente responsabili della perdita della tolleranza al self verso CYP2E1 nei pazienti con infezione cronica C.

Gli autoanticorpi anti-CYP2E1 non sono presenti esclusivamente nell'epatite cronica C, ma sono stati anche descritti in associazione con l'epatite indotta da alotano (15), con il danno epatico causato da refrigeranti idrofluoroclorocarburi (HCFC) (23) e nell'epatite idiosincrasica indotta da anestetici (24). Inoltre, in un precedente lavoro sperimentale, abbiamo dimostrato che gli stessi autoanticorpi sono rilevabili in un sottogruppo (35-40%) di pazienti con epatite e/o cirrosi alcolica (16).

Se gli autoanticorpi anti-CYP2E1 sono coinvolti nella patogenesi e nella progressione del danno epatico, e non rappresentano esclusivamente un epifenomeno, la comprensione dei meccanismi responsabili della perdita della tolleranza al self verso il CYP2E1 risulta di fondamentale importanza nel caso di risposte autoimmuni associate ad epatiti tossiche. È stato ipotizzato che l'alchilazione da parte di metaboliti reattivi possa promuovere non solo una risposta alloimmune verso la proteina modificata, ma favorire inoltre l'attivazione di linfociti B autoreattivi normalmente quiescenti con produzione di autoanticorpi verso l'isoforma nativa del citocromo (25).

Al contrario, studiando gli anticorpi anti-LKM-1 associati all'epatite C, diversi gruppi hanno riportato omologie di sequenza e cross-reattività fra CYP2D6 e diverse proteine di HCV, cytomegalovirus (10) e dell'herpes virus-1 (9). Sebbene, come abbiamo recentemente dimostrato, gli autoanticorpi anti-CYP2E1 non cross-reagiscano con il CYP2D6 (14), la forte omologia (40%) di sequenza tra i due citocromi suggerisce la possibilità che lo stesso meccanismo di mimetismo molecolare responsabile dello sviluppo degli anticorpi anti-LKM-1 possa anche promuovere l'autoreattività anti-CYP2E1. Per verificare tale possibilità, le sequenze aminoacidiche che concorrono alla formazione dell'epitopo conformazionale del citocromo P4502E1 sono state allineate con le sequenze della poliproteina di diversi genotipi di HCV. In particolare, la Tabella 5 dimostra che esiste una buona omologia di sequenza tra il peptide 324-346 di CYP2E1 ed i peptidi 422-480 di NS5B dei genotipi di HCV 1b e 3a.

CYP2E1 324-346	-----KILHEEID-RVTC-----PSRIPAIKDRQE-----
HCV_NS5B1b 422-480	RMILMTHFFSILLAQEQLEKALDCQIYGCACYSIEPLDLEPQIIEBRLHGLSAFSLHSYSPG
CYP2E1 324-346	-----KHEEIDR-----VTC-----PSRIPAIKDRQE-----
HCV_NS5B3a 422-480	RMVMMTHFFSILCSQEIIDRPLDFEMYGATYSVTPLDLEPAIIEBRLHGLSAFVHSYSPV

Tabella 5: Rappresentazione grafica dell'allineamento tra il peptide 324-346 di CYP2E1 umano e il peptide 422-480 di HCV NS5B genotipo 1b e 3a. In colore sono indicati rispettivamente i residui aminoacidi omologhi (nero) o quelli con simili caratteristiche chimico-fisiche (grigio).

Poiché la proteina NS5B del genotipo 1b di HCV è stata cristallizzata, ed è quindi disponibile il modello molecolare, abbiamo analizzato, tramite una simulazione al computer, la possibile analogia strutturale fra la zona 324-346 di CYP2E1 e quella 422-480 di NS5B di HCV 1b. La Figura 7 mostra, in particolare, che gli aminoacidi Leu-325, Asp-330, Gly-334, Pro-335 e Pro-339 di CYP2E1 e gli omologhi virali Leu-439, Asp-444, Gly-449, Pro-456 e Pro-460 sono localizzati rispettivamente in un' $\alpha$ -elica e in una porzione adiacente non strutturata. Allo stesso modo, gli aminoacidi Ile-341 e Arg-344 di CYP2E1 e Ile-462 e Arg-465 di NS5B si ritrovano in un'altra sequenza di  $\alpha$ -elica. Infine, la conformazione tridimensionale dei due frammenti molecolari dimostra una disposizione spaziale abbastanza simile (RMSE = 0,062 nm) e comunque compatibile con l'ipotesi di cross-reattività dei due epitopi conformazionali. Queste osservazioni supportano la possibilità che fenomeni di mimetismo molecolare siano alla base dello sviluppo di reazioni autoimmuni verso CYP2E1 in corso di epatite cronica C.

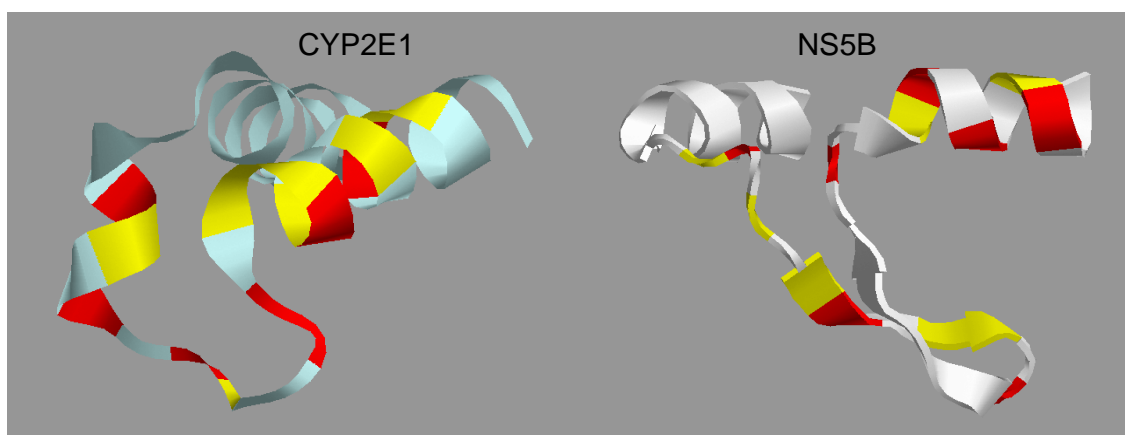


Figura 7: Modelli molecolari dei peptidi selezionati di CYP2E1 umano (in azzurro a sinistra) e NS5B di HCV genotipo 1b (in bianco a destra). In colore sono indicati rispettivamente i residui aminoacidici omologhi (rosso) o quelli con simili caratteristiche chimico-fisiche (giallo).

Al fine di confermare questo meccanismo di perdita della tolleranza al self verso CYP2E1 nell'infezione cronica C abbiamo iniziato esperimenti di clonaggio del peptide virale omologo dell'epitopo conformazionale riconosciuto dagli autoanticorpi. Vengono di seguito riportati i dati relativi agli esperimenti tuttora in corso.

I peptidi identificati sono stati clonati tramite due reazioni successive di PCR, utilizzando 4 primers lunghi 70 bp che presentavano una sovrapposizione parziale di 18 bp. Si sono quindi ottenute due sequenze di 214 bp, inserite successivamente nel vettore pGEX 4T-1, dopo averle controllate tramite sequenziamento automatico. In Figura 8 è illustrato l'intero processo sperimentale seguito per ottenere e clonare l'inserito selezionato. In Figura 9 è possibile osservare il



tracciato delle corse elettroforetiche con le quali abbiamo controllato il corretto peso molecolare degli amplificati derivanti dalle due reazioni di PCR.

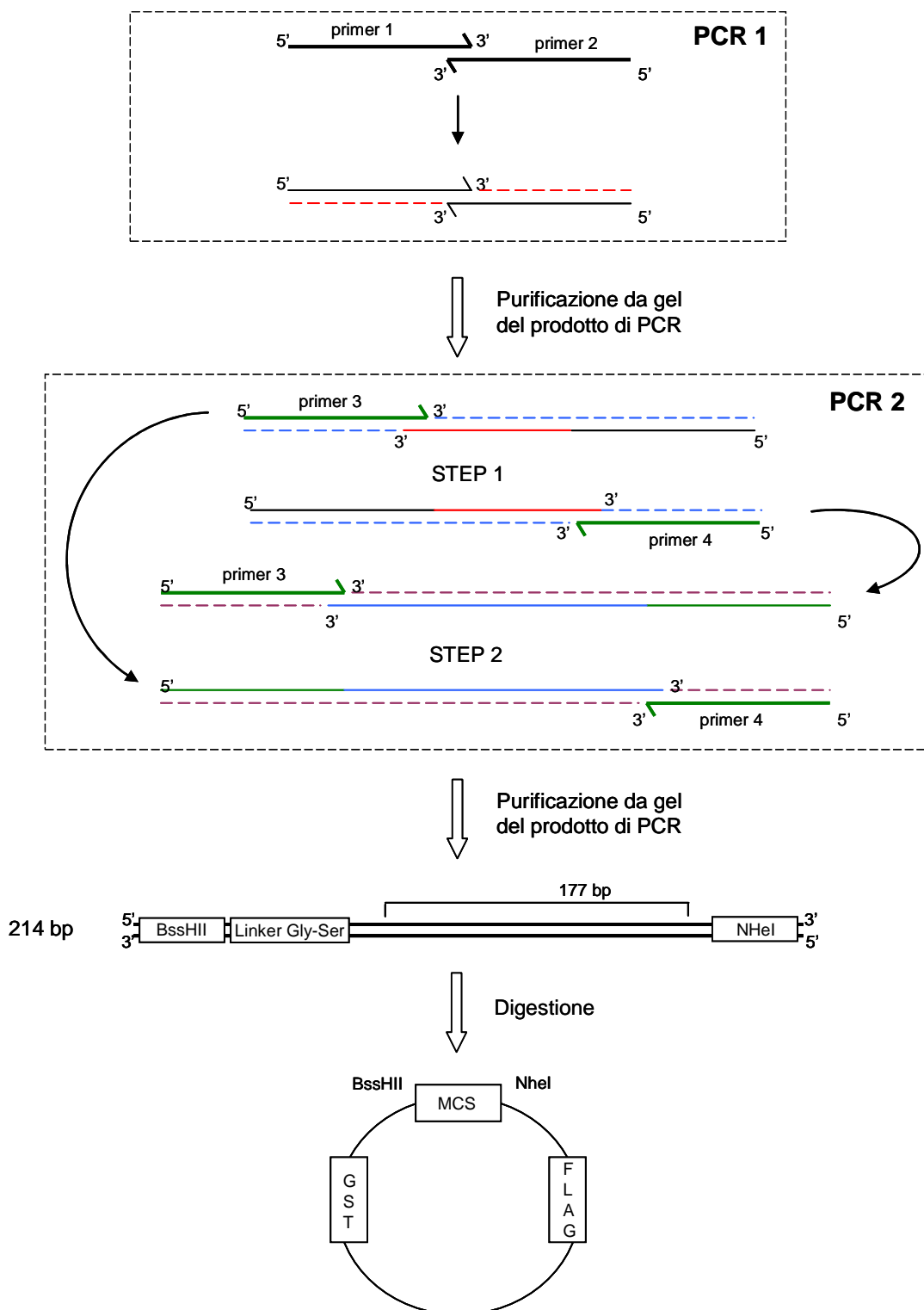


Figura 8: Schema illustrante il processo sperimentale seguito per la sintesi ed il clonaggio dell'inserto selezionato. Il peptide conterrà all'estremità N-terminale un tag di GST necessario per la sua purificazione e al C-terminale una sequenza FLAG per controllare la completa espressione dello stesso.

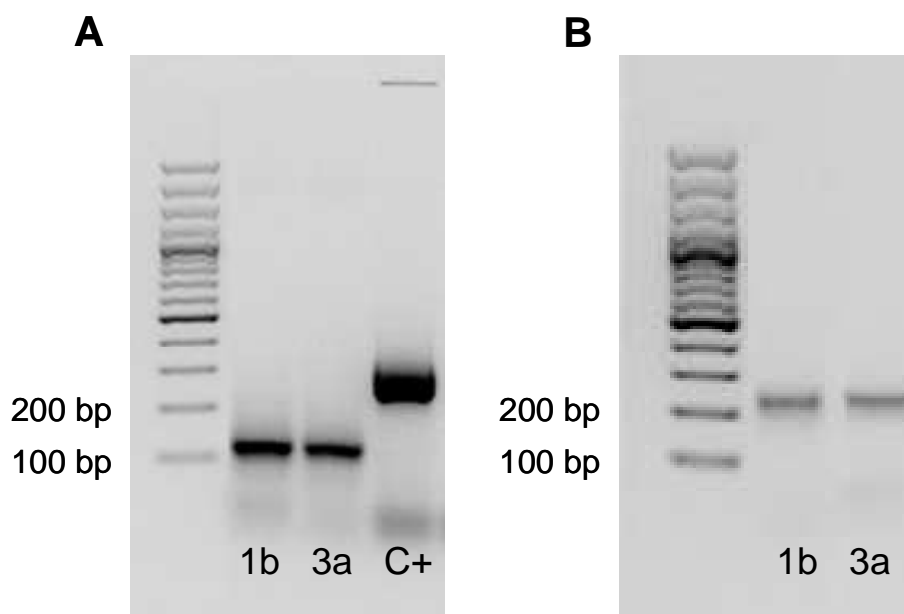


Figura 9: Corse elettroforetiche degli amplificati prodotti dalle 2 reazioni di PCR. I pannelli A e B mostrano rispettivamente le bande relative agli amplificati di 119 bp (A) e 214 (B) ottenuti per i genotipi 1b e 3a selezionati.

Ci proponiamo nei prossimi mesi di esprimere il peptide virale di interesse per utilizzarlo in esperimenti di preadsorbimento, al fine di valutare la cross-reattività degli anticorpi anti-CYP2E1 con il peptide omologo virale.

## DISCUSSIONE

La presenza di reazioni autoimmunitarie verso vari isoenzimi appartenenti alla superfamiglia del citocromo P450 non è una caratteristica insolita dell'infezione cronica da HCV. Autoanticorpi anti-CYP2D6 sono presenti fino al 10% dei pazienti affetti da epatite cronica C (1, 4), mentre autoanticorpi anti-CYP2A6 sono stati osservati nel 2-7% dei casi, principalmente in associazione con anticorpi anti-LKM-1 (12).

Questo studio, in accordo con nostre osservazioni precedenti, conferma, in una larga coorte di pazienti, che gli autoanticorpi diretti verso il CYP2E1 sono frequentemente associati con l'epatite cronica C, essendo riscontrabili nel 40% dei pazienti da noi studiati. Tuttavia, nonostante l'elevata prevalenza della positività anti-CYP2E1, l'analisi statistica non ha evidenziato alcuna associazione tra la presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 e l'indice di massa corporea (BMI), il consumo alcolico, l'autoreattività verso il CYP2D6, l'aumento delle transaminasi e della  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasi o un peggior danno istologico.

In uno studio precedente Miyakawa e collaboratori, utilizzando la tecnica del western blotting, hanno riportato che il CYP2E1 era riconosciuto da 1 dei 24 sieri (4%) e da 2 dei 31 sieri (6%) dei pazienti affetti da epatite cronica C rispettivamente positivi e negativi per anticorpi anti-LKM-1 (13). L'elevata frequenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 osservata nei nostri pazienti può essere in parte spiegata considerando che la tecnica del western blotting impiegata da Miyakawa probabilmente ha sottostimato la presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1, poiché, come confermano i nostri dati, in una discreta frazione di pazienti con epatite cronica C questi anticorpi sono diretti verso epitopi conformazionali, il cui riconoscimento viene perso dopo denaturazione della proteina. A questo proposito occorre ricordare che anche gli anticorpi anti-LKM-1 associati con l'infezione da HCV riconoscono preferenzialmente epitopi conformazionali sul CYP2D6 (26-27). In accordo, combinando i dati sperimentali dei saggi ELISA con quelli dell'immunoprecipitazione e del Western blotting, abbiamo osservato che fino al 44% dei nostri pazienti con infezione cronica C e con alti titoli di autoanticorpi anti-CYP2E1 riconoscono prevalentemente epitopi conformazionali della molecola del citocromo. Sorprendentemente, questa differente reattività verso epitopi lineari o conformazionali non ha solo carattere descrittivo, ma permette di identificare facilmente un sottogruppo di pazienti con infezione cronica C a maggior rischio di progressione verso un danno epatico più severo. In particolare, i pazienti con prevalente riconoscimento degli epitopi conformazionali, rispetto ai pazienti negativi per anti-CYP2E1 o con autoanticorpi diretti verso epitopi lineari, presentano una maggior severità della necroinfiammazione (grading), sia all'analisi univariata che multivariata. Inoltre, l'analisi statistica ha evidenziato in questi soggetti un aumentato

rischio di necrosi della lamina limitante epatocitaria, importante marker morfologico di progressione verso la cirrosi, e similmente un maggiore grado di fibrosi.

Nel complesso queste osservazioni suggeriscono che unicamente un'autoreattività specifica verso epitopi conformazionali possa essere implicata nella patogenesi dell'epatite cronica C. Inoltre, la presenza di autoanticorpi circolanti anti-CYP2E1 non esclude la possibilità di un coinvolgimento di una risposta verso il CYP2E1 cellulo-T-mediata nel danno epatico. Infatti, la perdita della tolleranza delle cellule T verso il CYP2D6 è stata documentata in pazienti con anticorpi anti-LKM-1 (28-29).

È ben nota la capacità dell'etanolo di indurre l'espressione del CYP2E1, anche a seguito di un moderato consumo alcolico (30-31). Sulla base di questa osservazione ci si aspetterebbe che l'induzione del CYP2E1 da parte dell'alcol possa influenzare il danno epatico immuno-mediato. Tuttavia, i nostri dati non permettono di dimostrare un contributo significativo dell'autoreattività anti-CYP2E1 nella progressione dell'epatite cronica C indotta dall'alcol. Questo risultato può essere in parte spiegato considerando che l'induzione del CYP2E1 in risposta al consumo alcolico presenta una grande variabilità inter-individuale (32). Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che l'insulino-resistenza e la steatosi epatica, spesso associate con l'infezione da HCV (33) possono promuovere l'espressione di CYP2E1 indipendentemente dal consumo di alcol in pazienti con steatoepatite non alcolica (34-35).

Gli autoanticorpi anti-CYP2E1 sono stati inizialmente ritrovati in associazione con l'epatite indotta da alotano (15), con il danno epatico causato da refrigeranti idroclorofluorocarburi (HCFC) (23) e nell'epatite idiosincrasica indotta da anestetici (24). Inoltre gli stessi autoanticorpi sono presenti in un sottogruppo (circa il 35-40%) di pazienti con epatite e/o cirrosi alcolica (16). Sia gli autoanticorpi anti-CYP2E1 indotti dall'alotano sia quelli indotti dall'alcol riconoscono specificatamente due epitopi conformazionali sulla superficie della molecola di CYP2E1 che corrispondono, rispettivamente, all'elica G e ad un'area formata dalla giustapposizione delle eliche J' e K'' nella porzione C-terminale della molecola (17). È interessante notare come le stesse eliche G, J, K e L siano state identificate come zone altamente antigeniche anche in numerose altre patologie epatiche croniche, dove si ritrovano, insieme ad alloanticorpi, anche autoanticorpi diretti verso la stessa molecola del citocromo (Tabella 6).

La presenza nel siero dei pazienti con CHC di anticorpi diretti prevalentemente verso epitopi conformazionali di CYP2E1, identificati tramite esperimenti di immunoprecipitazione e western blotting, unitamente alla capacità dei sieri di riconoscere CYP2E1 esposto sulla superficie di epatociti (14), ci ha indotto a caratterizzare i possibili epitopi coinvolti.

Data la prevalente natura conformazionale degli epitopi non è stato possibile avvalersi di strategie solitamente impiegate per la determinazione di epitopi lineari, quali la sintesi chimica di peptidi coniugati ad albumina bovina o la produzione di frammenti di citocromi di differente estensione generati tramite taglio enzimatico.

<b>CYP</b>	<b>Localizzazione epitopi</b>	<b>Patologia associata</b>
CYP1A2	Elica J-K-L	Epatite autoimmune da diidralazina (36)
CYP2C9	Elica J-K-L	Epatite autoimmune da ac. tienilico (37)
CYP2D6	Elica G-L	Epatite autoimmune di tipo 2, HCV (8,11)
CYP2E1	Elica G, J'-K''	Patologia epatica alcolica, Epatite da alotano (17)
CYP3A1	Elica K	Reazioni di ipersensibilità a farmaci aromatici anticonvulsivanti (38)
CYP3A4	Elica G	Patologia epatica alcolica (39)
CYP21A2	Elica G-L	Morbo di Addison (40)

Tabella 6: Alcune patologie epatiche croniche con i relativi bersagli antigenici identificati in precedenti studi

Per il nostro studio si è deciso quindi di costruire un modello tridimensionale di CYP2E1. L'utilizzo di una struttura cristallizzata di mammifero (CYP2C5 di coniglio), in alternativa ad una batterica, come base per la generazione del modello, ha permesso una più corretta predizione della struttura secondaria e terziaria, in quanto le forme batteriche sono citoplasmatiche e quindi prive del segmento di ancoraggio alla membrana. Poter disporre di un modello corretto della molecola in esame condiziona sostanzialmente gli studi successivi, in quanto consente la selezione e/o l'eliminazione di intere regioni. Misurazioni al computer confermano l'accuratezza del nostro modello, in quanto in accordo con altre strutture simulate di CYP2E1 disponibili in letteratura. L'utilizzo di tecniche bioinformatiche, unitamente ad una revisione sistematica della letteratura e a dati ottenuti nel nostro laboratorio, ha permesso di ridurre l'elevato numero delle zone potenzialmente antigeniche.

Isoforme di CYP2E1 correttamente avvolte e recanti singole sostituzioni aminoacidiche nella porzione C-terminale, precedentemente utilizzate per investigare gli epitopi conformazionali di CYP2E1 nei pazienti epatopatici alcolisti (17), ci hanno permesso di studiare il ruolo di alcune delle regioni da noi selezionate per la reattività anti-CYP2E1 dei pazienti CHC.

I nostri dati, ottenuti analizzando 20 pazienti CHC, hanno evidenziato che, nonostante l'ampia variabilità presentata nel riconoscimento delle isoforme mutate, uno degli epitopi conformazionali coinvolto nel legame degli anti-CYP2E1 è localizzato a livello delle eliche J' e K''. 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 alotano (17). Tuttavia l'epitopo da noi identificato sembra coinvolgere una zona più vasta rispetto a quello coinvolto nella malattia epatica alcolica.

Inoltre, contrariamente a quanto osservato nella patologia epatica alcolica e nell'epatite da alcol, l'elica G non sembra essere un sito antigenico nei pazienti con infezione cronica C. Questi risultati sono in accordo con la mancata associazione tra alcol e reattività anti-CYP2E1 e avvalorerebbero l'ipotesi di un diverso meccanismo di perdita della tolleranza al self nei pazienti CHC rispetto ai pazienti alcolisti. Inoltre, il fatto che l'epitopo da noi identificato sia localizzato in un'area completamente differente da quella interessata dal legame degli autoanticorpi anti-CYP2D6, potrebbe spiegare l'assenza di cross-reattività CYP2E1-CYP2D6 dei sieri CHC.

È stato recentemente riportato che la porzione N-terminale di CYP2E1 e in particolare l'elica B con caratteristiche anfipatiche, è responsabile dell'interazione elettrostatica con i fosfolipidi carichi negativamente che ancorano il CYP2E1 alla membrana cellulare (41). La simulazione al computer dell'orientamento del CYP2E1 in relazione alla membrana (17) mostra che l'epitopo da noi identificato, localizzato nella regione compresa tra le eliche J' e K'', risulta essere ben accessibile al legame degli anticorpi. Questo dato ben si accorda con studi presenti in letteratura (7, 15) e con quanto osservato da noi precedentemente in esperimenti di immunofluorescenza, in cui la microscopia confocale ha confermato che gli anti-CYP2E1 legano il CYP2E1 presente sulla porzione esterna della membrana plasmatica degli epatociti, dove potrebbero mediare danno cellulare attraverso l'attivazione del complemento o con un meccanismo di citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC).

Al momento i meccanismi molecolari alla base dello sviluppo di autoimmunità in corso di epatite cronica C sono ancora largamente sconosciuti. Kerkar e colleghi hanno identificato una stretta omologia di sequenza e cross-reattività tra l'epitopo 193-212 di CYP2D6, riconosciuto da circa il 50% dei sieri con epatite cronica C positivi per gli anticorpi anti-LKM-1, e due strutture virali, la RNA-polimerasi RNA-dipendente dell'HCV (NS5; HCV 2977-2996) e l'esonucleasi alcalina del cytomegalovirus (CMV 121-140) (10). Inoltre, ulteriori omologie di sequenza sono state riportate tra l'epitopo 254-271 di CYP2D6 e le proteine dell'HCV e dell'herpes virus-1 (HSV-1) (9), suggerendo che il mimetismo molecolare con antigeni virali possa essere responsabile dello sviluppo dell'autoreattività anti-CYP2D6. A questo proposito, Marceau e collaboratori hanno recentemente dimostrato che i sieri di pazienti con epatite cronica C, positivi per gli anticorpi anti-LKM-1, che riconoscono l'epitopo conformazionale 254-288 di CYP2D6 cross-reagiscono con le proteine NS3 e NS5 del virus HCV (11). In accordo con questi dati, le omologie di sequenza e struttura riscontrate fra l'epitopo 324-346 di CYP2E1 e la porzione 422-480 della proteina NS5B di HCV suggeriscono che fenomeni di mimetismo molecolare siano anche alla base dello sviluppo dell'autoreattività anti-CYP2E1. Ulteriori esperimenti di clonaggio ed espressione del peptide virale

di interesse e saggi di immunocompetizione sono in corso per verificare l'effettiva cross-reattività degli autoanticorpi anti-CYP2E1 ed i peptidi di NS5B.

Alloanticorpi ed autoanticorpi sono frequentemente descritti in numerose patologie, tuttavia è spesso difficile discriminare le situazioni in cui essi realmente contribuiscono alla patogenesi del danno da quelle in cui essi semplicemente rappresentano un epifenomeno.

Questo studio, condotto in un'ampia popolazione di pazienti con infezione cronica C, ha il pregio di mostrare, non solo la presenza degli autoanticorpi, ma che il loro bersaglio sull'epatocita è raggiungibile e che i pazienti con la maggior autoreattività presentano un quadro istologico più severo, suggerendo uno specifico ruolo patogenetico degli anticorpi diretti verso gli epitopi conformazionali.

## ***CONCLUSIONI***

I nostri risultati dimostrano che:

- autoanticorpi diretti verso il CYP2E1 sono rilevabili ad elevati titoli in una frazione considerevole dei pazienti con epatite cronica C;
- unicamente gli anticorpi specificatamente diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 sono associati ad un danno epatico più severo e ad un maggior rischio di progressione dell'infezione;
- uno dei bersagli antigenici riconosciuti dagli autoanticorpi anti-CYP2E1 è un epitopo conformazionale localizzato nell'area compresa fra le eliche J' e K'';
- le analogie di struttura tra questo epitopo e una porzione della proteina NS5B di HCV suggeriscono fenomeni di mimetismo molecolare come causa dello sviluppo di perdita della tolleranza al self nei pazienti con infezione cronica C e autoreattività anti-CYP2E1.



**BIBLIOGRAFIA**

- 1) Strassburg C.P., Vogel A., Manns M.P. (2003) *Autoimmun. Rev.* **2**, 322-331
- 2) Bogdanos D.P., Mieli-Vergani G., Vergani D. (2005) *Clin. Infect. Dis.* **40**, 508-510
- 3) Bogdanos D.P., McFarlane I.G. (2003) *J. Hepatol.* **39**, 860-863
- 4) Strassburg C.P., Manns M.P. (2002) *Semin. Liver. Dis.* **22**, 339-352
- 5) Giostra F., Manzin A., Lenzi M., Francesconi R., Solforosi L., Manotti P., Muratori L., Zauli D., Clementi M., Bianchi F.B. (1996) *J. Hepatol.* **25**, 433-438
- 6) Vergani D. (2000) *Gut* **46**, 449-450
- 7) Muratori L., Parola M., Ripalti A., Robino G., Muratori P., Bellomo G., Carini R., Lenzi M., Landini M.P., Albano E., Bianchi F.B. (2000) *Gut* **46**, 553-561
- 8) 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. (2002) *J. Immunol.* **169**, 277-285
- 9) Manns M.P., Griffin K.J., Sullivan K.F., Johnson E.F. (1991) *J. Clin. Invest.* **88**, 1370-1378
- 10) Kerkar N., Choudhuri K., Ma Y., Mahmoud A., Bogdanos D.P., Muratori L., Bianchi F., Williams R., Mieli-Vergani G., Vergani D. (2003) *J. Immunol.* **170**, 1481-1489
- 11) Marceau G., Lapierre P., Beland K., Soudeyans H., Alvarez F. (2005) *Hepatology* **42**, 675-682
- 12) Dalekos G.N., Obermayer-Straub P., Bartels M., Maeda T., Kayser A., Braun S., Loges S., Schmidt E., Gershwin M.E., Manns M.P. (2003) *J. Hepatol.* **39**, 800-806
- 13) Miyakawa H., Kitazawa E., Kikuchi K., Fujikawa H., Kawaguchi N., Abe K., Matsushita M., Matsushima H., Igarashi T., Hankins R.W., Kako M. (2000) *Autoimmunity* **33**, 23-32
- 14) Vidali M., Occhino G., Ivaldi A., Serino R., Moia S., Alchera E., Carini R., Rigamonti C., Sartori M., Albano E. (2007) *J Hepatol.* **46**, 605-612
- 15) Bourdi M., Chen W., Peter R.M., Martin J.L., Buters J.T., Nelson S.D., Pohl L.R. (1996) *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 1159-1166
- 16) Vidali M., Stewart S.F., Rolla R., Daly A.K., Chen Y., Mottaran E., Jones D.E., Leathart J.B., Day C.P., Albano E. (2003) *Hepatology* **37**, 410-419
- 17) Vidali M., Hidestrand M., Eliasson E., Mottaran E., Reale E., Rolla R., Occhino G., Albano E., Ingelman-Sundberg M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50949-50955
- 18) Corrao G., Aricò S., Russo R., Carle F., Galatola G., Torchio P.F., Moiraghi A.R., di Orio F., de la Pierre M. (1991) *Int. J. Epidemiol.* **20**, 1037-1042
- 19) Ishak K., Baptista A., Bianchi L., Callea F., De Groote J., Gudat F., Denk H., Desmet V., Korb G., MacSween R.N., Phillips M.J., Portmann B.G., Poulsen H., Scheuer P.J., Schmid M., Thaler H. (1995) *J. Hepatol.* **22**, 696-699

- 20) Barnes H.J. (1996) *Methods Enzymol.* **272**, 3-14
- 21) Gillam E.M., Guo Z., Guengerich F.P. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 59-66
- 22) Omura T., Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.* **329**, 2370-2378
- 23) Hoet P., Graf M.L., Bourdi M., Pohl L.R., Duray P.H., Chen W., Peter R.M., Nelson S.D., Verlinden N., Lison D. (1997) *Lancet* **350**, 556-559
- 24) Njoku D.B., Mellerson J.L., Talor M.V., Kerr D.R., Faraday N.R., Outschoorn I., Rose N.R. (2006) *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 25-524
- 25) Van Pelt F.N., Straub P., Manns MP. (1995) *Semin Liver Dis.* **15**, 283-300
- 26) Yamamoto A.M., Cresteil D., Homberg J.C., Alvarez F. (1993) *Gastroenterology* **104**, 1762-1767
- 27) Duclos-Vallee J.C., Hajoui O., Yamamoto A.M., Jacz-Aigrain E., Alvarez F. (1995) *Gastroenterology* **108**, 470-476
- 28) Lohr H.F., Schlaak J.F., Lohse A.W., Bocher W.O., Arenz M., Gerken G., Meyer Zum Buschenfelde K.H. (1996) *Hepatology* **24**, 1416-1421
- 29) Arenz M., Pingel S., Schirmacher P., Meyer zum Buschenfelde K.H., Lohr H.F. (2001) *Liver* **21**, 18-25
- 30) Liangpunsakul S., Kolwankar D., Pinto A., Gorski J.C., Hall S.D., Chalasani N. (2005) *Hepatology* **41**, 1144-1150
- 31) Oneta C.M., Lieber C.S., Li J., Ruttimann S., Schmid B., Lattmann J., Rosman A.S., Seitz H.K. (2002) *J Hepatol.* **36**, 47-52
- 32) Dupont I., Lucas D., Clot P., Menez C., Albano E. (1998) *J Hepatol* **28**, 564-571
- 33) Lonardo A., Adinolfi L.E., Loria P., Carulli N., Ruggiero G., Day C.P. (2004) *Gastroenterology* **126**, 586-597
- 34) Emery M.G., Fisher J.M., Chien J.Y., Kharasch E.D., Dellinger E.P., Kowdley K.V., Thummel K.E. (2003) *Hepatology* **38**, 428-435
- 35) Chalasani N., Gorski J.C., Asghar M.S., Asghar A., Foresman B., Hall S.D., Crabb D.W. (2003) *Hepatology* **37**, 544-550
- 36) Belloc C., Gauffre A., André C., Bearne P.H. (1997) *Pharmacogenetics* **7**, 181-186
- 37) Lecoeur S., André C., Beaune P.H. (1996) *Mol Pharmacol.* **50**, 326-333
- 38) Leeder J.S., Gaedigk A., Lu X., Cook V.A. (1996) *Mol. Pharmacol.* **49**, 234-243
- 39) Lytton S.D., Helander A., Zhang-Gouillon Z., Stokkeland K., Bordone R., Aricò S., Albano E., French S.W., Ingelman-Sundberg M. (1999) *Mol. Pharmacol.* **55**, 223-233

- 40) Wedlock N., Asawa T., Baumann-Antczak A., Rees Smith B., Furmaniak J. (1993) *FEBS* **332**, 123-126
- 41) Neve E.P.A., Hidestrand M., Ingelman-Sundberg M. (2003) *Biochemistry* **42**, 14566-14575

**ATTIVITÀ FORMATIVA ANNO ACCADEMICO 2007-2008**

- **4 Ottobre 2007:** “Meccanismi molecolari di fibrogenesi nella steatoepatite non alcolica”  
Prof. Fabio Marra, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Firenze.
- **14 Gennaio 2008:** "Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche"  
Tenente Dott. Giorgio Portera, Ufficiale Biologo Carabinieri Reparto Investigazioni Scientifiche (RIS) Parma.
- **21 Gennaio 2008:** "K<sup>+</sup> channels in the heart: in and out of control"  
Dr. Susanne Radicke Ph.D, Institute of Pharmacology and Toxicology Dresden University of Technology Dresden Germany.
- **23 Gennaio 2008:** “Integrin trafficking and tumour cell invasiveness”  
Dr Jim Norman, Integrin Cell Biology Lab Beatson Institute for Cancer Research Glasgow G61 1BD Scotland, U.K.
- **24 Gennaio 2008:** “La Microscopia a Forza Atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni”  
Mario Raspanti Professore Ordinario di Anatomia Umana, Università dell’ Insubria –Varese.
- **6 Febbraio 2008:** "Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo"  
Dr. Gianluca Debellis, Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto di tecnologie Biomediche.
- **5 Marzo 2008:** "Analytic vaccinology and human cytomegalovirus: human monoclonal antibodies as tools to identify novel antigens for protective vaccination"  
Annalisa Macagno, PhD Institute for research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland.
- **7 Marzo 2008:** “Fatty liver preservation against ischemia-reperfusion injury”  
Joan Rossello Catafau, Experimental Hepatology Unit Institut d'Investigacions Biomèdiques Barcellona.
- **13 Marzo 2008:** "To repress gene expression just take out vinegar: role of the class II histone deacetylase HDAC4"  
Prof. Claudio Brancolini Dept. of Biomedical Sciences and Technologies Mati Center Of Excellence, Università di Udine, Italy.
- **9 Aprile 2008:** “Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria”  
Prof Gaetano Cairo, Istituto di Patologia Generale Università di Milano.
- **14 Aprile 2008:** “Interazioni tra tumore e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica: il ruolo della via metabolica del mevalonato”  
Massimo Massaia, Università di Torino.

- **26 Maggio 2008:** "Copy number variations: non solo ritardo mentale"  
Prof.ssa Orsetta Zuffardi, Facoltà di Medicina e Chirurgia Università degli Studi di Pavia
- **3 Giugno 2008:** "Il Trasferimento Tecnologico dall'Università all'impresa"  
Prof. Fabio Gastaldi Delegato del Rettore per la Ricerca Scientifica. Università degli Studi del Piemonte Orientale "A. Avogadro".
- **3 Giugno 2008:** "Panoramica delle biotecnologie come settore economico: Gli elementi fondanti dell'economia biotech. I cluster biotech. Il passaggio dal risultato scientifico all'innovazione.  
Fabrizio Conicella General Manager - Bioindustry Park Canavese
- **3 Giugno 2008:** "Trasferimento tecnologico e Brevetto: il Business development in campo Biotecnologico".  
Kevin Romani Business Development and Technology Transfer- Bioindustry Park Canavese
- **3 Giugno 2008:** "La valutazione di un progetto da un punto di vista aziendale".  
Alberto Baldi Business Development and Technology Transfer- Bioindustry Park Canavese
- **11 Giugno 2008:** "Lavoro in laboratorio-lavoro in azienda: differenze e punti di contatto. Il ruolo delle imprese innovative".  
Fabrizio Conicella General Manager - Bioindustry Park Canadese.
- **11 Giugno 2008:** "Dall'idea all'impresa: il business plan: I capitalisti di rischio. Dopo il finanziamento: lo sviluppo di un'impresa da un punto di vista strategico".  
Alberto Baldi Business Development and Technology Transfer- Bioindustry Park Canavese
- **13 Giugno 2008:** "Problem solving in patologia epatica"  
Prof Gavino Faà, Professore ordinario di Anatomia Patologica dell' Università di Cagliari.
- **1 Luglio 2008:** "Recombinant protein expression"  
Prof. Andrew Bradbury.
- **2 Luglio 2008:** "Recombinant antibodies and other affinity reagents"  
Prof. Andrew Bradbury.
- **16 Luglio 2008:** "Display technologies: phage yeast bacteria and ribosoma"  
Prof. Andrew Bradbury.
- **18 Luglio 2008:** "Fluorescent proteins"  
Prof. Andrew Bradbury

***PUBBLICAZIONI***

Rigamonti C, Vidali M, Donato MF, **Sutti S**, Occhino G, Ivaldi A, Arosio E, Agnelli F, Rossi G, Colombo M, Albano E. Serum autoantibodies against cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) predict severity of necroinflammation of recurrent hepatitis c (submitted).

Vidali M, Tripodi MF, Ivaldi A, Zampino R, Occhino G, Restivo L, **Sutti S**, Marrone A, Ruggiero G, Albano E, Adinolfi LE. Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 48(3):399-406, 2008.

Vidali M, Hietala J, Occhino G, Ivaldi A, **Sutti S**, Niemelä O, Albano E. Immune responses against oxidative stress-derived antigens are associated with increased circulating tumor necrosis factor-alpha in heavy drinkers. *Free Radic Biol Med.* 45(3):306-11, 2008.

***ABSTRACTS***

**Sutti S**, Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, Potettu E, Serino R, Moia S, Rigamonti C, Sartori M, Albano E. Autoantibodies against cytochrome P4502E1 (CYP2E1) conformational antigens in patients with chronic hepatitis C. EASL European association for the study of the liver. April 23-27, 2008 Milan, Italy. *Journal of Hepatology* 48(S2), 2008.

Vidali M, Hietala J, Occhino G, Ivaldi A, **Sutti S**, Niemela O, Albano E. Immune responses toward oxidative stress-derived antigens sustain inflammation in Alcoholic Liver Disease. EASL European association for the study of the liver. April 23-27, 2008 Milan, Italy. *Journal of hepatology* 48(S2), 2008.

**Sutti S**, Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, Potettu E, Serino R, Moia S, Rigamonti C, Sartori M, Albano E. Clinical and molecular characterization of anti-CYP2E1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. European Bioalpine Convention 6-7 November 2007 Colleretto Giacosa (TO) Italy.

Vidali M, **Sutti S**, Occhino G, Ivaldi A, Potettu E, Hietala J, Niemela O, Albano E. Immune responses toward oxidative stress-derived antigens sustain inflammation in Alcoholic Liver Disease. European Bioalpine Convention 6-7 November 2007 Colleretto Giacosa (TO) Italy.

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 11h 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.