

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA
Scuola di Dottorato in Scienze Biologiche, Biomediche, Biotecnologiche

Ciclo XXII°
Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED/03

**TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI AUTOLOGHE
GENETICAMENTE MODIFICATE PER IL TRATTAMENTO DI
PATOLOGIE METABOLICHE DEL FEGATO:
APPROCCIO DI TERAPIA GENICA EX VIVO PER LA
SINDROME DI CRIGLER NAJJAR TIPO I**

Candidata:
dr.ssa Beatrice Venturi

Coordinatore Dottorato:
prof. Giorgio Lenaz

Relatore Dottorato:
prof. Giovanni Romeo

Esame Finale

Anno Accademico 2009

ai Girasoli del Mondo,



"...per i malati Crigler Najjar la vita è come un campo di girasoli: come questo fiore trascorre la sua intera giornata a guardare il sole, traendo da questo la forza e l'energia necessaria per arrivare al giorno successivo, ...così fanno i malati Crigler Najjar..."

PREFAZIONE

Ho sempre pensato che il confronto sincero e la collaborazione reciproca siano il midollo della ricerca: vivere nuove esperienze, condividere idee e progetti, essere inglobati in dinamiche di lavoro sempre nuove e miranti ad ampie aspettative.

*“L’essere umano non è fatto per stare solo:
trova negli altri il conforto ed il confronto che lo fanno crescere e lo modellano
in una persona migliore.”*

Per avere creduto in me in tutto e per tutto, per avere condiviso le mie scelte e per avermi guidato nella strada del sapere, sarò sempre riconoscente al prof. Giovanni Romeo e al prof. Marco Seri del Laboratorio di Genetica Medica dell’Università di Bologna.

*“Il ricercatore è un ottimista:
deve imparare a godere dei pochi risultati per far fronte ai numerosi insuccessi.”*

Per avermi fatto assaporare la simpatia scozzese, per avermi insegnato che il tempo vola e che la ricerca, spesso, si fa attendere e per avermi accolto nel suo bellissimo laboratorio, ringrazio il prof. Stuart Forbes e tutto il gruppo di ricerca del Queen Medical Research Institute, Centre of Inflammation Research, dell’Università di Edimburgo.

*“Non conosciamo mai la nostra altezza finchè non siamo chiamati ad alzarci
e, se siamo fedeli al nostro compito, arriva al cielo la nostra statura.”*

Per aver riaccessi il cerino dell’entusiasmo, per aver dedicato la loro vita a quella ricerca che, per me, conta davvero e per essere sempre un esempio di grande tenacia malgrado le numerose insidie di ogni giorno un immenso grazie va al prof. Michele De Luca e alla prof.ssa Graziella Pellegrini del Centro di Medicina Rigenerativa “Stefano Ferrari” dell’Università di Modena e Reggio Emilia.

“Una cascata inizia con una goccia d’acqua...e poi guarda cosa diventa”

Per avermi dato forza ed energia con i loro applausi, perché nei loro occhi vedo l’attesa per qualcosa di grande, perché siamo uniti indelebilmente da un unico desiderio comune, ringrazio tutti i ragazzi dell’Associazione CIAMI onlus.

“Bisogna avere un caos dentro di sé per partorire una stella danzante”

Per essere stato sempre presente nel momento del bisogno, per il suo generoso aiuto incondizionato e per essere stato, ed essere ancora, non un uomo grande ma un grande uomo, sarò sempre riconoscente al dr. Corrado Zaini della Fondazione “Bruno Maria Zaini”.

INTRODUZIONE

LA SINDROME DI CRIGLER NAJJAR

La sindrome di Crigler Najjar è una rara malattia ereditaria causata dal deficit di un enzima epatico coinvolto nel processo di escrezione della bilirubina: l'accumulo patologico di questo metabolita determina un'itterizia pronunciata, specie a carico di sclere e cute, che ne costituisce il fenotipo clinico.

Il malato Crigler Najjar dovrà convivere dunque con un eccesso di bilirubina che, oltre a dare una serie di disturbi minori, può essere tossico per il sistema nervoso centrale in quanto, essendo un metabolita liposolubile, si accumula nei gangli basali del cervelletto e delle zone uditive, portando severe sequele neurologiche che possono condurre al coma e alla morte. Per evitare questo infausto destino, il malato Crigler Najjar è tenuto a seguire una specifica terapia che riduce enormemente la qualità di vita e soprattutto perde la sua efficacia nel tempo.

La sindrome di Crigler Najjar fu scoperta nel 1952 da Crigler e Najjar, due ricercatori statunitensi che ne identificarono il primo caso clinico. La malattia venne da questi delineata come “ittero non emolitico familiare congenito con kernicterus”. La malattia, che è diffusa in tutto il mondo e può essere un problema solo per chi ne è affetto (1 persona ogni milione), viene oggi definita come una rara sindrome metabolica itterica congenita ad ereditarietà autosomica recessiva. (Crigler e Najjar, 1952)

IL GENE

La sindrome di Crigler Najjar è causata dalla mancanza parziale o totale di una proteina del fegato coinvolta nel pathway di glicurono-coniugazione. In tutti i vertebrati, questo step di de-tossificazione verso molecole lipofile endogene ed esogene è catabolizzato da enzimi del reticolo endoplasmatico (*UDP-Glicuroni/Transferasi*, UGTs) che permettono di trasformare steroidi, farmaci, ormoni, metaboliti vari in composti polari idrosolubili e dunque facilmente eliminabili attraverso il sudore, l'urina o le feci.

Ad oggi, nell'uomo, si conoscono più di 15 UGTs funzionali la cui espressione si localizza principalmente nel fegato, nel tratto gastro-intestinale, nel rene e nella cute: sarà facile intuire la loro importanza per la biotrasformazione di sostanze visto la così disparata espressione nei tessuti, l'omologia di sequenza con gli altri vertebrati, la molteplice ridondanza del sistema nel processo di de-tossificazione ed il loro conseguente ruolo protettivo verso i composti tossici derivati dal cibo. (Tukey e Strassburg, 2000)

Più in dettaglio, la famiglia UGT1 mappa sul cromosoma 2q37 e codifica per 13 isoforme con un alto grado di omologia, in quanto prodotte da un unico locus in cui il sofisticato meccanismo di splicing alternativo permette la diversità molecolare generata; la famiglia UGT2, invece, mappa sul cromosoma 4q13 e codifica per 8 isoforme aventi un grado di omologia più bassa, poiché codificate da geni indipendenti.

Tutte le proteine UGTs sono caratterizzate da frequenti polimorfismi che ne alterano in minima parte la farmaco-cinetica e la farmaco-dinamica: è dunque importante studiare anche questo aspetto, per una migliore comprensione della risposta a farmaci e a cancerogeni ambientali.

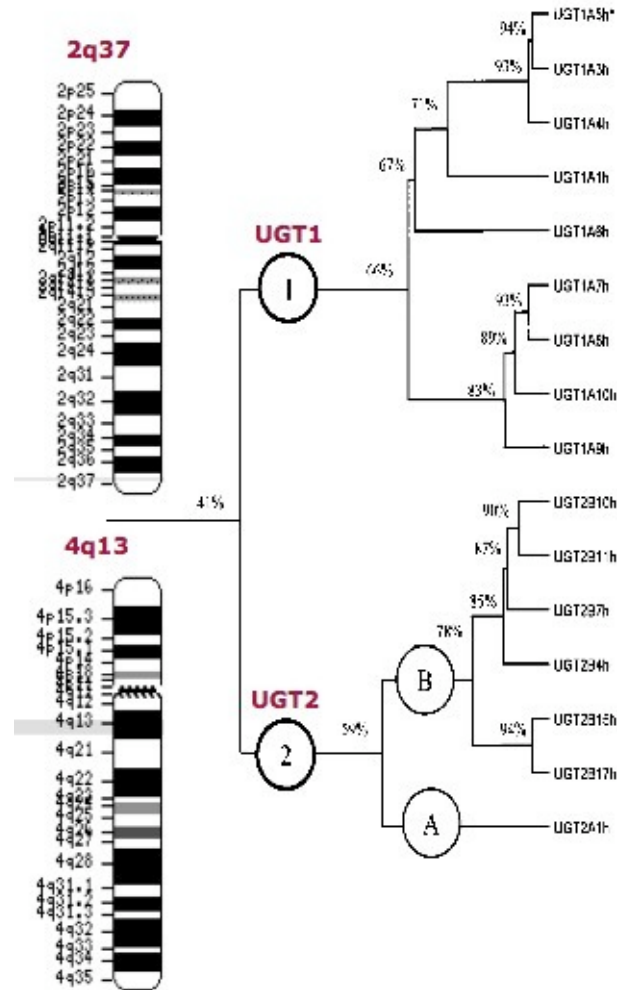


Figura : Albero filogenetico: le relazioni tra le UGTs umane, in termini di omologia di sequenza. Modificata da Tukey e Strassburg, 2000.

Le proteine UGTs sono in grado di metabolizzare anche gli stessi composti: ciò evita la possibile tossicità di una certa sostanza nel corpo, in mancanza di una determinata isoforma proteica. Vi è un'unica eccezione: l'isoforma UGT1A1, codificata dal locus UGT1A, è l'unica proteina presente in natura in grado di catabolizzare la bilirubina. (Bosma et al, 1994)
 Da qui, si evince facilmente che tutte le mutazioni causative la sindrome di Crigler Najjar mappano sul gene UGT1A1, indistintamente per tutta la sua lunghezza.

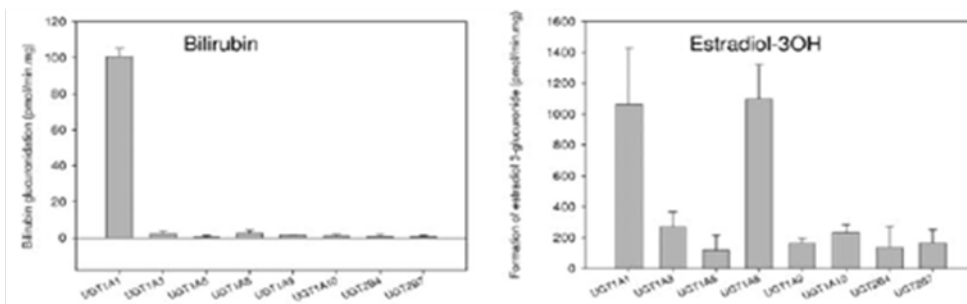


Figura : Specificità di glicurono-coniugazione nell'uomo per il metabolismo di substrati. Tratta da Zhang et al, 2007.

Il locus UGT1A è caratterizzato da una condivisione di esoni tale da poterlo definire il locus più complesso presente in natura, a paragone di qualsiasi altro sistema enzimatico: si espande per 218 kb e contiene 5 esoni codificanti la proteina. Il primo esone, però, è presente in 13 forme amminoterminali alternate codificanti il dominio di legame del substrato; in aggiunta ad esso, 4 esoni carbossiterninali codificano il dominio di legame per l'acido glucuronico. Attraverso lo splicing alternativo si crea l'unione tra uno dei 13 esoni N-term indipendenti e i restanti 4 esoni C-term comuni, originando così 13 diverse isoforme, che avranno tutte una diversa specificità di substrato. Ogni isoforma possiede un promotore (TA)₆TAA indipendente, che ne regola autonomamente l'espressione nei diversi tessuti del corpo, esaltando ancora una volta la complessità dell'epigenetica. Tra le 13 differenti isoforme codificate dal locus UGT1A soltanto 9 sono quelle funzionali (UGT1A1; UGT1A3; UGT1A4; UGT1A5; UGT1A6; UGT1A7; UGT1A8; UGT1A9; UGT1A10) mentre le restanti isoforme sono pseudogeni, cioè forme inattive dovute o alla mancanza del promotore (UGT1A12p; UGT1A13p) o a delezioni nucleotidiche causative di un troncamento precoce (UGT1A2p) o a clamp G-C inibenti l'inizio della trascrizione (UGT1A11p). (Gong et al, 2001)

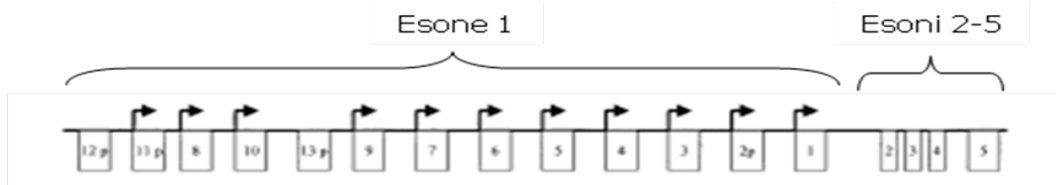


Figura : La struttura del locus UGT1A umano.
Modificata da Bosma, 2003.

Il gene UGT1A1 è over-espresso nel fegato ed è dunque la sola isoforma umana codificata dal locus UGT1A in grado di glicurono-coniugare la bilirubina: questo metabolita ne è il substrato principe, ma l'enzima può de-tossificare anche altri composti aggiuntivi, comuni a processi catabolici già noti per altre UGTs.

Ovviamente, nel caso in cui siano presenti alterazioni lungo la sequenza genica, si avrà una alterata funzionalità della sola isoforma UGT1A1 se la mutazione è circoscritta all'esone 1, mentre si andrà ad alterare l'attività anche di tutte le altre isoforme codificate dal locus se la mutazione mappa in uno degli esoni comuni. (Bosma, 2003)

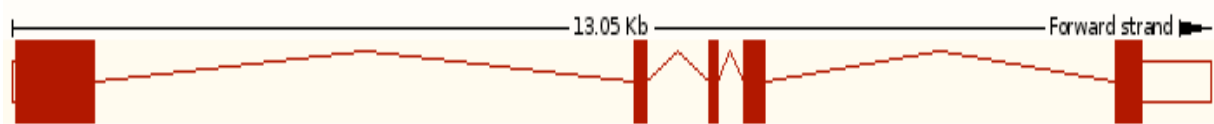


Figura : Il gene UGT1A1: sul chr 2q37 mappano 5 esoni codificanti per un trascritto di 2,3 kb.
Tratta da Ensembl.

Ad oggi, sono state mappate in tutto il mondo più di 70 diverse mutazioni causative la sindrome di Crigler Najjar tipo I e tipo II. (Servedio et al, 2005)

Molto studiati anche i polimorfismi del gene che rendono i loro portatori più suscettibili alla tossicità dose-limitante verso alcuni chemioterapici e che, in alcuni casi, possono manifestarsi come sindrome di Gilbert. (Zhang et al, 2007)

LA PROTEINA

La proteina umana UGT1A1 si estende per 533 amminoacidi, appartiene alla superfamiglia delle UGTs, ha due domini transmembrana, ha un cuore catalitico estremamente conservato e si localizza nella frazione subcellulare microsomale del reticolo endoplasmatico. La porzione N-term lega il substrato accettore: la bilirubina (BR); mentre la porzione C-term riconosce il substrato donatore: l'acido glucuronico (UDP-GlcA).

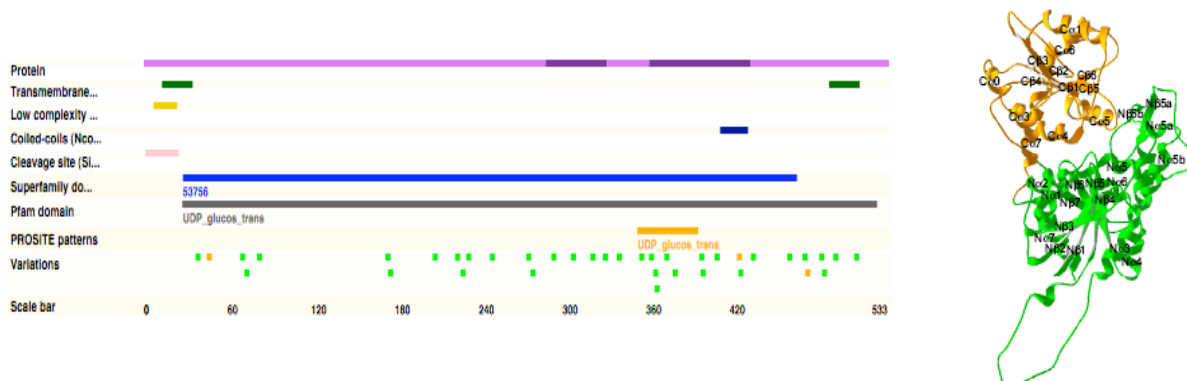


Figura : La proteina UGT1A1: domini strutturali (N-term)(C-term) e domini funzionali: Sequenza Amminoacidica (1-533); Dominio Transmembrana (13-35)(491-513); Coiled-coil (413-433); Bassa Complessità (7-24); Peptide Segnale (1-25); Superfamiglia (28-468); Dominio PFAM (28-525); Cuore Catalitico PROSITE (354-397); Variazioni di Sequenza. Tratta da Ensembl (sinistra) e da Li e Wu, 2007 (destra).

La principale porzione attiva delle UGTs è localizzata nel lume del reticolo endoplasmatico: tale compartimentazione funge da barriera, per limitare l'accesso del substrato donatore, risultando in una forma di latente attività. Studi recenti dimostrano che, per diventare attiva, la proteina UGT1A1 necessita di una prima fase di maturazione (i.e. clivaggio del peptide segnale), seguita da una fosforilazione e da una probabile dimerizzazione. Anche nella forma matura fosforilata dimerica, però, l'attività enzimatica dipende dalla presenza dell'acido glucuronico nella cisterna del reticolo: il passaggio di tale composto è mediato da un induttore fisiologico (UDP-N-AcetylGlucosamine, UDP-GlcNAc) che stimola l'internalizzazione del substrato nelle vescicole microsomiali, il cui trasporto attivo è mediato dal canale UGTrel7. (Muraoka et al, 2001)

Un'analisi più approfondita della sequenza amminoacidica UGT1A1 ha messo in evidenza il ruolo dei residui Cys509, Cys510, Cys517 presenti nella porzione C-term citosolica: tali amminoacidi vengono riconosciuti e legati dall'induttore fisiologico UDP-GlcNAc, stimolando in modo diretto l'entrata dell'acido glucuronico, inficiando così la velocità di attivazione dell'enzima. E' probabile che la stessa porzione citosolica sia coinvolta anche nello step di dimerizzazione, mediato da gruppi tiolici liberi piuttosto che da legami di-solfito. Ampliando l'analisi ad altri mammiferi si è visto che questi ed altri residui amminoacidici risultano ampiamente conservati anche tra le isoforme dello stesso locus: in dettaglio, alcune cisteine risultano fondamentali per l'attività enzimatica (Cys127; Cys156; Cys177; Cys223; Cys280; Cys383) mentre il residuo Cys186 ne riduce enormemente l'affinità per il substrato accettore bilirubina, ma non ne abolisce l'attività catalitica. (Ghosh et al, 2005)

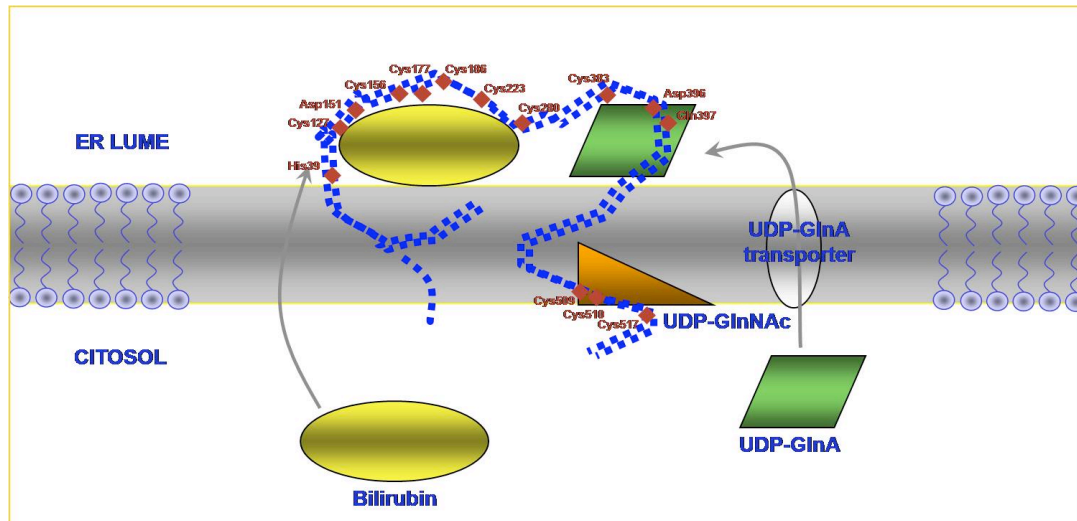


Figura : Residui amminoacidici coinvolti nell'attività della proteina hUGT1A1.

Tra i restanti residui amminoacidici della molecola è bene sottolineare anche l'importanza dei residui His39 e Asp151 per avere un ruolo essenziale nella catalisi della bilirubina; i residui Asp396 e Gln397 sono invece fondamentali poiché interni al cuore catalitico dell'enzima: una loro alterazione si rifletterà su tutte le proteine codificate dal locus UGT1A, la cui attività sarà inficiata da un improbabile riconoscimento specifico della molecola donatore. (Li e Wu, 2007)

IL METABOLISMO DELLA BILIRUBINA

Nell'uomo circa 250-300 mg di bilirubina vengono rilasciati ogni giorno dal catabolismo delle proteine dell'eme, principalmente nelle cellule reticolo-endoteliali del tessuto splenico. A pH fisiologico, la bilirubina forma molteplici legami idrogeno interni che la rendono idrofobica e ne aumentano l'affinità verso l'albumina, i tessuti lipidici ed il sistema nervoso centrale. La bilirubina idrofobica prodotta in periferia entra nel circolo sanguigno ma, essendo insolubile in acqua, si complessa all'albumina con legami non-covalenti (1 gr ALB lega 8.2 mg BR) e viene così trasportata al fegato. Nei sinusoidi epatici si scinde il legame albumina-bilirubina e, solo quest'ultima, è in grado di attraversare le fenestrazioni endoteliali per raggiungere la superficie dell'epatocita: un processo di diffusione passiva spinge la bilirubina dentro la cellula. Immediatamente, per evitarne il reflusso al plasma, la bilirubina è legata dalla proteina citosolica Ligandina (i.e. *Glutathione-S-Transferase*, GST) che la trasporta fino al reticolo endoplasmatico. Qui, sempre per un meccanismo di diffusione passiva, la bilirubina indiretta liposolubile (UCB) permea nel lume del reticolo, dove viene glicurono-coniugata dall'isoforma epatica UGT1A1, rilasciando composti mono/di-glicurono-coniugati idrosolubili (BMG; BDG) che diffondono dal reticolo endoplasmatico al citosol. La fase finale di questo processo prevede l'eliminazione biliare: la bilirubina diretta idrosolubile è escreta attraverso la membrana plasmatica canalicolare nel canalicolo biliare, tramite un processo di trasporto ATP-dipendente che coinvolge la proteina canalicolare di membrana ABCC2 (i.e. *Multidrug Resistance-associated Protein 2*, MRP2). (Harrison, 17° edizione)

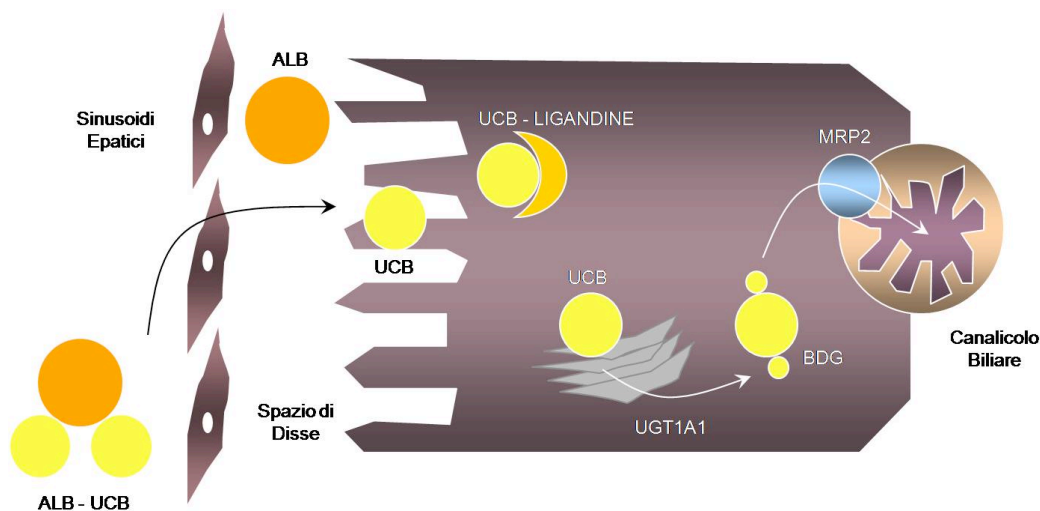


Figura : Il trasporto di bilirubina alla cellula epatica e il suo metabolismo.

FISIO-PATOLOGIA

Quando un globulo rosso è fagocitato da un macrofago, l'emoglobina è degradata ed importanti componenti della molecola sono riciclati all'interno dell'organismo. Dalla scissione del gruppo eme si ottengono ferro (che viene liberato nel plasma) e biliverdina, un pigmento verdastro che, nel macrofago, viene ridotto a bilirubina. La bilirubina è rilasciata nel plasma, dove si complessa all'albumina, una proteina carrier che la trasporta fino al polo biliare dell'epatocita. Qui, la bilirubina complessata all'albumina (bilirubina indiretta liposolubile) viene glicurono-coniugata per attività dell'enzima UGT1A1: si forma così bilirubina diretta idrosolubile che può essere escreta sotto forma di sale biliare nel sistema dei dotti biliari che si aprono nel duodeno. I batteri intestinali convertono la bilirubina diretta idrosolubile in urobilinogeno: circa un 80-90% di questi prodotti vengono eliminati con le feci (stercobilina) o convertiti nel rene in urobilina, componente dell'urina che ne conferisce il colore ambrato; il restante 10-20% sfugge all'eliminazione, è passivamente assorbito nel circolo entero-epatico e viene nuovamente escreto attraverso il fegato.

CLASSIFICAZIONE CLINICA

Da ormai diverse decadi si conosce una famiglia di disordini genetici caratterizzata da un diverso grado di iperbilirubinemia non-coniugata nel siero: soltanto le recenti scoperte di biologia molecolare hanno migliorato la comprensione di questo complesso locus genico, delucidandone ulteriormente le caratteristiche cliniche e diagnostiche.

Tra i tanti parametri utilizzabili nella classificazione clinica, la concentrazione di bilirubina sierica non-coniugata sicuramente spicca per importanza: se si considera che i valori fisiologici umani di bilirubina totale nel siero sono inferiori a 1 mg/dl, un malato iperbilirubinemico dovrà convivere con un eccesso di bilirubina: ne consegue non solo la manifestazione fenotipica

dell'ittero ma, quel che è peggio, possibili manifestazioni patologiche a carico di cute, cuore, rene e sistema nervoso centrale.

Sindrome di Crigler Najjar tipo I

La sindrome di Crigler Najjar tipo I è la forma più debilitante dell'iperbilirubinemia: l'isoforma epatica UGT1A1 non viene minimamente espressa e l'accumulo di bilirubina nel siero è prevalentemente in forma non-coniugata indiretta liposolubile, con valori >25 mg/dl: la manifestazione itterica è dunque molto evidente e c'è possibilità di insorgenza di kernicterus a tutte le età. Tali pazienti devono così sottoporsi a costanti terapie e a controlli periodici (i.e. test di funzionalità epatica; emocromo; ecografia epato-biliare; EEG) per accertarsi che i valori tossici di bilirubina libera (cioè non complessata all'albumina) si mantengano al di sotto di 0.6 (BR $\mu\text{mol/L}$: ALB $\mu\text{mol/L}$), range di ormai comprovata sicurezza. (Strauss et al, 2005)

Sicuramente grazie ad una mancata ignoranza scientifica sull'argomento e soprattutto grazie ad un corretto insegnamento alle famiglie, prima, ed ai pazienti, poi, di come prendersi cura e trasferire i concetti in pratica, tanti malati Crigler Najjar tipo I raggiungono oggi la matura età. Sono stati riportati in letteratura diversi casi di donne affette in grado di abbracciare una gravidanza: il pericolo di iperbilirubinemia è molteplice, sia per la madre che per il nascituro, soprattutto perché, vista l'im maturità dell'enzima nel feto, è bene sottolineare il fatto che la gestante dovrà smaltire un carico di bilirubina non-coniugata indiretta liposolubile più alto del solito e dunque sottoporsi ad un periodo incrementato di terapie, per contenere i valori tossici di bilirubina libera. (Gajdos et al, 2006)

Più in dettaglio, si sa che la concentrazione totale di albumina nel feto è circa 3gr e che la sua capacità legante massima verso la bilirubina liposolubile è di circa 25 mg/dl: questo facile conto matematico permette di avere ben chiaro quale sia il valore soglia sotto cui si deve mantenere la concentrazione di bilirubina totale nel sangue materno, al fine di evitare l'accumulo di bilirubina libera nel sangue fetale.

Sindrome di Crigler Najjar tipo II

La sindrome di Crigler Najjar tipo II ha un esito clinico decisamente migliore rispetto alla forma più grave, pur avendo una concentrazione sierica di bilirubina indiretta liposolubile compresa tra 6-20 mg/dl: anche se l'attività enzimatica risulta ridotta, la somministrazione di dosi giornaliere di un induttore epatico (Fenobarbitale) può essere sufficiente per aumentare la produzione di bilirubina glicurono-coniugata e dunque circoscrivere il rischio di kernicterus, talvolta anche senza l'utilizzo della fototerapia.

Sindrome di Gilbert

La sindrome di Gilbert è una forma di iperbilirubinemia benigna caratterizzata da una concentrazione sierica di bilirubina indiretta liposolubile lievemente più alta del normale ma anche dalla presenza di glicuronidi nella bile: non dà particolari problemi né richiede specifiche terapie. Ciò che la rende completamente diversa dalle due sindromi precedenti è l'incidenza

con cui si manifesta nella popolazione: ben il 7% ne è affetto, anche se molti di più (40%) sono gli individui portatori della alterazione genetica, a dimostrazione del fatto che, talvolta, la genetica è necessaria ma non sufficiente. Rimane dunque complessa l'analisi della sua manifestazione, forse legata a stress, digiuno, farmaci, alcool e ad altre sostanze esogene.

L'ipotesi più accreditata circa la sua 'alta' epidemiologia riguarda il ruolo anti-ossidante della bilirubina che, a piccole dosi sopra il normale, previene l'infarto alle coronarie e alcuni tumori; in aggiunta, il polimorfismo genetico implica una maggior espressione delle isoforme del locus nell'intestino, andando ad aumentare la protezione verso i composti tossici derivati dal cibo. (Bosma, 2003)

	CRIGLER NAJJAR tipo I	CRIGLER NAJJAR tipo II	SINDROME di GILBERT
EREDITARIETA'	autosomica recessiva	autosomica recessiva	autos. recessiva - dominante
MUTAZIONI	>40 UGT1A1	>40 UGT1A1	polimorfismi 40%
EPIDEMIOLOGIA	1 : 1.000.000	1 : 1.000.000	7% popolazione
BILI SIERICA TOTALE	20-45 mg/dl	6-20 mg/dl	1-6 mg/dl
ATTIVITA' ENZIMATICA	assente	molto ridotta	poco ridotta
GLICURONIDI IN BILE	assenti (UCB)	pochi (BMG/BDG)	presenti (BDG)
FENOBARBITALE	---	variabile	---
FOTOTERAPIA	8-10 h/day	variabile	---
PROGNOSI	kernicterus	variabile	benigna

Tabella : Classificazione genetica e clinica delle forme di iperbilirubinemia nell'uomo.

LA DIAGNOSI

Le ormai note conoscenze sulla genetica e sulla clinica sono sufficienti per diagnosticare un individuo affetto dalla sindrome di Crigler Najjar: la concentrazione diretta, indiretta e totale di bilirubina sierica, la presenza di glicuronidi nella bile, la risposta al fenobarbitale sono i parametri clinici prescelti per la diagnosi, da completare con uno studio di funzionalità del fegato tramite biopsia tissutale e con l'analisi genetica per classificare correttamente il paziente.

La severità della sindrome potrebbe giustificare, in alcuni casi, la proposta di una diagnosi prenatale: l'attività di UGT1A1 non è valutabile nei tessuti fetali poiché assopita sino a diversi giorni dopo la nascita: l'unico modo rimane l'analisi genetica diretta, specifica caso per caso.

IL MODELLO ANIMALE

L'esistenza di un modello animale per la sindrome di Crigler Najjar tipo I ha dato modo, in questi anni, di studiare l'impatto degli elevati livelli di bilirubina sierica non-coniugata sull'encefalo e, inoltre, di avere una cavia di laboratorio su cui esaminare i molteplici effetti prodotti da metodiche terapeutiche innovative ma rischiose per la salute dell'uomo.

Fino ad oggi, tutti gli studi preclinici in vivo sono stati condotti sul *ratto Gunn*, un mutante spontaneo del ceppo Wistar. I ratti Gunn sono inbred (geneticamente omogenei), per avere una migliore riproducibilità dei dati in laboratorio. La mutazione nel gene UDP-GT è rappresentata dalla delezione di una guanina al nucleotide 1206: si genera così un codone di stop, che previene la sintesi di una proteina funzionale. Anche nel ratto Gunn, così come nel malato Crigler Najjar tipo I, si ha iperbilirubinemia, con una concentrazione di bilirubina sierica totale che nel ratto supera i 5 mg/dl ovvero i 100 $\mu\text{mol/L}$: tale accumulo, però, non ha alcun impatto sulla morbilità neonatale, sull'abilità riproduttiva, sulla durata media della vita del roditore.



Figura: Il ratto Gunn e il topo $Ugt1^{-/-}$.

Tratta da <http://it.geocities.com/criglernajjar/> (sinistra) e da Nguyen et al, 2008 (destra).

Recentemente, un gruppo americano è riuscito ad ottenere in laboratorio, con le tecniche di knock-out, un modello murino per la sindrome di Crigler Najjar, rendendo non-funzionale l'esone 4 del topo, generando così un animale $Ugt1^{-/-}$. Questo ulteriore modello sarebbe potuto essere molto utile vista la sua migliore maneggevolezza negli stabulari e soprattutto perché l'omologia genetica topo-uomo è sicuramente maggiore rispetto a ratto-uomo, andando così a generare risultati più riconducibili ad una futura applicazione in clinica. Il *topo* $Ugt1^{-/-}$ ha manifestato però un fenotipo decisamente diverso dal ratto Gunn, non tanto per il valore di bilirubina sierica totale che oscillava tra 8-10 mg/dl, ma principalmente perché sviluppava una encefalopatia letale entro pochi giorni dalla nascita, rendendolo un modello purtroppo difficilmente utilizzabile. (Nguyen et al, 2008)

TERAPIA CONVENZIONALE

Per i malati Crigler Najjar tipo I al momento non esiste una cura; esistono soltanto degli approcci terapeutici mirati a ridurre la concentrazione sierica di bilirubina totale.

Fototerapia

La fototerapia è il gold standard per il trattamento della sindrome di Crigler Najjar: si basa sul fatto che, se irradiata da una particolare lunghezza d'onda (425-475 nm), la molecola di bilirubina può andare incontro a modificazioni configurazionali trasformandosi in isomeri che possono venir escreti nella bile senza necessità di coniugazione (lumirubina).

La degradazione dell'emoglobina nel corpo, infatti, rilascia una molecola di bilirubina nell'isomero Z,Z (bilirubina fisiologica non-coniugata, indiretta, liposolubile). La fototerapia permette la trasformazione di tale isomero in un nuovo isomero configurazionale (isomero E,E) mediante la rottura dei legami idrogeno interni e la conseguente rotazione dei doppi legami, dando origine ad una molecola polare ma soprattutto idrosolubile. Durante la fototerapia, in realtà, si formano una serie di isomeri configurazionali per la molecola di bilirubina, aventi il seguente foto-equilibrio: 4Z,15Z>4E,15Z>4Z,15E>4E,15E; si evince così che la foto-bilirubina (lumirubina) non è altro che una mistura di composti, tra cui l'isomero E,E ne rappresenta la forma più stabile. (McDonagh et al, 1980)

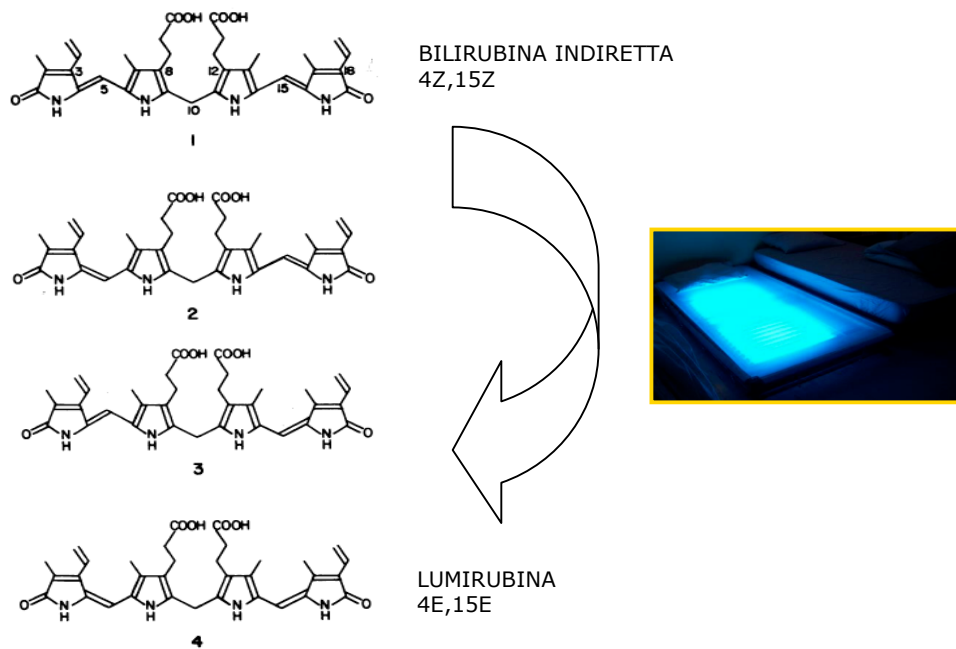


Figura : La fototerapia: formazione degli isomeri configurazionali della bilirubina nel corpo.
Tratta da McDonagh et al, 1980.

La bilirubina fisiologica non-coniugata complessata all'albumina è trasportata attraverso il sangue dai distretti epatici in tutta la periferia del corpo, raggiungendo anche la pelle. Durante l'azione della fototerapia essa viene convertita in lumirubina che, essendo idrosolubile, può entrare nel circolo sanguigno, raggiungere il polo biliare dell'epatocita e qui essere escreta. La bilirubina eliminata verrà rimpiazzata nelle pelle da altra bilirubina fisiologica non-coniugata proveniente dal sangue: ne consegue una riduzione nella concentrazione di bilirubina circolante

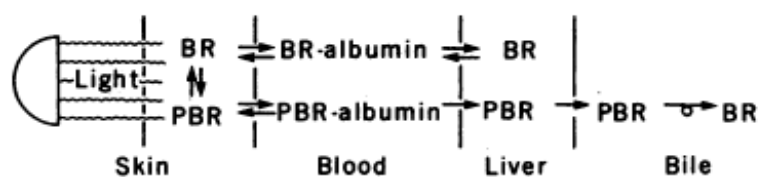


Figura : Il meccanismo di escrezione della bilirubina durante la fototerapia.
Tratta da McDonagh et al, 1980.

Per mantenere i livelli di bilirubina fisiologica indiretta liposolubile in un range di sicurezza e dunque evitare il kernicterus, i pazienti Crigler Najjar devono quotidianamente sottoporsi a sedute di fototerapia (neon F40BB-TL52, Philips) della durata media di 8-10 ore. Ovviamente, la durata delle sedute dovrà essere intensificata sia nel caso in cui occorranza infezioni, sia quando si verificano eventi che aumentano la produzione di bilirubina endogena, come l'emolisi o la gravidanza, sia se vengono somministrati farmaci che spiazzano il legame bilirubina-albumina.

Purtroppo, questa terapia tende ad essere meno efficace con l'aumento dell'età del paziente, a causa del progressivo ridursi del rapporto tra la superficie corporea esposta alla luce e la massa corporea. Altri fattori che ne diminuiscono l'efficacia sono l'ispessimento della pelle, l'aumento della pigmentazione e le variazioni ormonali post-puberale. Da non sottovalutare che, inoltre, una fototerapia prolungata nel tempo può rendere fragile la pelle, provocando lesioni cutanee secondarie ed aumentando così il rischio di infezioni.

Malgrado lo stile di vita qualitativamente ridotto che i pazienti Crigler Najjar tipo I si trovano ad avere bisogna tenere ben presente che, se prima dell'avvento della fototerapia l'aspettativa di vita era di qualche mese, ora si è certamente prolungata, anche se risulta difficile fare una prognosi a lungo termine.

Farmaci

Altri trattamenti quali la somministrazione di agar, di colestiramina, di calcio fosfato, di carbone attivato e di inibitori delle lipasi (Orlistat) sono stati proposti al fine di ridurre la circolazione entero-epatica di bilirubina. L'efficacia, tuttavia, appare essere alquanto ridotta.

Plasmaferesi

Questa procedura viene soprattutto utilizzata per ridurre i livelli di iperbilirubinemia in fase acuta. Si basa sul fatto che la bilirubina nel sangue è associata con l'albumina plasmatica. Quindi, la rimozione di albumina comporta anche la rimozione di bilirubina non coniugata. Al paziente viene estratto il sangue intero da una vena dell'avambraccio: immesso in un circuito sterile con un processo di centrifugazione e filtrazione lo si separa, consentendo la raccolta del plasma. Le componenti cellulari del sangue vengono quindi ritrasfuse al paziente.

Infusioni di Albumina

Anche in questo caso, la procedura è mirata a tamponare i picchi bilirubinemici in fase acuta: l'infusione di albumina viene normalmente effettuata in ospedale (1gr/1kg peso corporeo) e permette di riportare rapidamente il rapporto bilirubina/albumina sotto la soglia di 0.6, range di ormai comprovata sicurezza.

Trapianto di Fegato

Al momento il trapianto di fegato rappresenta l'unica alternativa per i pazienti Crigler Najjar desiderosi di abbandonare la fototerapia. Ad oggi, esistono due tipologie di trapianto: il

Trapianto Ortotopico di Fegato (OLT) è la sostituzione completa dell'organo ed ovviamente richiede la terapia immunosoppressiva per tutta la vita, dando talvolta fenomeni di fibrosi e, nei casi peggiori, rigetto. Il *Trapianto Ausiliare di Fegato* (Split Liver) è invece una procedura chirurgica decisamente più complessa, che permette di mantenere l'organo di origine ed affiancarvi un pezzo di fegato estraneo: l'enorme vantaggio di mantenere l'organo natio come 'paracadute di salvataggio' si scontra con la necessità di una terapia immunosoppressiva, una possibile atrofia dell'organo ospite e un fenomeno di rigetto difficilmente diagnosticabile.

Ai rischi notevoli della procedura chirurgica e dell'immunosoppressione a vita, si sommano sia le problematiche di ripperimento di un organo compatibile nel breve periodo che dubbi etici, ricordando che la sindrome di Crigler Najjar è una patologia monogenica e che il trapianto di fegato andrebbe a sostituire un intero organo, per il resto sano. (Lysy et al, 2008)

TRATTAMENTI INNOVATIVI

Il gold standard abbracciato dai pazienti affetti è una terapia che tende ad essere meno efficace con l'aumento dell'età del paziente e, per di più, ne riduce enormemente la qualità di vita: la sindrome di Crigler Najjar tipo I può perciò essere considerata come prototipo per lo studio di trattamenti innovativi al fine di migliorare o curare i disordini metabolici del fegato, in quanto sarebbe sufficiente ristabilire circa il 15% di massa epatica funzionale per raggiungere una completa normalizzazione dei livelli serici di bilirubina.

Esistono due grandi classi racchiuse nel capitolo dei trattamenti innovativi per la cura di un disordine genetico: la *terapia cellulare* prevede la somministrazione diretta di cellule allogene non trattate e comporta la continua somministrazione di farmaci immunodepressivi per tutta la durata del trattamento e oltre; la *terapia genica* prevede l'inserzione di un transgene nelle cellule eucariotiche di un individuo mediante metodiche non virali (i.e. Transfezione: calcio fosfato; nanoparticelle; polimeri cationici; liposomi) o mediante metodiche virali (i.e. Transduzione: vettori virali; batteriofagi) ed è caratterizzata dall'aver una diversa tossicità ma anche una differente efficienza a seconda della metodica di correzione prescelta.

Terapia Cellulare

Per le malattie metaboliche ereditarie del fegato una alternativa all'OLT può essere la terapia cellulare, come il *trapianto di epatociti allogeici*: è una tecnica meno invasiva, con minori rischi di mortalità e minori costi per le istituzioni. Tuttavia, essendo ancora un trattamento del tutto sperimentale, questo approccio è limitato sia dalla scarsa disponibilità di epatociti umani non crio-preserved (poiché non sembra etico sottrarre materiale biologico sano con liste di attesa così lunghe), sia dal fatto che la correzione del difetto ottenuta è limitata nel tempo (visto che le cellule utilizzate sono epatociti terminalmente differenziati con una limitata capacità riproduttiva).

Una valida alternativa è il trapianto di cellule staminali o precursori cellulari in grado di differenziarsi in cellule mature: tali cellule possono essere isolate da fonti molteplici.

In particolare, le *cellule staminali embrionali allogeniche* si possono isolare da feto abortito, placenta, cordone ombelicale e sono cellule caratterizzate da un alto grado di pluripotenza, rigetto e tumorigenicità; le *cellule staminali adulte autologhe* si possono isolare da numerosi tessuti ed organi per tutta l'intera vita di un individuo e sono cellule che garantiscono una terapia cellulare più sicura, ma porteranno appresso i difetti genetici propri dell'individuo da cui derivano.

CELLULE	DOSE	RIPOPOLAMENTO	ANIMALE	AUTORE	RIVISTA
Epatociti congelati	2.6 billion	8.6%	C.N. tipo I	Lysy et al.	WJG, 2008
Epatociti immortalizzati	5x10 ⁶	80%	ratto Gunn	Kawashita et al.	JHep, 2008
Epcam ⁻ hPRs	15x10 ⁶	N.D.	C.N. tipo I	Khan et al.	Transproceed, 2008
B ₂ m ⁱ /Thy1 ⁺ BMDCs	10x10 ⁶	7%	ratto Gunn	Muraca et al.	Gut, 2007

Tabella : Tentativi di terapia cellulare per la sindrome di Crigler Najjar tipo I.

In letteratura sono descritti alcuni tentativi di trattamento cellulare per la sindrome di Crigler Najjar, alcuni dei quali sperimentati direttamente sull'uomo. La loro variabilità è notevole, sia in termini di cellula prescelta, sia nella dose da somministrare, sia nella percentuale di ripopolamento della massa epatica totale ottenuta. Purtroppo, in tutti i casi, il trattamento sperimentale non è sufficiente per evitare la fototerapia e, per di più, è affiancato costantemente dall'immunosoppressione. Rimane dunque irrisolto il dilemma di quale sia il beneficio di questo genere di trattamento.

Terapia Genica in vivo

La terapia genica in vivo, cioè la diretta somministrazione nel corpo di un costrutto capace di racchiudere al suo interno almeno una copia di un gene di interesse, è un trattamento innovativo per tutte quelle patologie genetiche che richiedono solo una parziale correzione del difetto, per godere di un beneficio clinico. Un grosso numero di tecniche virali e non sono state sperimentate sul ratto Gunn negli ultimi decenni, ma soltanto le prime sono state in grado di risaltare un visibile miglioramento della concentrazione serica di bilirubina nel lungo periodo e dunque meritano un approfondimento.

I vettori virali (integranti o episomali) utilizzati nella terapia genica in vivo per la sindrome di Crigler Najjar vengono somministrati nel circolo sanguigno, attraverso la vena porta: le particelle virali trasportate sino ai sinusoidi epatici attraversano le fenestrazioni endoteliali di circa 100nm e raggiungono così l'epatocita che verrà poi transdotto. Poiché UGT1A1 è una proteina intracellulare e la sua funzionalità potrebbe raggiungere in qualche modo la saturazione, la percentuale di epatociti transdotti durante il trattamento costituirà il fattore principe per valutarne l'efficacia.

Aumentando l'efficienza di transduzione del vettore si ridurrà non solo la dose terapeutica da somministrare, ma soprattutto la quantità di proteina immunogena iniettata (il paziente CN infatti ha una minima se non nulla produzione di enzima, che dunque verrà riconosciuta come

proteina not self), andando così a limitare ulteriormente la risposta immunitaria citotossica, dannosa poiché in grado di eliminare gli epatociti corretti.

VETTORE	DOSE	TRANSDUZIONE	ANIMALE	AUTORE	RIVISTA
RV-LTR-UGT1A1	1x10 ⁸	<10%	ratto Gunn	Privato et al.	Hepatology, 2005
LV-mTTR-UGT1A1	5x10 ⁸	40%	ratto Gunn	Nguyen et al.	MolTherapy, 2005
AAV-Alb-UGT1A1	3x10 ¹¹	<1%	ratto Gunn	Seppen et al.	MolTherapy, 2006
HdAD-Pepck-UGT1A1	3x10 ¹²	ND	ratto Gunn	Toietta et al.	PNAS, 2005
HdAD-Pepck-aFP	1x10 ¹¹	ND	babbuino	Brunetti et al.	MolTherapy, 2007

Tabella : Trattamenti di terapia genica in vivo per la sindrome di Crigler Najjar tipo I.

In letteratura sono descritti interessanti tentativi per trattare la sindrome di Crigler Najjar con metodiche di terapia genica in vivo, ognuno dei quali è stato sperimentato sul ratto Gunn, ma ad oggi nessun trial clinico è stato condotto sull'uomo. A prescindere da quale vettore virale viene utilizzato, infatti, esistono molteplici rischi in grado di ledere indelebilmente la salute del paziente: tossicità acuta portata da una disseminazione sistemica del vettore; possibile integrazione incontrollata per i vettori retro-lentivirali; possibile diluizione episomale con perdita dell'effetto nel lungo periodo per i vettori adeno-associati o helper-dipendent; risposta immunitaria citotossica verso gli epatociti corretti con conseguente produzione anticorpale anti-UGT1A1, che implicherà un'eventuale immunosoppressione e complicherà ulteriormente una seconda somministrazione del vettore.

Esistono alcuni escamotage per ridurre la risposta immunitaria dell'ospite verso una proteina not self introdotta con tecniche di transduzione, come il rivestimento della particella virale con un cappuccio di zucchero (i.e. PEGhylazione): ciò permette una significativa espressione del transgene anche in animali già immunizzati verso il capsido virale, riduce la risposta immunitaria innata e l'epatotossicità, ma può indurre la tolleranza verso virus esogeni e dunque aumentare le infezioni. (Croyle et al, 2005)

Alla luce di tutti questi aspetti rimane rischiosa la scelta di lasciare una terapia convenzionale consolidata che riduce la qualità di vita ma ne contiene i rischi, andando ad abbracciare come alternativa un approccio sperimentale non privo di incertezze.

Terapia Genica ex vivo

Quando la terapia cellulare sposa la terapia genica nasce la terapia genica ex vivo: una cellula staminale adulta autologa viene geneticamente corretta in vitro mediante l'utilizzo di vettori virali: ciò comporta la risoluzione del difetto genetico evitando però sia il fardello dell'immunosoppressione legata all'infusione di cellule allogeniche, sia i rischi di tossicità legati alla somministrazione sistemica del vettore virale.

L'approccio di terapia genica ex vivo nella sindrome di Crigler Najjar tipo I, usata come prototipo nel raggiungere un trattamento innovativo, prevede innanzitutto la scelta della cellula staminale adulta autologa migliore per la cura di un disordine epatico con origine epiteliale; in aggiunta, sarà necessario definire quale sia il trattamento di correzione genica ex vivo più sicuro e al tempo stesso più duraturo.

LA RIGENERAZIONE DEL FEGATO

Il fegato è l'organo più complesso del corpo umano: gioca un ruolo fondamentale nel catabolismo di sostanze esogene ed endogene, attiva vie metaboliche per la riserva di energia, sintetizza le proteine del plasma ed ha un ruolo attivo negli steps di de-tossificazione. Il fegato è uno dei pochi organi interni del nostro corpo capace di rigenerarsi naturalmente: è sufficiente una massa di tessuto ospite minore del 25% per indurre una rigenerazione completa dell'organo. Questa tremenda capacità rigenerativa del fegato era già nota molti secoli fa: nella mitologia greca, infatti, il mito di Prometeo narra che il dio del fuoco, per aver svelato tale segreto agli uomini, fu punito, incatenato ad una roccia dove, ogni giorno, un'aquila si cibava del suo fegato, che però magicamente durante la notte rigenerava...

Al giorno d'oggi tante sono le cause che costringono il fegato ad un'innata rigenerazione: alcohol, virus e disordini genetici possono continuamente esporre l'organo a sfide proliferative, mettendo ripetutamente alla prova la sua capacità di "organo staminale". Normalmente, il turnover degli epatociti nel fegato è lento: il life-span fisiologico ne prevede la morte dopo mesi; se si verifica un danno epatico di lieve entità, le cellule differenziate mature del fegato (epatociti e colangiociti) riescono da sole a proliferare e a colmare il danno; quando, però, si verifica un danno epatico di maggiore entità, il solo parenchima non è più sufficiente alla completa rigenerazione: entrano in gioco le cellule progenitrici parzialmente immature ed indifferenziate (*Hepatic Progenitor Cells*, HPCs) che si attivano nel ripopolamento epatico con un ordine di grandezza proporzionale al tipo di danno, dando origine alla "reazione duttale".

Nel fegato, infatti, le HPCs si localizzano nei dotti di Hering e si pensa siano circoscritte all'interno di una nicchia staminale: un microambiente specifico del tessuto dove risiedono le cellule staminali per un periodo indefinito, fino a quando non si attivano nel processo di rigenerazione epatica. I progenitori epatici sono piccole cellule indifferenziate con origine epiteliale, che giacciono in stretto contatto sia con gli epatociti che con i colangiociti, dando forma ad una struttura 'duct-like': questa posizione anatomica di interfaccia tra il parenchima e l'albero biliare è anche il sito di localizzazione degli epatoblasti fetali bipotenti durante l'organogenesi. L'abilità della cellula staminale a rimanere nello stato indifferenziato piuttosto che proliferare e dare origine a cellule epiteliali mature dipende soprattutto dalla produzione di fattori di crescita e citochine secreti dagli altri componenti del microambiente.

Da qui, l'importanza di studiare e capire la complessa rete dei mediatori biologici che costituiscono la nicchia staminale: cellule endoteliali, mio-fibroblasti e macrofagi hanno origine midollare, sono circondati da matrice extracellulare e sono coinvolti nei processi di deposito e rimodellamento della cicatrice fibrotica, nel rilascio di fattori solubili e nella regolazione del processo proliferativo. E' chiaro dunque che la regolazione della nicchia epatica ha un margine molto sottile: l'innata capacità staminale rigenerativa del fegato può avere un culmine negativo in termini di fibrosi e cancerogenesi, se risulta a lungo iperstimolata. (Alison et al, 2001) (Preston et al, 2002) (Shafritz et al, 2006)

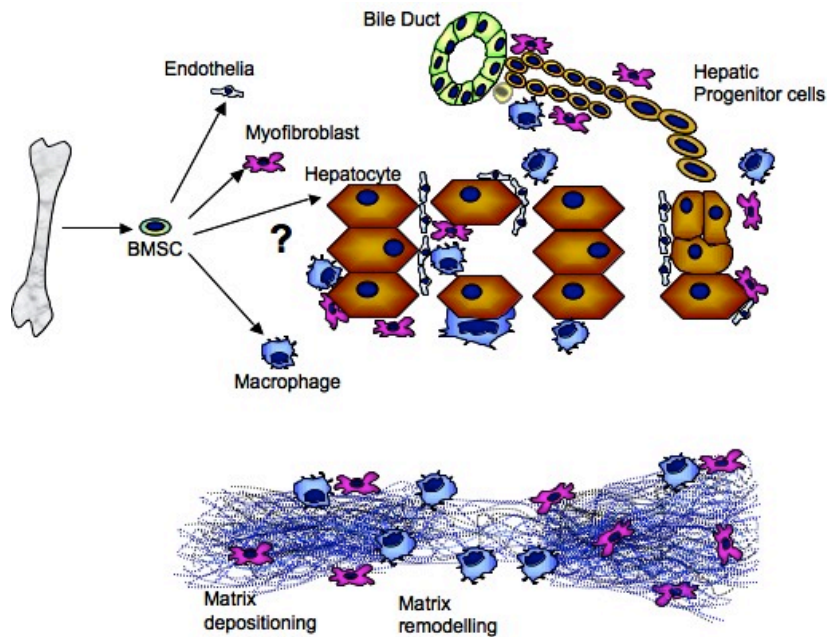


Figura : La nicchia staminale del fegato: HPCs originano epatociti e colangiociti. Le cellule del midollo osseo (Bone Marrow Derived Cells, BMDCs) sono i precursori di diverse cellule non-parenchimali, ma il loro ruolo nella rigenerazione del parenchima epatico appare essere minimo.
Modificata da Bird et al, 2008.

L'estesa conoscenza sulla capacità rigenerativa innata del fegato ha indotto a pensare che, per un disordine epatico cronico, la terapia cellulare sia lo strumento terapeutico migliore: l'ostacolo più ingombrante era decidere quale fosse la cellula staminale più adatta.

Le cellule staminali del midollo osseo (BMDCs) sono state intensivamente investigate come risorsa di potenziale staminale verso il fegato e dunque in grado di portare un beneficio rigenerativo ad un tessuto cirrotico: se alcuni lavori manifestano un loro possibile contributo alla popolazione epatocitaria matura (Petersen et al, 1999) (Lagasse et al, 2000) altri attestano che il loro ruolo nella rigenerazione del fegato è tutt'altro che significativo e soprattutto causato da processi di fusione cellulare piuttosto che di differenziamento. (Wang et al, 2003) Esistono inoltre trial clinici sull'uomo che vanno ad investigare l'effetto delle BMDCs in vivo: la mobilizzazione di cellule autologhe $CD34^+$ $CD133^+$ dal sangue periferico di un paziente cirrotico mediante somministrazione di un fattore di crescita ha portato un lieve miglioramento delle funzioni epatiche in meno della metà degli individui arruolati nel trial ma, quel che è peggio, in quasi tutti ha causato la formazione di emboli nella vena porta. (Gaia et al, 2006)

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) possono derivare da diversi tessuti ed hanno la comprovata abilità di differenziare in osteoblasti, condrociti ed adipociti. Ci sono ad oggi diversi studi capaci di dimostrare che le MSCs, se opportunamente coltivate in vitro con fattori di crescita e citochine, possono differenziare in cellule 'hepatocyte-like' aventi morfologia e proprietà di secrezione molto simili agli epatociti maturi. (Lee et al, 2004) Purtroppo però, pensando ad una futura terapia cellulare, può essere molto rischioso affidarsi a cellule il cui fenotipo è legato non solo ai processi di coltura e differenziamento in vitro, ma anche all'ambiente del fegato ospite al momento dell'infusione. In aggiunta, si è visto che le cellule staminali mesenchimali trapiantate in un topo NOD-SCID con danno epatico cronico danno

origine a mio-fibroblasti con una frequenza di almeno dieci volte maggiore rispetto al differenziamento in epatociti: i mio-fibroblasti epatici di derivazione midollare in realtà originano da cellule staminali mesenchimali e contribuiscono funzionalmente alla fibrosi del fegato. (Russo et al, 2006) Il rimodellamento della cicatrice fibrotica è opera della controparte macrofagica: nel danno infiammatorio progressivo, quando anche i mio-fibroblasti proliferano, le cellule del Kupffer hanno un ruolo fibrogenico; durante la risoluzione della cicatrice, però, sono i soli macrofagi ad essere attivati nel processo di rimodellamento. (Duffield et al, 2005)

Rimane dunque aperto il dilemma di quale sia la cellula staminale migliore da utilizzare per la cura di un disordine epatico cronico e, soprattutto, rimane viva l'esigenza di identificare ed isolare nell'uomo le "vere" cellule staminali del fegato (HPCs). (Forbes, 2008)

PROGENITORI STAMINALI EPATICI NEL RODITORE

Le cellule ovali (*Oval Cells*, OCs) nel roditore sono il corrispettivo dei precursori staminali epatici nell'uomo: sono piccole cellule con forma ovoidale che si visualizzano nell'interfaccia tra parenchima ed albero biliare soltanto quando il fegato è in una grave fase di danno. L'identificazione e l'isolamento di cellule ovali nel roditore richiede dunque un modello animale con danno epatico consistente: ad oggi, si conoscono alcune strategie per aumentare la produzione di cellule ovali nell'animale, tutte basate su una prima somministrazione di un composto tossico per gli epatociti endogeni (2-AAF; Retrorsina) ed un successivo evento stimolante la proliferazione d'organo (epatectomia parziale; CCl₄). Molto usate sono anche le diete (*Choline-Deficient Ethionine-supplemented*, CDE; *Diethoxycarbonyl-DihydroCollidine-supplemented*, DDC), più rapide rispetto ai cocktail precedenti, poichè permettono di registrare un valido aumento di cellule ovali in poche settimane di trattamento. (Bird et al, 2008)

	POSITION	EXPRESSION	FUNCTION
CD133	EC	ESCs; HSCs; developing Epithelium	Not known; Glycoprotein
NOPE	EC	Fetal liver / stem progenitor cells	Homotypic cell-cell contact
CD24a	EC	B cells; Granulocytes; Hepatoblasts	Differentiation; Sialoglycoprotein
MUC1	EC	Epithelium; immature Cholangiocytes	Pathogens protection; Cell signalling
ROS1	EC	Tumor cell lines; Oval cells (?)	Growth / differentiation factor receptor
Cldn7	EC	Epithelial cells	Tight junctions
Cdh22	EC	Epithelial tissue; Hepatoblasts	Calcium dipendent cell adhesion
DLK1	EC	Neuronal cells; fetal Liver	Differentiation / transduction pathway
Liv2	EC	Hepatoblasts / fetal Liver	Hepatic development
EpCAM	EC	Epithelial cells / Carcinomas	Cellular adhesion / polarity
CD44	EC	HSCs; MSCs; epithelial cells	Migration; cell-cell interactions
BMP7	IC	Liver regeneration	Guardian of epithelial phenotype
CD49f	EC	Immature / epithelial cells	Cells signalling / adhesion
Glypican3	EC	Endoderma development	Growth / differentiation pathways
cMet	EC	HSCs; Epithelial cells; Hepatocytes	Liver regeneration; HGF receptor
Sca1	EC	"Tissue-resident progenitor cells"	Cell-cell interaction (?)

	POSITION	EXPRESSION	FUNCTION
Thy1	EC	HSCs; MSCs; Myofibroblasts	Interactions; GPI anchored protein
cKit	EC	HSCs; other cells types	SCF receptor; proto-oncogene
ABCG2	IC	Side population (SP) cells	Drugs transporter
CD34	EC	Hematopoietic / endothelial progenitor	Stem cell-stroma attachment
CD45	EC	HSCs; Leukocytes; NO erythrocytes	PTP receptor for cellular pathways
aFP	IC	Fetal liver; tumors; pregnancy	Fetus: estradiol binding
Alb	serum	Blood plasma protein	Carrier; blood volume stabilizer
CK7 / CK19	IC	Cholangiocytes; biliary ducts	Structural integrity
CK8 / CK18	IC	Mature hepatocytes	Structural integrity
PanCK	IC	Epithelial cells	Development / differentiation
HNF4a	IC	Embryonal tissues; fetal Liver	Liver development; gene transcription
SOX17	IC	Transient Amplifying (TA) cells	Cell fate determination; development
GFAP	IC	Astrocytes; Stellate cells	Cellular shape; mechanical strength
aSMA	IC	Myofibroblasts	Motility; muscle contraction
Desmin	IC	Muscle tissues; Myofibroblasts	Motility; muscle contraction
Vimentin	IC	Mesenchymal tissue; Fibroblasts	Cytoplasm integrity; cell shape
Laminin	EM	Basement membrane	Molecular transduction substrate
Collagen I/IV	EM	Basement membrane	Molecular transduction substrate
GAPDH	IC	Glycolytic cells	Reference gene in PCR

Tabella : I marcatori utilizzati per l'isolamento della cellula staminale adulta del fegato.
 ESCs: Embrionic Stem Cells; HSCs: Hematopoietic Stem Cells; MSCs: Mesenchymal Stem Cells.

Oltre alla scelta del modello animale più adatto per incrementare il numero di cellule attivate durante il processo di rigenerazione epatica, il passaggio più critico nell'identificare le cellule ovali è certamente la scelta dei marcatori extracellulari (EC) ed intracellulari (IC) da usare nell'isolamento. In letteratura sono stati pubblicati numerosi studi aventi però risultati contrastanti, forse sensibili alla diversa scelta di modello animale, alla differente tipologia di tessuto (fetale o adulto) e soprattutto riconducibili ai molteplici marcatori analizzati.

Tra questi, aFP, NOPE, CD133, Dlk1, CD24a, EpCAM, Liv2, Sca1, CD44, cMet, PanCK sono marcatori per cellule aventi una origine epiteliale: possono caratterizzare sia cellule unipotenti con capacità proliferative modeste (ad amplificazione transiente, TA) sia cellule quiescenti multipotenti (progenitori, PR) e sono dunque i marcatori più usati nello studio delle cellule ovali. (Yovchev et al, 2007) (Nierhoff et al, 2007) (Rountree et al, 2007) (Yovchev et al, 2008) Durante il processo di isolamento alcune popolazioni potrebbero contaminare la controparte staminale epatica: sarà importante escludere nella purificazione epatociti (Alb^+ , $CK8^+$, $CK18^+$), colangiociti ($CK7^+$, $CK19^+$) e cellule staminali ematopoietiche ($c-Kit^+$, $CD45^+$, $Thy1^+$, $CD34^+$).

Ad oggi, l'unica certezza che rimane è che gli epatociti e le cellule epiteliali del dotto biliare hanno origine embrionale comune: l'ipotesi più accreditata è che anche gli epatociti derivino dai precursori epiteliali localizzati nei dotti biliari intra-epatici. (Oertel e Shafritz, 2008)

LA RIGENERAZIONE DELL'EPIDERMIDE

La pelle è il più vasto organo del corpo umano e ne ricopre tutta la porzione esterna, svolgendo funzioni vitali come barriera anatomica per la protezione da agenti esogeni, per il mantenimento della temperatura corporea e dell'equilibrio idro-dinamico, per percepire sensazioni.

L'epidermide, lo strato più esterno della pelle, consiste in un epitelio squamoso stratificato composto principalmente da cheratinociti. Il cheratinocita forma strati cellulari distinti. Lo strato basale è la fonte di cellule staminali epiteliali ed è composto da cheratinociti aventi una tremenda capacità proliferativa: tali cellule sono in grado di dividersi e dare origine ad altri progenitori epiteliali, ma anche a cellule ad amplificazione transiente, che differenzieranno in tipi cellulari più specializzati. Le cellule basali che vanno incontro a differenziamento terminale perdono la loro capacità proliferativa, migrano verso l'alto ed iniziano un processo di morte cellulare programmata, portando alla successiva formazione dello strato spinoso, strato granuloso e strato corneo.

I cheratinociti primari umani si isolano in coltura da biopsie di pelle e, crescendo, formano colonie: ogni colonia sarà la progenie di un singolo cheratinocita basale clonogenico. Le colonie di cheratinociti potranno fondersi tra loro, differenziare, e dare così origine ad un epitelio squamoso stratificato, utilizzato ormai da anni in clinica per allestire innesti di epidermide autologa in coltura. Infatti, da una biopsia di pelle di 1cm^2 possono essere prodotti più di un milione di innesti, sufficienti per coprire interamente più di 10.000 esseri umani o per trattare centinaia di migliaia di ulcere croniche o più semplicemente per curare ustioni. L'innesto di cellule staminali epiteliali, piuttosto che di cellule terminalmente differenziate, garantisce la persistenza dell'epidermide rigenerata durante l'intera vita del paziente. (Pellegrini e De Luca, 2009)

CELLULE STAMINALI EPITELIALI NELL'UOMO

I cheratinociti basali dell'epidermide vantano sia un potenziale clonogenico (i.e. possibilità di generare una colonia) sia un potenziale di crescita (i.e. capacità di automantenersi nel tempo). Attraverso l'analisi clonale è stato possibile identificare ed isolare nell'epidermide umana tre tipi di cheratinociti, aventi diverse capacità di moltiplicazione:

- gli *Olocloni* formano ampie colonie con perimetro regolare ($1-2 \times 10^5$ cells per ogni colonia, dopo circa 14 giorni di coltura) e le cellule che le compongono sono $\Delta\text{Np63}\alpha^+/\text{Involucrina}^-$. Gli olocloni hanno una tremenda capacità proliferativa, infatti un singolo oloclone può dare origine a circa 140 cell-doublings e può generare più di 1×10^{40} progenie aventi solo lo 0-5% di colonie terminali (i.e. sufficiente epitelio per ricoprire più volte il corpo di un adulto, la cui epidermide contiene approssimativamente 8×10^{10} cheratinociti in 2m^2 circa)
- i *Paracloni* formano piccole colonie a bordo irregolare aventi cellule $\Delta\text{Np63}\alpha^-/\text{Involucrina}^+$. Il paraclone, che è generato da una cellula ad amplificazione transiente, ha un potenziale di crescita limitato ad un massimo di 15 cell-doublings ed è in grado di generare 3×10^4 progenie aventi più del 95% di colonie terminali e capaci di coprire un'area di soli 16mm^2

- i *Merocloni* sono un tipo intermedio di cellula e sono considerati essere una riserva di cellule ad amplificazione transiente, aventi un quantitativo di colonie terminali compreso tra il 5% e il 95%.

La transizione da oloclone a meroclone a paraclone è un processo unidirezionale che avviene durante l'invecchiamento naturale così come durante il life-span dei cheratinociti in coltura. (De Luca e Pellegrini, 1997) (Pellegrini et al, 2001)

L'epidermide è completamente rinnovata ogni mese. Anche per questo motivo è necessario che, nella terapia genica ex vivo, vengano utilizzate le sole cellule staminali epiteliali, e non cellule ad amplificazione transiente, il cui effetto terminerà al momento del rinnovo cellulare. I cheratinociti umani sono facilmente coltivabili in vitro, producono generosi innesti che restano visibili dopo l'impianto permettendo un costante controllo per tutta la vita del paziente e, soprattutto, possono essere trasdotti stabilmente con vettori retro-lentivirali, aventi come transgene una proteina esogena che verrà prodotta proporzionalmente al numero di copie provirali integrate. (Mathor et al, 1996)

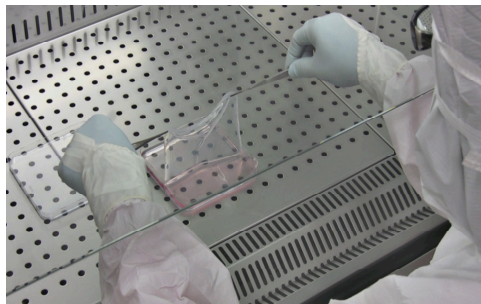


Figura : La crescita dei cheratinociti umani in coltura produce un lembo sterile di epidermide.
Tratta da <http://www.cmr.unimore.it/>

L'epidermolisi bollosa (EB) è un devastante disordine ereditario caratterizzato da difetti di adesione tra le cellule della pelle, producendo frequenti fenomeni di blistering. EB è classificata nelle forme 'semplice' (EBS), 'giunzionale' (JEB), 'distrofica' (DEB) a seconda del livello a cui la giunzione epidermide-derma è compromessa. Non esistono trattamenti definitivi per questa patologia ma ci si limita a controllare le infezioni e a mantenere uno stile di vita qualitativamente accettabile. (Pellegrini et al, 2009)

Il primo ed unico trial di terapia genica ex vivo per la JEB è stato recentemente condotto su di un unico paziente, prelevando cheratinociti basali autologhi dal palmo della mano e transducendoli con il vettore retrovirale MLV-derived, avente come transgene il cDNA di hLAMB3 sotto il controllo dell'LTR virale. Gli innesti di epitelio transdotto su alcune porzioni delle gambe non hanno sviluppato lesioni nei tre anni successivi al trattamento, a differenza di tutte le altre zone limitrofe non trattate. A rafforzare il dato clinico si affiancano numerosi studi di biologia molecolare che confermano la secrezione di eterotrimeri Laminina5, la formazione di emi-desmosomi e la restituzione della giunzione epidermide-derma. (Mavilio et al, 2006)

Si può dunque concludere che il trapianto di un lembo di epidermide autologa geneticamente modificata è fattibile, ben tollerato e porta ad una correzione funzionale a lungo termine per un difetto di adesione della pelle.

PROGETTO DI RICERCA

MATERIALI E METODI

PROGENITORI STAMINALI EPATICI NEL RODITORE

Animali

Abbiamo acquistato topi maschi C57Bl/6 dalla ditta Harlan, UK. Abbiamo condotto tutte le procedure sperimentali sull'animale seguendo i protocolli approvati da Edinburgh University Biological Safety Department e da UK Home Office. Dieta CDE: gli animali sono stati alimentati con una dieta deficiente in colina (MP biomedical) ed abbeverati sia ad acqua supplementata con 0.15% di etionina (concentrazione finale, Sigma) e sia ad una bevanda di concentrato di arancia per migliorare la tolleranza all'etionina. Gli animali sono stati mantenuti in dieta CDE fino a 4 settimane e monitorati giornalmente.

Isolamento di progenitori non-parenchimali adulti del fegato

Le cellule progenitrici non-parenchimali adulte del fegato sono state isolate da fegato di topo CDE (test) e da fegato di topo non trattato (ctr). La vitalità cellulare era > 96%.

Perfusion medium (Gibco) (+500µl Gentamicin 50mg/ml)

Digestion medium (L-15, Sigma) (+500µl Gentamicin 50mg/ml; +10ml L-Glutamine 200mM; +4.6µl Dexamethazone 4mg/ml; +50µl Insuline 1mg/ml; +20ml Hepes 1M; +4ml NaOH 1M)

Plating medium (250ml DMEM High Glucose (Gibco) and 250ml F10 HAM (Gibco); 10% hiFBS; +50µl Insuline 1mg/ml; +5ml Hidrocortisone 50µg/µl; +500µl Gentamicin 50mg/ml; +2.5ml Sodium Piruvate; +2.0µl 2-Mercaptoethanol 99%)

Per l'analisi al citofluorimetro e per la colorazione con Hoechst 33342, le cellule ovali sono state isolate da topi C57Bl/6 maschi di 4-6 settimane trattati e non trattati con dieta CDE. Il fegato è stato perfuso attraverso la vena cava toracica inferiore con il Perfusion medium per 5 minuti; a seguire il Digestion medium per 10 minuti. Per ogni fegato di topo è stata usata una soluzione di Digestion medium di 100ml, a cui sono stati aggiunti 25mg Collagenase type IV (Sigma-Aldrich) e 500µl DNaseI 10mg/ml (Roche). Il fegato è stato dissezionato in Plating medium e dissociato per filtrazione attraverso uno strainer cellulare di 40µm BD Falcon™ (BD Biosciences). La sospensione cellulare risultante è stata lavata in PBS/BSA1%, pellettata e risospesa in Plating medium arricchito con FBS al 10%.

Per la separazione MACS, le cellule ovali sono state isolate da topi C57Bl/6 maschi di 4-6 settimane trattati con dieta CDE. Il fegato è stato digerito ex vivo mediante omogenizzazione, raccolto in una falcon e lasciato in sospensione con Digestion medium a 37°C per 20 minuti. Si è aggiunto un quantitativo di FBS 10% rispetto al volume totale della falcon e dopo opportuni lavaggi, il pellet è stato risospeso in Plating medium. Le cellule ovali sono state purificate per centrifugazione attraverso un gradiente discontinuo di Percoll (Sigma) 20% e 50% in PBS a 1400g per 20 minuti a 4°C. Questo processo può produrre una banda spessa o due bande più sottili nella frazione di Percoll 20%. Queste bande sono state raccolte, trasferite ad un nuovo tubo ed una uguale aliquota di Plating medium è stata aggiunta. Le cellule sono state pellettate, lavate e risospese in PBS/BSA1% e lasciate in frigo o/n, con una vitalità > 94%.

Analisi al citofluorimetro e colorazione con Hoechst 33342

Le cellule ovali sono state isolate come precedentemente descritto. Abbiamo esaminato la popolazione cellulare SP (Side Population) identificata grazie all'abilità di poter escludere i coloranti come Hoechst 33342, in quanto capace di esprimere trasportatori proteici. Questo effetto può essere bloccato da Verapamil, un inibitore aspecifico del trasporto di membrana. Campioni di 6.0×10^4 cells/ml sono stati colorati con il colorante Hoechst 33342 (concentrazione finale di $5 \mu\text{g/ml}$) e incubati a 37°C per 90 minuti. Nelle reazioni di controllo, Verapamil (Sigma) è stato aggiunto ad una concentrazione finale di $50 \mu\text{g/ml}$. In seguito abbiamo analizzato i marcatori extracellulari cMet, CD133, CD45, Sca1. Ogni campione è stato incubato con siero normale di ratto 10% per 10 minuti e, dopo opportuni lavaggi, è stato incubato con l'anticorpo cMet FITC anti-mouse, 1:50 (eBioscience); con l'anticorpo Prominin I (CD133) PE anti-mouse, 1:50 (eBioscience); con l'anticorpo CD45 PerCP-Cy5.5 labelled anti-mouse, 1:400 (BD-Pharmigen); con l'anticorpo Sca1 APC anti-mouse, 1:1000 (eBioscience) per un'ora in ghiaccio. Gli anticorpi FITC rat IgG1 (eBioscience), PE rat IgG1 (eBioscience), PerCP labeled rat IgG2b (BD-Pharmigen), APC rat IgG2a (eBioscience) sono stati usati come controllo isotipico. Le cellule morte sono state escluse mediante propidium iodide (PI) gating. Dopo i lavaggi, le cellule sono state analizzate al FACSCalibur con il programma CellQuest (Becton Dickinson) o sono state raccolte con il sorting FACSVantage SE ed analizzate con il BD FACS DiVa softer (Becton Dickinson).

Immunofluorescenza

Sezioni congelate di $5 \mu\text{m}$ di un fegato di topo trattato o non trattato con dieta CDE sono state fissate per 10 minuti in metanolo freddo, lavate due volte con PBS e bloccate con siero normale di scimmia 5% per 30 minuti. Il tessuto è stato poi incubato con un singolo anticorpo: CD90 (Thy1) PE anti-mouse, 1:100 (eBioscience); Prominin I (CD133) PE anti-mouse, 1:50 (eBioscience); CD45 PerCP-Cy5.5 labelled anti-mouse, 1:100 (BD-Pharmigen); Sca1 APC anti-mouse, 1:100 (eBioscience) per 90 minuti; a seguire l'anticorpo secondario (Donkey anti-Rat, 488 fluorocrome, 1:250, Invitrogen) per un'ora. La visualizzazione dei nuclei è data dal Mounting Medium con DAPI. L'analisi delle colorazioni è stata effettuata con Axiovert Microscope (Axio Vision 4.6 program) e con Leica Confocal Microscope (LAS AF program).

Separazione tramite MACS

Le cellule ovali sono state isolate come precedentemente descritto. Abbiamo purificato le cellule ovali usando l'anticorpo CD45 PerCP-Cy5.5 labelled anti-mouse, 1:400 (BD-Pharmigen) e l'anticorpo Sca1 APC anti-mouse, 1:1000 (eBioscience). Abbiamo isolato le cellule CD45^+ con BD ImagTM Anti-Rat magnetic bead-conjugated immunoglobulin G (IgG) ed abbiamo isolato le cellule Sca1^+ con BD ImagTM Anti-APC magnetic bead-conjugated immunoglobulin G (IgG). Per la purificazione cellulare in colonna si seguono le istruzioni sul datasheet (BD Biosciences). La purezza delle popolazioni raccolte tramite MACS è stata analizzata al FACSCalibur (Becton Dickinson) mediante il programma CellQuest.

Reazione di RT-PCR

L'RNA totale cellulare è stato estratto usando il reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguendo le istruzioni sul datasheet e quantificato a 260nm. Il DNA complementare è stato sintetizzato usando la SuperscriptTM II RNase (Invitrogen) ed è stato amplificato usando primers specifici (progettati con il programma primer3plus) e Taq PCR (NewEngland, BioLabs). E' stato eseguito il seguente protocollo di amplificazione: 1 ciclo a 94°C per 5 minuti; 35 cicli a 94°C per 30 secondi, a temperatura di annealing primer-specifica per 30 secondi e a 72°C per 1 minuto; lo step di estensione finale è di 5 minuti a 72°C. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di Agarosio 1.5% e visualizzati con Saber Safe (Invitrogen) staining.

gene	Fwd primer	Rev primer	Ta	Mg ²⁺ 50mM	bp
AFP	5'-agcaggactgctcgaaacat-3'	5'-cttccggaacaaactgggta-3'	55	0.5 µl	232
Albumin	5'-gacaaggaaagctgcctgac-3'	5'-ttctgcaaagtcagcattgg-3'	55	0.5 µl	174
CD133	5'-gaaaagttgctctgcaacc-3'	5'-tctcaagctgaaaagcagca-3'	53	1.0 µl	196
CD24a	5'-gaaaggggcttggtctac-3'	5'-gtagctcgggtctgtgagc-3'	58	0.5 µl	208
CD45	5'-cctgctcctcaactcgac-3'	5'-gacacctctgtgccttagc-3'	58	0.5 µl	194
CK19	5'-tgctggatgagctgactctg-3'	5'-aatccacctccacactgacc-3'	56	0.0 µl	150
c-Met	5'-cgatcagcagctctgtgcatt-3'	5'-acagccggaagagtttctca-3'	56	1.0 µl	153
Dlk1	5'-tccaaaacctgtggccttac-3'	5'-gggtggacctgagacacct-3'	57	0.5 µl	208
GapDH	5'-aacttggcattgtggaagg-3'	5'-acacattggggtaggaaca-3'	55	1.0 µl	223
Muc1	5'-ggtagaccattctgccaact-3'	5'-tcctctgagagccaccact-3'	57	0.5 µl	236
NOPE	5'-ggtagcactactggacgatg-3'	5'-ccggactcgttacacttgt-3'	57	1.0 µl	244

Tabella : Sequenze dei primer murini per RT-PCR e condizioni di amplificazione.

CELLULE STAMINALI EPITELIALI NELL'UOMO

Isolamento di cellule staminali epiteliali da biopsia di pelle

Le biopsie di pelle umana sono state ottenute da donatori in salute, mediante consenso informato. La biopsia di pelle è stata velocemente immersa in EtOH 70%, lavata in dPBS (Gibco) e posizionata in una piastra da batteriologia per iniziarne la processazione. Il pezzo deve essere mantenuto umido con tripsina diluita (625519, Gibco) durante tutta la fase di pulizia, che certamente rappresenta la parte più critica della processazione: il derma ed il tessuto adiposo devono venire opportunamente rimossi, per evitare che le fibre del derma intrappolino i cheratinociti, ma bisogna anche evitare di ledere le papille dermiche, che sono la fonte primaria di staminali epiteliali.

Quando è rimasta la sola epidermide si procede con la misurazione del pezzo (per ogni cm² di tessuto ci si aspetta una resa di 1-4x10⁶ cells) e con la seguente omogeneizzazione del tessuto, usando le forbici. Il trito è stato raccolto e tripsinizzato ripetutamente (fino a cinque volte) su un agitatore magnetico a 37°C per 30 minuti. Ogni step prevede la raccolta del liquido (tripsina+cellule estratte) che deve essere inattivato da un ugual volume di terreno Kno (60ml DMEM (Gibco), 30ml F12 (Gibco), 10ml FBS (Gibco), 2ml Glu (Euroclone), 1ml P/S (Euroclone), 1ml Adenina (Calbiochem), 100µl T3 (Sigma), 100µl T.C. (Sigma), 100µl Insulina (Sigma), 200µl Idrocortisone (Calbiochem), per 100ml). Il liquido raccolto è stato poi centrifugato ed il pellet risospeso in terreno Kno fresco; è stata poi aggiunta nuova tripsina diluita al grumo cellulare nello stirrer, per procedere con l'estrazione.

Al termine le cellule estratte e risospese in Kno sono state opportunamente piastrate a densità primaria su feeder layer di cellule 3T3 letalmente irradiate e, nel contempo, sono state allestite due CFE (*Colony Forming Efficiency*) con 1000 cells ciascuna, per valutare la capacità clonogenica delle cellule estratte. In terza giornata è stato introdotto l'EGF (100µl, Austral Biologicals) (terreno Kc).

Il cambio di terreno Kc fresco alle colture è stato effettuato ogni 48 ore; le cellule sono state cresciute in incubatore a 36.5°C, 6.5% CO₂, umidità 96% per il loro intero life-span e sono state passate allo stadio di sub-confluenza, fino a quando non sono diventate senescenti.

Cellule

Oltre a cellule primarie umane epiteliali estratte attraverso la processazione di biopsie di pelle (*KCRM6*, addome; *KCRM7*, addome; *KCRM8*, mammella; K71, prepuzio) abbiamo lavorato con *FCRM8* (fibroblasti estratti dal derma della biopsia di mammella, cresciuti in terreno 3T3: 90ml DMEM (Gibco), 10ml CALF (Euroclone), 2ml Glu (Euroclone), 1ml P/S (Euroclone) per 100ml); con *Hek293T* (linea di rene umano embrionale, cresciuta in terreno 293T: P/S (Euroclone) 50X, Glu (Euroclone) 100X, FBS (Gibco) 8%, DMEM (Gibco) a volume di 500ml); con *HepG2* (linea di carcinoma epatico, non cresciute in coltura e gentilmente concesse dal dr.Toietta, IDI, Roma); con *LE763* (cheratinociti corneali, non cresciuti in coltura); con *HeLa* (linea di carcinoma umano uterino, non cresciuto in coltura).

Transduzione di cheratinociti primari

Il vettore lentivirale SIN (*Self-INactivating*, cioè privo delle sequenze codificanti i siti di tossicità virale) è stato prodotto con un sistema calcio-fosfato di transfezione transiente a tre plasmidi, usando Hek293T come cellule di packaging, ed ha un envelope glicoproteico VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus*). (Follenzi et al, 2002) Il promotore è hPGK, che controlla l'espressione del gene marker E-GFP: la % di espressione del gene marker è stata valutata perché coincide con la % di transduzione cellulare. Titolo del vettore: 1.3×10^8 TU/ml.

Le diverse condizioni sperimentali da testare riguardano la durata dell'infezione e l'MOI (*Multiplicity Of Infection*), calcolato sul numero totale di cellule presenti nel pozzetto (cheratinociti+feeder layer 3T3).

Il vettore lentivirale SIN non-integrante è stato prodotto con un sistema di co-transfezione a quattro plasmidi mediato dalla precipitazione calcio-fosfato, usando le Hek293T come cellule di packaging; ha un envelope glicoproteico VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus*) ed un promotore hPGK. (Lombardo et al, 2007) Una duplice copia di questo vettore veicola le ZFNs (*Zink Finger Nucleases*), enzimi artificiali che agiscono come una forbice per modificare il genoma cellulare, e una singola copia di vettore veicola la sequenza 'donatore', che in questo caso è la proteina marker E-GFP. Le ZFNs vanno a tagliare la sequenza endogena di DNA e la sostituiscono con la sequenza donatore E-GFP, attraverso un meccanismo di ricombinazione omologa attiva sul sito CCR5: abbiamo valutato la % di espressione del gene marker perché coincide con la % di transduzione cellulare. Titolo del vettore: 100ng p24/ μ l.

Le diverse condizioni sperimentali da testare riguardano una diversa titolazione (rispetto alla proteina HIV-1 Gag p24): condizioneA, 0.0013 ng/cell; condizioneB, 0.0010 ng/cell e l'eventuale verifica di ricombinazione omologa avvenuta.

L'analisi di efficienza sperimentale valutata mediante la % transduzione è stata condotta utilizzando il citofluorimetro BD FACS Canto ed il programma CellQuest (Becton Dickinson).

Analisi per la safety di infezione

Per valutare la safety di infezione negli esperimenti di terapia genica bisogna accertarsi che venga mantenuta la capacità clonogenica, e dunque la presenza di cellule staminali epiteliali: si potrebbe effettuare una analisi clonale, per ogni pozzetto rispettivo alle condizioni di coltura, e conteggiare la % di olocloni prodotti: ciò richiederebbe mesi di lavoro; oppure si potrebbe effettuare un life-span fino a quando le cellule non vanno in senescenza, valutando quale condizione di coltura potrebbe sopravvivere più a lungo; infine, si potrebbe effettuare il calcolo delle colonie abortive rispetto alle colonie clonogeniche, per almeno quattro passaggi in coltura: è un buon compromesso tra tempo e qualità di analisi.

Per ogni condizione di crescita, dunque, abbiamo analizzato almeno due CFE, fissate con Rodamina 2% (Sigma) in dodicesima giornata, discriminando la tipologia delle colonie valutando in particolare il contorno del clone e l'intensità della colorazione. Abbiamo calcolato sia la % cellule clonogeniche (colonie cresciute/colonie piastrate, parametro sensibile all'errore di pipettata) sia la % cellule abortive (colonie abortive/colonie cresciute, parametro più affidabile poiché sensibile al solo errore di conta, minimizzato nel caso in cui essa venga

effettuata sempre dallo stesso operatore) ed abbiamo comparato i risultati di ogni singola condizione tra loro riportando i dati su grafici excel.

Reazione di RT-PCR

L'RNA totale cellulare (KCRM6, addome; KCRM8, mammella; K71, prepuzio; Hek293T, rene embrionale; FCRM8, fibroblasti; LE763, cornea; HeLa, carcinoma uterino) è stato estratto usando l'RNeasy Mini kit (Quiagen) seguendo le istruzioni sul datasheet e quantificato a 260nm. Il DNA complementare è stato sintetizzato usando la Superscript™ One-step RT-PCR (Invitrogen) ed è stato amplificato usando primers specifici (progettati con il programma primer3plus) in un'unica reazione. E' stato eseguito il seguente protocollo di amplificazione: 1 ciclo a 50°C per 20 minuti e a 94°C per 2 minuti; 35 cicli a 94°C per 15 secondi, a temperatura di annealing primer-specifica per 30 secondi e a 72°C per 1 minuto; lo step di estensione finale è di 5 minuti a 72°C. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di Agarosio 1.5% e visualizzati con Etidio Bromuro (Sigma) staining.

gene	Fwd primer	Rev primer	Ta	Tm	bp
hACTB	5'-ggacttcgagcaagagatgg -3'	5'-agcactgtgtggcgctacag-3'	53°	60°	234
hGapDH	5'-tccatgacaactttggtatcg-3'	5'-tgtagccaaattcgtgtca-3'	50°	58°	471
hMRP2	5'-tgcttcctggggataatcag-3'	5'-cacggataactggcaaacct-3'	52°	60°	211
hUGT1A1	5'-ctgccttcacccaaatccac-3'	5'-gcgcatgatgttctcctgt-3'	52.5°	61°	490

Tabella : Sequenze dei primer umani per RT-PCR e condizioni di amplificazione.

Isolamento della frazione microsomale

Per questa analisi circa 25×10^6 cells (KCRM7, addome; KCRM8, mammella; Hek293T, rene embrionale; FCRM8, fibroblasti; HepG2, carcinoma epatico) sono state lavate in dPBS (Gibco) ed il pellet è stato congelato a -80°C, fino ad ulteriore processazione. I pellet sono stati scongelati in ghiaccio, lavati due volte con Mix1 (0.25M Sucrose, 10mM Tris-HCl pH 7.4) e lasciati riposare in ghiaccio nello stesso mezzo di risospensione per 15 minuti. Il campione è stato poi trasferito nel Douncer (Sigma) ed omogenizzato con più di venti colpi meccanici, per rompere le membrane cellulari. L'omogenato è stato interamente trasferito in una falcon e centrifugato a 10.000g per 10 minuti a 4°C: mentre mitocondri e nuclei si depositano sul fondo, gli enzimi e i frammenti del reticolo endoplasmatico rimangono in soluzione: è stato quindi preso il solo surnatante, che è stato ultracentrifugato a 100.000g per 60 minuti a 4°C (Optima L90K, Beckman Coulter). Il pellet ottenuto è stato risospeso con Mix2 (50mM Hepes pH 7.8, 2mM EDTA pH 8.0, glicerolo 20%) e conservato a -20°C.

Western Blot

La frazione microsomale di ciascun campione è stata scongelata in ghiaccio, quantificata con Bradford (BioRad) e risospesa con un ugual volume di Laemmli 2x (125mM Tris-HCl pH

6.8, 20% glicerolo, 4% SDS, 0.04% blu di bromofenolo) e b-mercaptoetanololo, 1:100 (Sigma). Denaturare a 95°C per 10 minuti, poi lasciare 1 minuto in ghiaccio e centrifugare a 13000rpm per 1 minuto. I campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilamide (Resolving 8%; Stacking 5%) per separare le proteine in base al peso molecolare e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (BioRad) di cui sono stati bloccati i siti aspecifici con una soluzione di TBST (20mM Tris-Cl pH 7.5, 500mM NaCl, 0.1% Tween20) supplementata con milk al 5%. La membrana è stata poi ibridizzata o/n con l'anticorpo to UGT1A1, 2.5µg/ml (AB62600, Abcam) in milk 5% e, dopo opportuni lavaggi in TBST, è stata incubata con l'anticorpo secondario HRP-anti-Rabbit, 1:5000 (376152, ECL) in milk 2% per 30 minuti. La coniugazione dell'anticorpo secondario con l'enzima HRP (*Horse Radish Peroxidase*) permette la rilevazione del segnale grazie alla reazione chemiluminescente ottenuta dall'incubazione del suo substrato (ECL, Amersham Pharmacia Biotech Inc).

Test di funzionalità per la glicurono-coniugazione

La bilirubina esogena in polvere (Sigma) è stata sciolta con HCl 2N e terreno Kc, per ottenere uno stock finale di 100mg/1ml/10% stabile al buio a temperatura ambiente. Piastra di controllo (terreno Kc+bili), piastra con fibroblasti del derma e piastra con cheratinociti di mammella sono state allestite somministrando diverse concentrazioni di bilirubina esogena e sono state valutate sia morfologicamente (foto al microscopio) sia funzionalmente (capacità di glicurono-coniugare la bilirubina indiretta in bilirubina diretta, con kit diagnostico #0037 e #0032, Giese Diagnostics) a molteplici tempi dall'avvenuta somministrazione.

I campioni, raccolti seguendo le istruzioni sul datasheet, sono stati quantificati a 536nm per valutare la bilirubina totale e a 555nm per valutare la bilirubina diretta, utilizzando lo spettrofotometro DU730, Beckman Coulter.

DATABASE ITALIANO DEI PAZIENTI CRIGLER NAJJAR

La conoscenza della correlazione genotipo-fenotipo è fondamentale per una migliore comprensione di come può evolvere la sindrome di Crigler Najjar nel tempo. Essendo una patologia rara, l'anamnesi dei pazienti è ancora più difficile e le possibilità di classificazione calano drasticamente. Ci siamo impegnati a costruire un database italiano per riunire sia i dati genetici che i dati clinici dei pazienti Crigler Najjar tipo I e tipo II; lo scopo primario era quello di avere delucidazioni ulteriori su come può evolvere la patologia, e dunque prevenirne gli effetti nel tempo. La diagnosi genetica ci è pervenuta da centri di diagnosi molecolare (Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze; Ospedali Riuniti di Foggia, Foggia) mentre il completamento clinico è ad opera del dr. Flavio Ronchi. I dati di tutti i pazienti a noi pervenuti sono stati inseriti in una tabella excel e sono stati analizzati attraverso alcuni programmi bio-informatici (CHIP SNPper; ExpASy Translate) per un loro migliore approfondimento.

RISULTATI

PROGENITORI STAMINALI EPATICI NEL RODITORE

Identificazione di progenitori non-parenchimali adulti del fegato

I progenitori (PR) non-parenchimali adulti del fegato sono cellule quiescenti e multipotenti con illimitate capacità proliferative, attivate durante il processo di rigenerazione epatica.

Si pensa che le cellule SP (*Side Population*) potrebbero essere i progenitori adulti del fegato:

i) le cellule SP co-localizzano con progenitori cellulari di altri organi e tessuti; ii) le cellule SP del fegato sono numericamente poche e la loro percentuale decresce durante il danno; iii) l'espressione intra-citoplasmatica del trasportatore proteico ABCG2 è necessario e sufficiente per dare origine ad effetti farmaco-resistenti, che potrebbero causare una over-proliferazione delle cellule SP e, nei casi peggiori, il cancro.

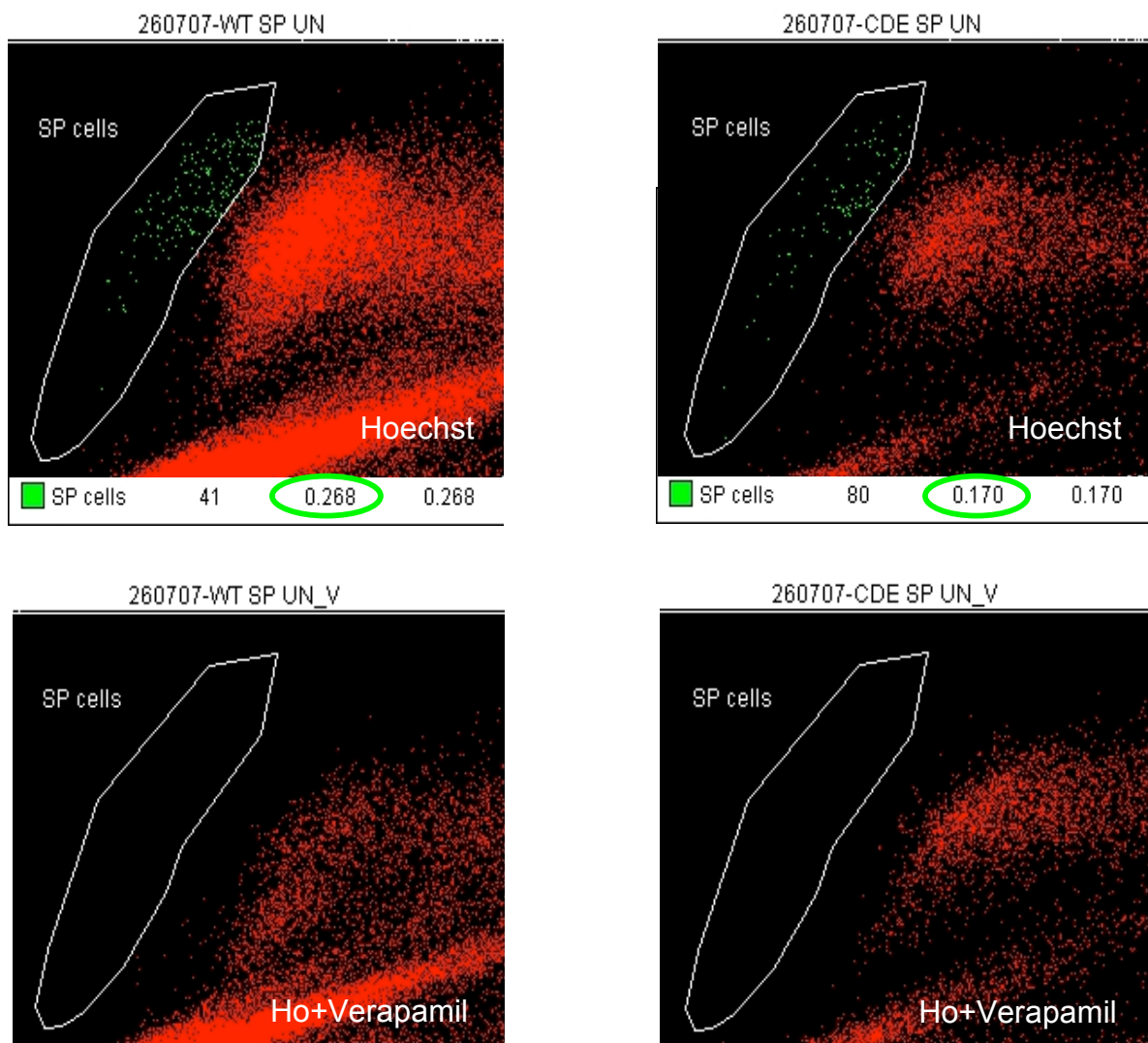


Figura : Identificazione dei progenitori con Hoechst 33342 nei topi non trattati (WT) e trattati (CDE).

Nel nostro studio l'identificazione delle cellule SP è stata possibile in entrambi gli animali trattati e non trattati, ma la percentuale del gate negativo per Hoechst 33342 era diversa: le cellule SP non trattate erano 0.268% mentre le cellule SP trattate erano 0.170%. Ciò significa che lo 0.098% di cellule SP sono state attivate durante il processo di rigenerazione epatica, indotto dalla dieta CDE. Nei campioni trattati e non trattati soggetti a Hoechst + Verapamil (inibitore del trasporto non specifico di membrana) nessuna cellula è stata internalizzata nel gate (ctr) poiché positiva alla colorazione Hoechst 33342.

Le cellule SP sono state successivamente analizzate per l'espressione di quattro marcatori in entrambi i campioni non trattati (WT) e trattati (CDE). Approssimativamente, negli animali trattati con dieta CDE, il 9.4% delle cellule SP erano CD133+/cMet-; 27.6% delle cellule SP erano Sca1+/cMet- e 50.3% delle cellule SP erano CD45+/cMet-. Nell'animale non trattato, invece, la percentuale di espressione di CD133 e Sca1 è calata fino a 6.7% e 24.0% rispettivamente, mentre il 76.7% delle cellule SP erano CD45+/cMet-. Ciò significa che più del 25% di cellule SP CD45+ sono state perse l'ottavo giorno di dieta CDE.

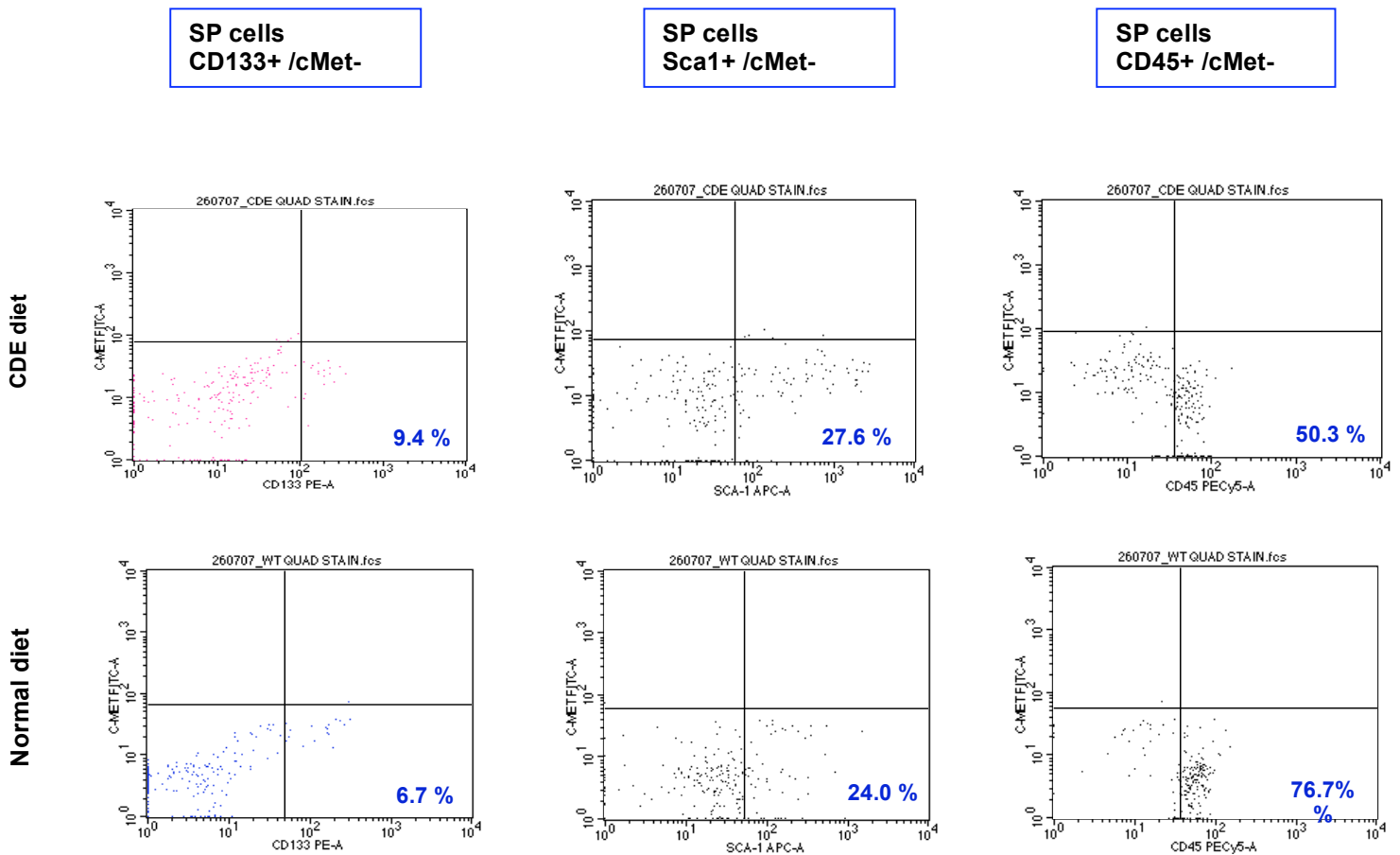


Figura : Analisi di staining multiplo per i progenitori non-parenchimali epatici adulti al citofluorimetro.

Paragonando i campioni murini con dieta normale o con dieta CDE, le cellule SP esprimono Sca1, CD45, CD133 ma non c'è una significativa espressione di cMet, considerando sia la colorazione singola che la colorazione doppia.

	dieta normale	dieta CDE
cMet	0.4%	2.0%
CD133	6.7%	9.4%
Sca1	24.0%	27.6%
CD45	76.7%	50.3%
Sca1/CD133	2.3%	0.4%
Sca1/CD45	11.0%	3.7%
CD133/CD45	2.0%	0.9%

Tabella : Espressione dei marcatori di membrana nei campioni murini trattati e non trattati.

CD133 potrebbe essere considerato un marcatore estremamente significativo per riconoscere i progenitori del fegato; cMet potrebbe essere un marcatore specifico per cellule più differenziate ad amplificazione transiente; Sca1 e CD45 sono debolmente co-espressi nelle cellule SP.

A causa del loro esiguo numero nel fegato adulto di roditore, della loro attivazione durante il processo di rigenerazione epatica e soprattutto a causa della specifica espressione di alcuni marcatori extra-cellulari, si presume che le cellule SP precedentemente descritte possano coincidere con i progenitori non-parenchimali adulti del fegato.

Identificazione di cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente

Le cellule ad amplificazione transiente (TA) sono cellule unipotenti con una limitata capacità proliferativa, se paragonate alle cellule progenitrici di fegato adulto (SP cells). Nel nostro studio, l'analisi al citofluorimetro richiede il settaggio dei parametri di dimensione cellulare (FSC-H) e di granularità (SSC-H) per una corretta analisi della popolazione di cellule ovali; le cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente sono state analizzate per l'espressione di marcatori extra-cellulari.

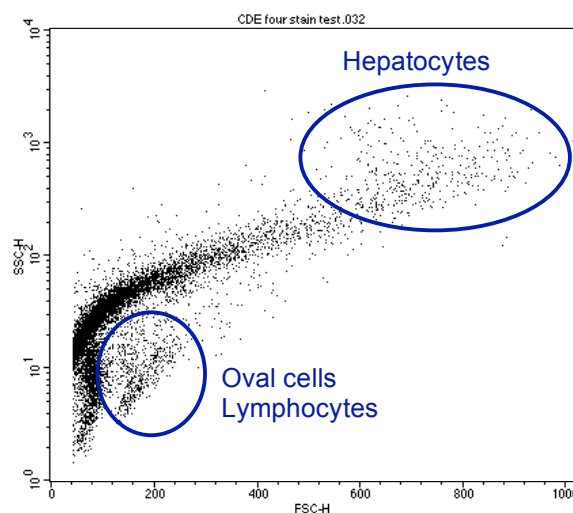


Figura : Le popolazioni cellulari visibili al citofluorimetro con i parametri FSC-H/SSC-H.

L'identificazione delle cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente si potrebbe interpretare come l'identificazione di cellule NON-SP, che esprimono tutti i marcatori CD133, CD45, Sca1, cMet, ma in una quantità molto diversa rispetto ai progenitori cellulari.

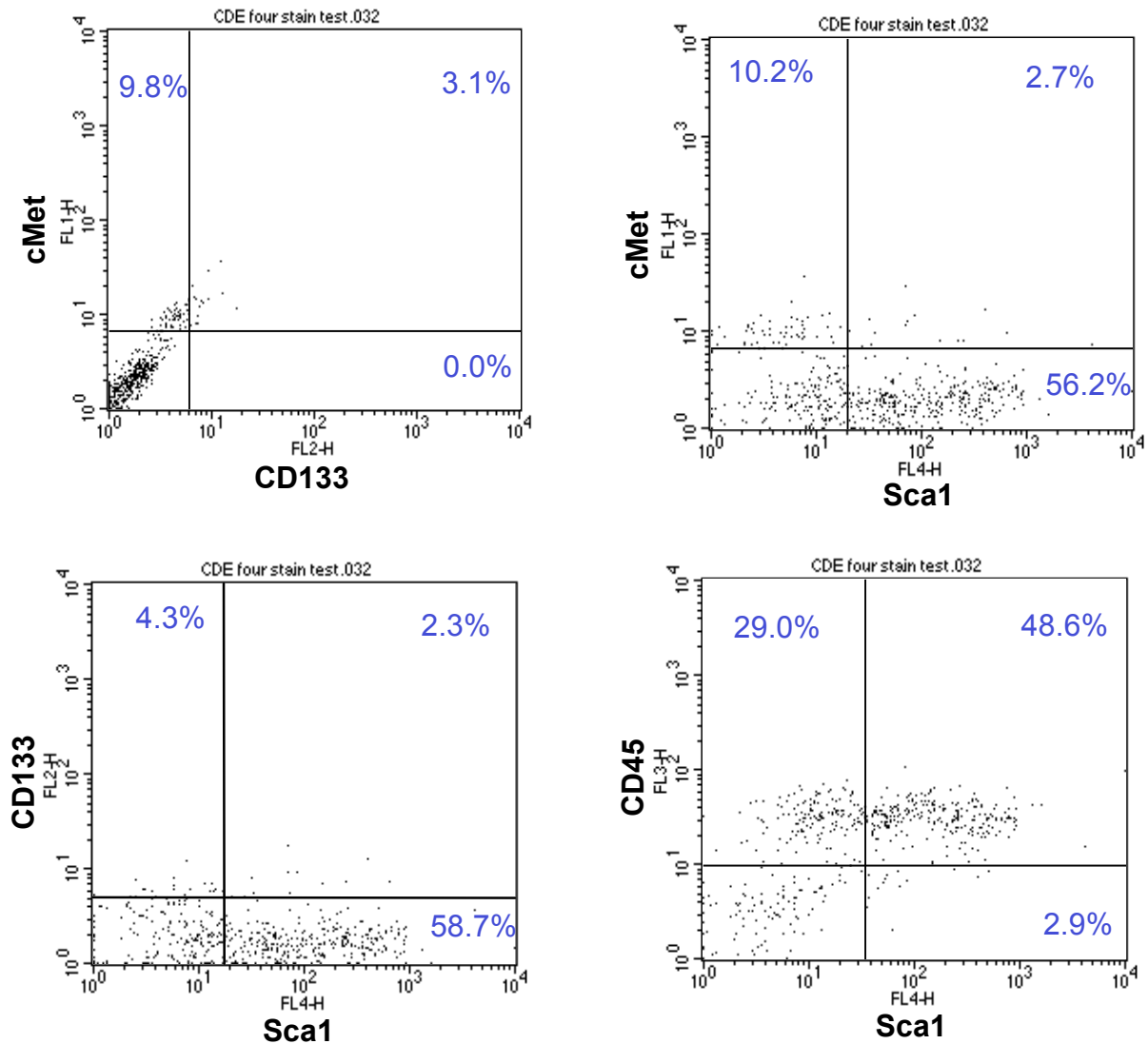


Figura : Analisi di staining multiplo al citofluorimetro per cellule TA di topo trattato con dieta CDE.

CD133 è poco espresso nelle cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente; diverso è per il marcatore di membrana cMet, la cui espressione si spinge sino ad un 13% se si considera la colorazione singola: cMet può essere considerato un marcatore significativo per l'isolamento di cellule ad amplificazione transiente più differenziate.

Sca1 e CD45 sono markers enormemente co-espressi nella popolazione cellulare NON-SP (48.6% anziché 3.7% nella popolazione di cellule SP) e potrebbero essere considerati marcatori estremamente significativi per l'identificazione e l'isolamento di cellule epatiche più differenziate.

I dati preliminari ottenuti mediante l'analisi al citofluorimetro sono stati confermati con l'immunofluorescenza: sezioni di tessuto epatico di topo trattato con dieta normale o con dieta CDE sono state analizzate per l'espressione di CD133, CD45 e Sca1. Sezioni di fegato adulto degli animali di controllo non hanno dimostrato alcuna colorazione significativa se paragonati alle sezioni di fegato adulto degli animali sottoposti a dieta CDE, dove si riscontra una cospicua proliferazione di cellule ovali nei loci di rigenerazione epatica.

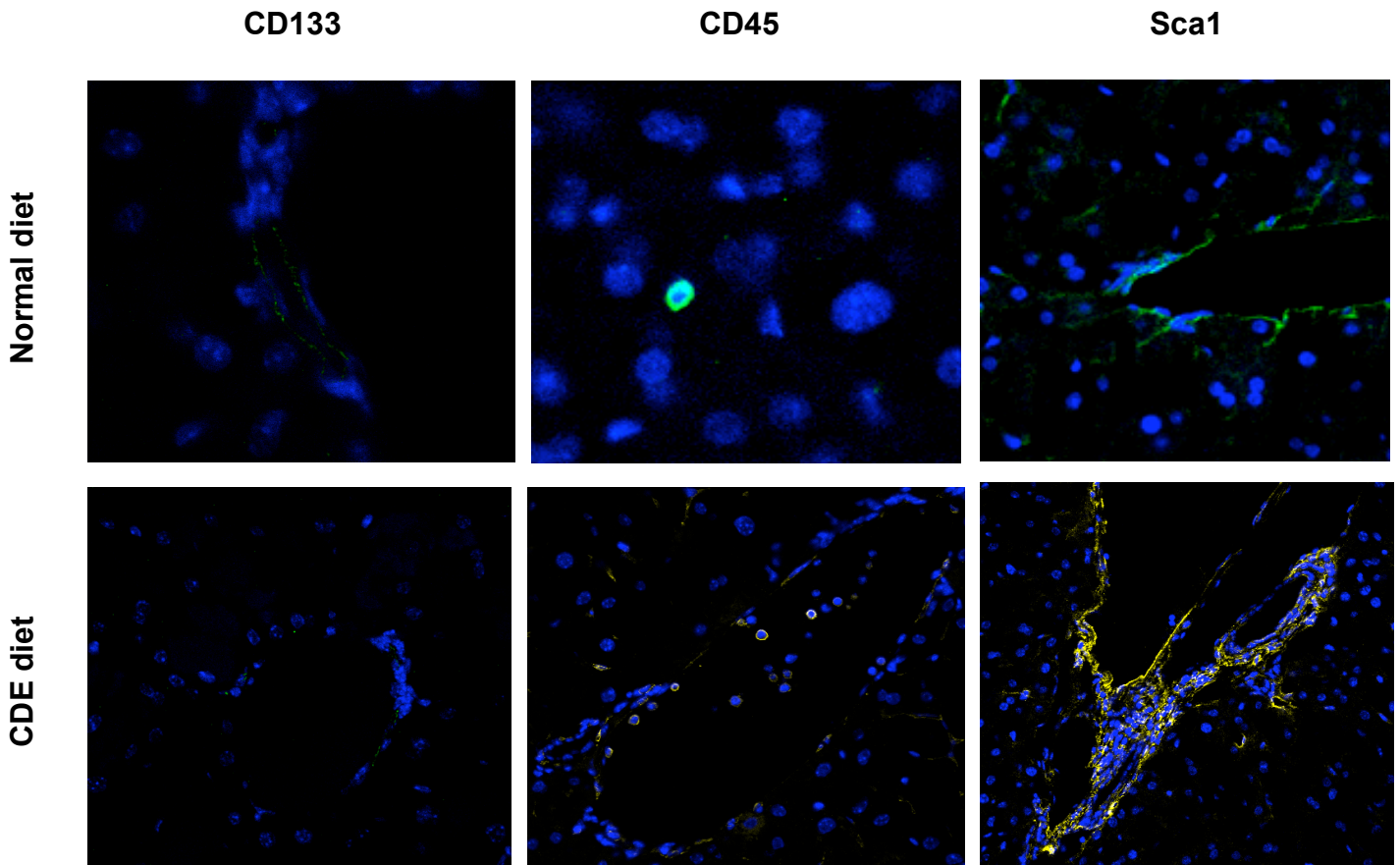


Figura : Analisi di immunofluorescenza per CD133, CD45, Sca1 in sezioni di tessuto WT e CDE.

Come si può vedere dalle immagini, l'espressione più marcata del fluorocromo è relativa al marcatore Sca1 (marker di "cellule progenitrici residenti nei tessuti"), specialmente nel campione trattato con dieta CDE. Infatti, l'accumulo maggiore di cellule ovali è stato osservato sia nell'area periportale sia nel dotto epiteliale biliare limitrofo, a differenza di tutti gli altri campioni, nei quali la colorazione di un fluorocromo singolo era localizzata o nell'area periportale epatica (dieta normale-Sca1; dieta CDE-CD45) o in cellule ematopoietiche (dieta normale-CD45) o in nessuna porzione significativa di tessuto (CD133).

Nel topo trattato con dieta CDE c'è una più vivida e localizzata espressione dei marcatori CD45 e Sca1, specialmente nei loci di rigenerazione epatica. Questa è una prova addizionale che le cellule NON-SP ad amplificazione transiente (Sca1+ CD45+ CD133-), aumentano di numero durante il processo di rigenerazione epatica.

Isolamento di cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente

Per completare lo studio delle cellule ovali nel roditore è stato necessario isolare le cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente, la cui purificazione è stata possibile usando microbiglie magnetiche (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS) riconosciute da anticorpi di interesse marcatore-specifici, verso CD45 e Sca1.

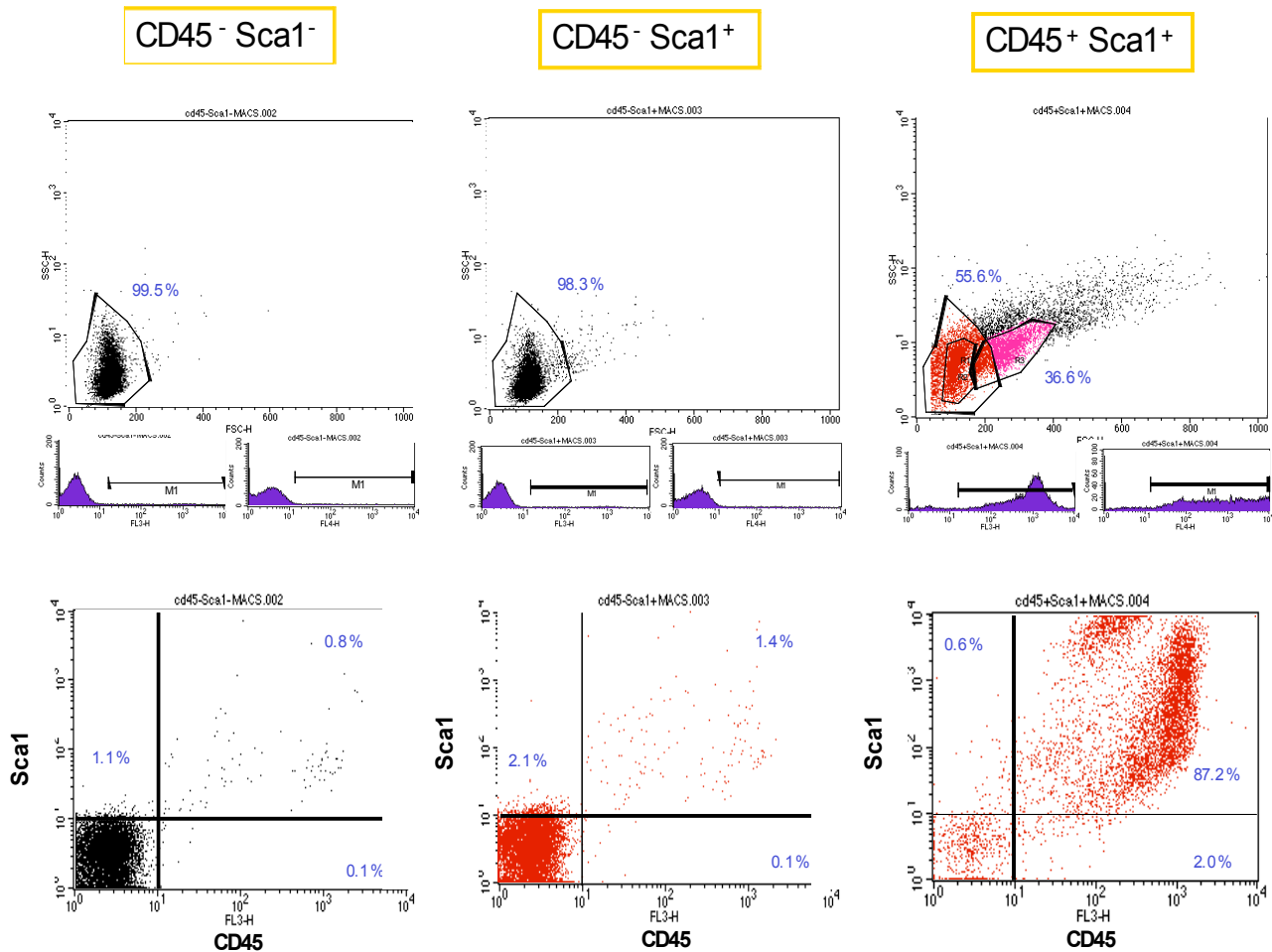


Figura : Purificazione MACS delle cellule non-parenchimali epatiche adulte (TA) nel topo con dieta CDE.

Si è scelto di analizzare diversi gruppi: i) CD45- Sca1- è stato scelto come gruppo cellulare di controllo per la procedura di purificazione, in quanto quasi tutte le cellule (99.5%) sono state circoscritte nel gate e non esprimevano in modo significativo alcun marcatore. ii) CD45- Sca1+ è la popolazione cellulare racchiusa nel gate che avrebbe dovuto esprimere in modo specifico il solo marcatore Sca1. In verità, però, l'aumentata espressione del marcatore Sca1 rispetto alla popolazione di controllo era davvero minima (<2%); inoltre, la metà delle cellule Sca1+ erano anche CD45+. iii) CD45+ Sca1+ è l'unica popolazione cellulare che fuoriesce dal gate, probabilmente a causa dei numerosi detriti ed aggregati prodotti dalla procedura, aventi una dimensione maggiore rispetto alle cellule CD45+ Sca1+ incluse nel gate (55.6%). In questo sottogruppo cellulare si quantifica una vivida espressione di entrambi i fluorocromi: CD45 e Sca1 co-esprimono per un 87.2% mentre l'espressione singola di ciascun marcatore si riduce a 0.6% per Sca1 e a 2.0% per CD45.

Se paragoniamo la popolazione CD45+ Sca1+ con gli altri sottogruppi cellulari purificati tramite MACS risulta evidente una incrementata co-espressione di entrambi i fluorocromi (>85%): questo significa che per isolare da un roditore sottoposto a dieta CDE le cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente sarà necessario purificare cellule esprimenti non solo il marcatore Sca1, ma anche il marker CD45.

L'identità delle cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente è stata confermata mediante analisi di RT-PCR su tutte le popolazioni cellulari isolate tramite MACS (CD45- Sca1-; CD45- Sca1+; CD45+ Sca1+) in un topo trattato con dieta CDE.

Il nostro studio ha inoltre incluso altri campioni (fegato adulto non trattato; fegato neonatale non trattato; fegato adulto trattato con dieta CDE; midollo osseo adulto) usati come controllo positivo per alcuni marcatori di cui abbiamo analizzato l'espressione genica.

I marcatori cellulari scelti nell'analisi di RT-PCR completano un profilo di espressione che va ad includere sia marcatori specifici per un lineage epatico più maturo (Alb; Muc1; cMet; Dlk1) sia markers significativi per un lineage biliare più indifferenziato (CK19; NOPE; CD133; aFP; CD24a), al fine di approfondire il profilo di espressione genica delle cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente.

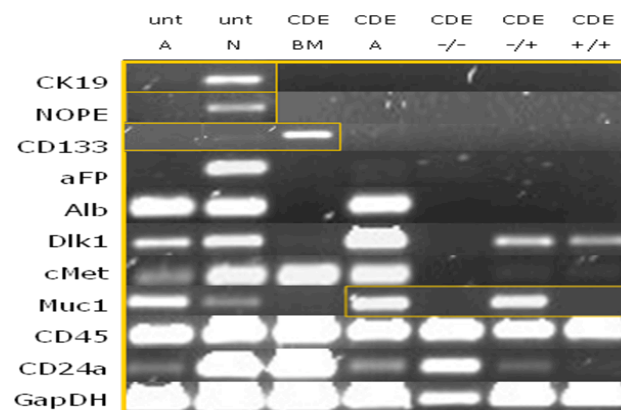


Figura : Profilo di espressione genica per diversi campioni analizzati con RT-PCR.

unt: dieta normale; CDE: dieta CDE (8-12 giorno)

A: topo adulto (4-6 settimane); N: topo neonato (6 giorni); BM: midollo osseo;

-/- : CD45- Sca1-; -/+ : CD45- Sca1+; +/+ : CD45+ Sca1+

Come si può vedere dal profilo di espressione (i riquadri in giallo rappresentano reazioni di RT-PCR condotte in diverse fasi sperimentali) il campione di fegato adulto non trattato è risultato positivo per Albumina, Dlk1, cMet, Muc1, CD45, CD24a, GapDH; il campione di fegato neonatale non trattato è risultato positivo per CK19, NOPE, CD133, aFP, Albumina, Dlk1, cMet, Muc1, CD45, CD24a, GapDH e dunque per tutti i marcatori analizzati; il campione di midollo osseo adulto è risultato positivo per CD133, cMet, CD45, CD24a, GapDH; il campione di fegato adulto trattato con dieta CDE è risultato positivo per Albumina, Dlk1, cMet, Muc1, CD45, CD24a, GapDH.

In aggiunta, considerando i campioni purificati tramite la tecnica MACS, l'analisi di RT-PCR ha evidenziato l'espressione di CD45, CD24a, GapDH per la popolazione CD45- Sca1-; l'espressione di Dlk1, cMet, Muc1, CD45, CD24a, GapDH per la popolazione CD45- Sca1+; l'espressione di Dlk1, cMet, CD45, CD24a, GapDH per la popolazione CD45+ Sca1+.

La popolazione cellulare CD45+ Sca1+ purificata tramite MACS potrebbe coincidere con il sottogruppo di cellule bipotenti non-parenchimali epatiche adulte NON-SP Sca1+ CD45+ analizzate al citofluorimetro e successivamente investigate con l'immunofluorescenza.

Riteniamo possibile che questa popolazione cellulare NON-SP CD45+ Sca1+ rappresenti le cellule non-parenchimali adulte ad amplificazione transiente (TA) del fegato.

CELLULE STAMINALI EPITELIALI NELL'UOMO

Terapia genica ex vivo con vettori lentivirali SIN integranti

L'epidermide è completamente rinnovata ogni mese: è necessario che, nella terapia genica ex vivo, le cellule staminali epiteliali vengano trasdotte stabilmente con vettori lentivirali, aventi come transgene una proteina esogena che verrà prodotta proporzionalmente al numero di copie provirali integrate.

Nel nostro studio, abbiamo infettato cheratinociti estratti da una biopsia di prepuzio (K71) con un vettore lentivirale SIN (VSVG-hPGK-EGFP) in diversi tempi (3h; 6h; o/n) e a vari MOI (1; 2; 4; 8; 10) ed abbiamo comparato tra loro i diversi valori della % di espressione del gene marker (E-GFP), che coincide con la % di trasduzione cellulare.

	K71 (N1,p.5)			K71 (N2,p.6)			K71 (N3,p.7)			K71 (N4,p.8)		
	3h	6h	o/n	3h	6h	o/n	3h	6h	o/n	3h	6h	o/n
MOI=1	12.3	15.2	13.7	10.1	15.2	12.3	9.1	11.3	13.3	12.1	22.1	12.0
MOI=2	17.0	21.8	18.9	16.2	18.9	18.6	12.4	16.3	18.8	14.6	20.4	20.6
MOI=4	74.6	72.5	79.3	58.6	64.2	72.4	65.1	65.9	65.0	56.4	72.6	75.0
MOI=8	77.5	79.9	79.1	76.1	77.0	74.6	77.9	74.6	83.1	78.3	81.9	83.8
MOI=10	77.5	76.2	86.7	78.7	72.2	75.7	76.2	75.5	85.1	86.9	85.4	91.6

Tabella : % trasduzione per cheratinociti umani infettati a 3h, 6h, o/n con lentivirus SIN a vari MOI.

Le cellule sono state analizzate per morfologia e velocità di crescita, poiché cresciute in coltura per un life-span di oltre un mese; non abbiamo notato differenze significative nella loro proliferazione ma abbiamo quantificato importanti variazioni di espressione del transgene al citofluorimetro. Sapendo che la % trasduzione ottimale per una futura terapia genica ex vivo dovrebbe essere maggiore del 70% per garantire una efficiente correzione del difetto, abbiamo scelto di approfondire l'analisi dei soli cheratinociti trasdotti con MOI=8 ed MOI=10, per tutte le condizioni temporali di infezione.

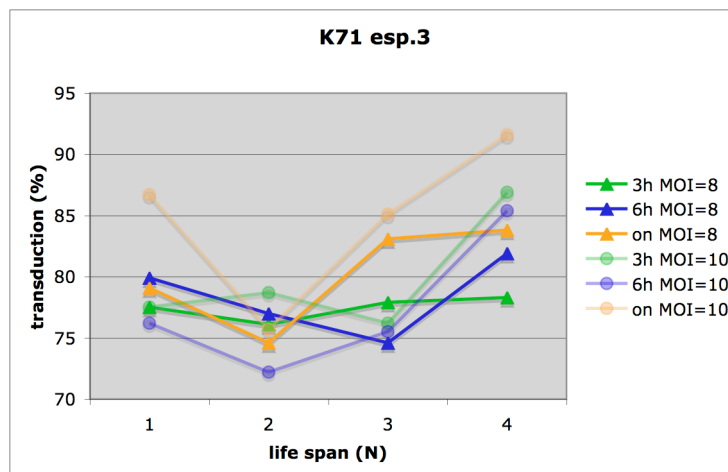


Figura : % trasduzione per cheratinociti umani infettati a 3h, 6h, o/n con lentivirus SIN a vari MOI.

Come si può vedere dal grafico, tutte le condizioni di infezione analizzate garantiscono il perpetuare della correzione genica per quattro passaggi cellulari in coltura e conferiscono una transduzione compresa tra il 70% e il 95%, garantendo così una possibile applicazione clinica.

A tale proposito è risultato fondamentale valutare anche la safety di infezione: la % di cellule clonogeniche e, soprattutto, la % di cellule abortive sono state considerate come due parametri essenziali per capire la ‘qualità’ delle cellule infettate e cresciute in coltura.



Figura : % cells clonogeniche per cheratinociti umani infettati a 3h, 6h, o/n con lentivirus SIN a vari MOI.

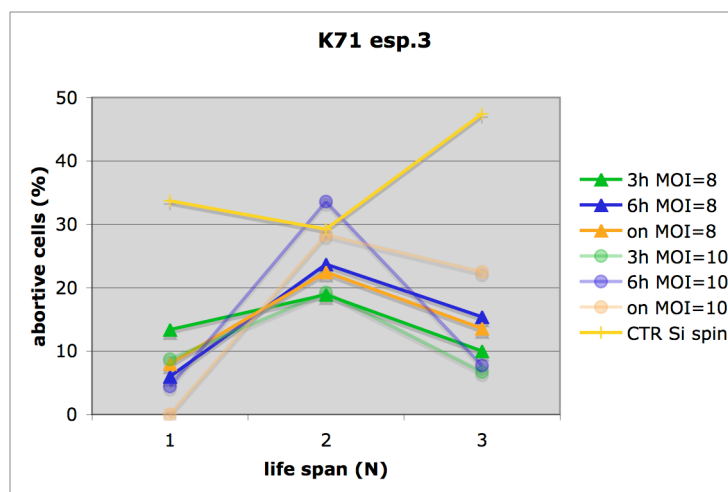


Figura : % cellule abortive per cheratinociti umani infettati a 3h, 6h, o/n con lentivirus SIN a vari MOI.

Mentre la % di cellule clonogeniche si è quasi annullata nel periodo immediatamente successivo all’infezione, per poi recuperare nel passaggio seguente, a dimostrazione del fatto che anche cellule stabilmente transdotte si mantengono vitali e clonogeniche nel tempo; la % di cellule abortive ha registrato una netta crescita nel periodo immediatamente successivo all’infezione, a dimostrazione del fatto che le cellule sono sensibili alla presenza del virus, ma è tornata nei limiti della normalità nei passaggi seguenti, evidenziandone il recupero cellulare.

A paragone con le altre tempistiche analizzate, soltanto l’infezione di cheratinociti umani a 6h dal contatto virus-cellula con MOI=10 garantisce un’alta % transduzione (>85%), una cospicua riserva clonogenica (>10%) ed una ridotta presenza di colonie abortive (<8%).

Terapia genica ex vivo con vettori lentivirali SIN non-integranti veicolanti le ZFNs

Per garantire una correzione stabile nel tempo l'integrazione vettoriale è sicuramente l'ipotesi migliore, ma certamente non priva di rischi: abbiamo valutato a tal proposito una strategia innovativa, che permette la ricombinazione omologa tra una sequenza transgenica 'donatore' ed il tratto di genoma prestabilito (sito CCR5), grazie all'azione di enzimi artificiali (ZFNs) veicolati nella cellula da vettori lentivirali SIN non-integranti.

Nel nostro studio, abbiamo infettato cheratinociti estratti da una biopsia di prepuzio (K71) con un vettore lentivirale SIN (VSVG-hPGK-EGFP) non-integrante ed abbiamo valutato la % di espressione del gene marker in due diverse titolazioni (condizioneA, 0.0013 ng/cell; condizioneB, 0.0010 ng/cell), verificando così una eventuale ricombinazione omologa nei cheratinociti umani cresciuti in coltura per oltre un mese.

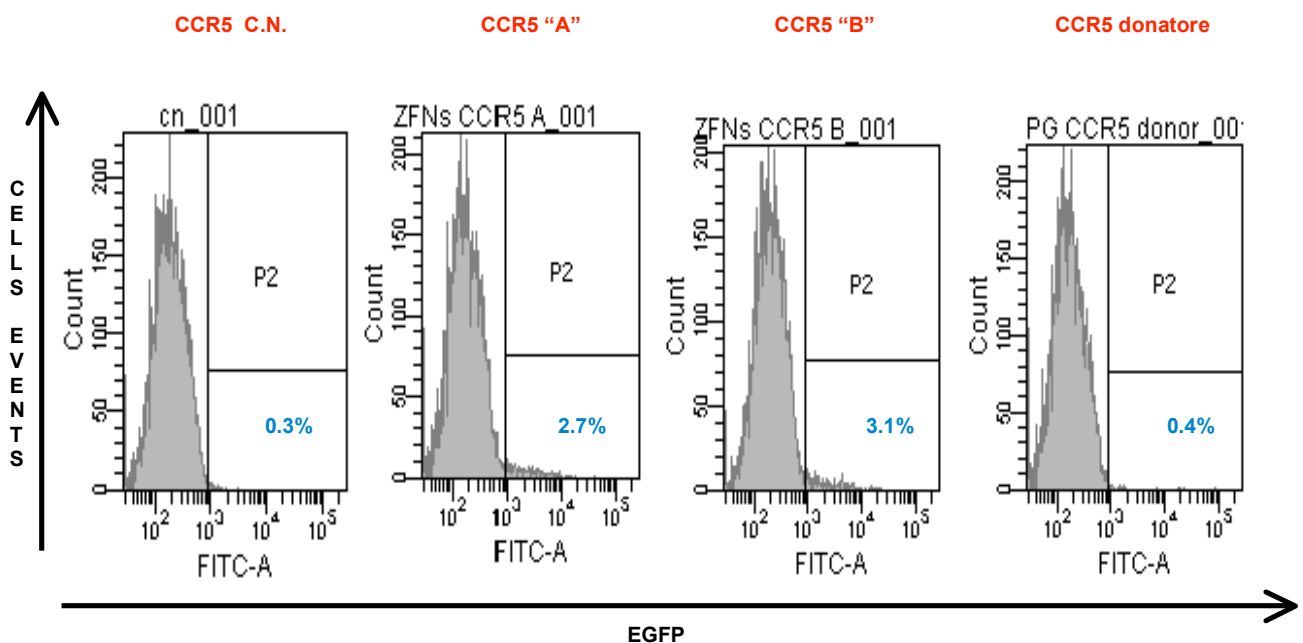


Figura : % transduzione per cheratinociti umani infettati con lentivirus SIN non-integranti dopo un mese.

Come si può vedere dal grafico, cellule infettate con entrambe le condizioni sperimentali 'A' e 'B' analizzate al citofluorimetro non sono caratterizzate da un'alta percentuale di transduzione (2.7% e 3.1%, rispettivamente): ciò non garantisce il perpetuare della correzione genica ad un livello significativo e dunque ne vieta il loro utilizzo in una possibile applicazione clinica.

Cellule staminali epiteliali nella terapia genica ex vivo per la sindrome di Crigler Najjar

La crescita in laboratorio di un lembo di epidermide autologa geneticamente modificata mediante l'utilizzo di un vettore retro-virale ha permesso la correzione stabile e sicura di un difetto di adesione della pelle, senza conferire alcuna tossicità al paziente anche dopo anni dal trattamento. L'interesse a trovare una strategia alternativa per la sindrome di Crigler Najjar ci ha spinto a considerare le cellule staminali epiteliali come candidate per uno studio di terapia genica ex vivo non solo per malattie di pelle, ma anche per altri disordini con origine epiteliale.

Nel nostro studio abbiamo innanzitutto valutato il profilo di espressione genica per una serie di campioni analizzati: i fibroblasti sono risultati positivi per hGapDH, hACTB, hMRP2; i cheratinociti di addome sono risultati positivi per hGapDH, hACTB, hMRP2, hUGT1A1; i cheratinociti di mammella sono risultati positivi per hGapDH, hACTB, hMRP2, hUGT1A1; i cheratinociti di prepuzio sono risultati positivi per hGapDH, hACTB, hMRP2, hUGT1A1; le cellule di rene embrionale sono risultate positive per hGapDH, hACTB, hMRP2; i cheratinociti corneali sono risultati positivi per hGapDH, hACTB, hMRP2, hUGT1A1; le cellule di cancro uterino sono risultate positive per hGapDH, hACTB, hMRP2, hUGT1A1.

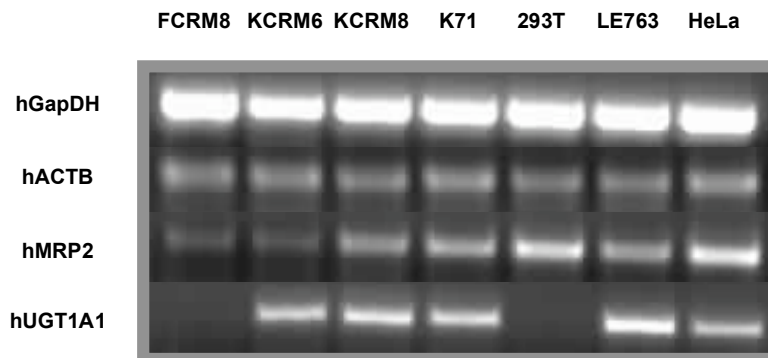


Figura : Profilo di espressione genica per diversi campioni umani analizzati con RT-PCR.

Mentre i fibroblasti e le cellule di rene embrionale possono essere considerate come controllo negativo all'espressione genica di hUGT1A1, tutti i cheratinociti analizzati dimostrano la presenza del gene d'interesse sia nella pelle che nell'occhio.

Al completamento dello studio di espressione genica, abbiamo scelto di procedere isolando la frazione microsomale di una serie di campioni, sottoponendoli poi all'analisi di espressione proteica, poiché non sempre un gene espresso in un certo tessuto coincide anche con la presenza e funzionalità della proteina di interesse.

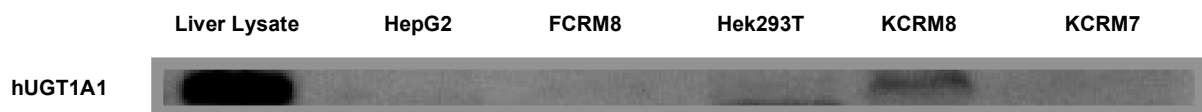


Figura : Profilo di espressione proteica per diversi campioni umani analizzati con western blot.

Come si può vedere dall'immagine, soltanto i cheratinociti estratti da una biopsia umana di mammella esprimono la proteina hUGT1A1, a differenza dei cheratinociti di addome, dei fibroblasti dermici, delle cellule embrionali di rene e delle cellule di carcinoma epatico. Come controllo positivo abbiamo utilizzato un lisato di fegato umano adulto wild-type (AB29889, Abcam), che ci permette di visualizzare chiaramente la banda di espressione a 54 kDa.

Basandoci su questi dati preliminari possiamo avanzare l'ipotesi di espressione genica e proteica per hUGT1A1 in cheratinociti umani di mammella, che potrebbero essere considerate cellule di elezione per una futura terapia genica ex vivo nella sindrome di Crigler Najjar.

DATABASE ITALIANO DEI PAZIENTI CRIGLER NAJJAR

L'importanza di conoscere come può evolvere nel tempo una sindrome rara come la Crigler Najjar ci ha spinto a cercare una correlazione tra i dati fenotipici di ogni paziente (valori di bilirubina; valori di albumina; rapporto bilirubina/albumina; farmaci assunti; fototerapia; interventi chirurgici; eventuali allergie o intolleranze) e la genetica (mutazioni nella sequenza UGT1A1; polimorfismi nella sequenza del promotore A(TA)_nTAA a monte del gene), convinti che la conoscenza della correlazione genotipo-fenotipo potrebbe essere di grande aiuto sia ai pazienti che alla ricerca scientifica.



Figura : Proteina hUGT1A1: porzioni esoniche (aa) e funzionali a confronto.
 Esone1 (1-288); Esone2 (289-332); Esone3 (333-361); Esone4 (362-434); Esone5 (435-533)
 Aglycone BD: dominio di legame della molecola accettore
 UDP-GlnA BD: dominio di legame della molecola donatore; Cuore Catalitico PROSITE (354-397).

Virtual Sequence: VIRT11622

```

ID   VIRT11622                Unreviewed;          533 AA.
AC   VIRT11622;
DE   Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE   on 29-Oct-2009 by imac120.medrig.unimo.it.
CC   -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC   from the server after a few days.
CC   8.19 PI.
DR   SWISS-2DPAGE; VIRT11622; VIRTUAL.
SQ   SEQUENCE   533 AA;  59591 MW;  19C90231AD0EB547 CRC64.
MAVESQGRP LVLGLLLCVL GPVVSHAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYP VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFI KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRV KNMLIAFSQN FLCDVVYSPY ATLASEFLQR
EVTVQDLLSS ASVWLFERSDF VKDYPRPIMP NMVFGGGINC LHQNPLSQEF EAYINASGEH
GIVVFSLGSV VSEIPEKKAM AIADALGKIP QTVLWRYTGT RPSNLANNIT LVKWLQNDL
LGHPMTRAFI THAGSHGVYE SICNGVPMVM MPLFGDQMDN AKRMETKGAG VTLNVLEMTS
EDLENALKAV INDKSYKENI MRLSSLHKDR PVEPLDLAVF WVEFVMRHKG APHLRPAAH
LTWYQYHSLD VIGFLLAVVL TVAFITFKCC AYGVRKCLGK KGRVKKAHKS KTH
    
```

//

Figura : Sequenza amminoacidica wild-type di UGT1A1 nell'uomo.
 Prodotto amminoacidico WT: 533aa

I dati genetici di tutti i pazienti sono stati analizzati attraverso il programma bio-informatico ExPASy Translate, con il quale è stato possibile predire la sequenza amminoacidica propria di ogni paziente e specifica per ogni singola mutazione.

Tale approfondimento ha permesso di mettere in luce la dimensione della catena proteica e, soprattutto, il suo grado di omologia con la sequenza amminoacidica wild-type, che dunque coincide con la porzione funzionale di UGT1A1.

Il completamento di tale analisi è stato, nei casi possibili, quello di valutare il polimorfismo del promotore A(TA)_nTAA a monte del gene, per chiarire ulteriormente la variabilità con cui avviene la trascrizione della proteina.

Virtual Sequence: VIRT6814

```
ID VIRT6814 Unreviewed; 533 AA.
AC VIRT6814;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 16-Nov-2009 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 8.19 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT6814; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 533 AA; 59549 MW; B367B23A11BF68F6 CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFI KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRFV KNMLIAFSQN FLCIDGVYSPY ATLASFLQRF
EVTVQDLLSS ASVWLFSDV VKDYPRPIMP NMVFVGGINC LHQNPLSQEF EAYINASGEH
GIVVFSLGSM VSEIPEKKAM AIADALGKIP QTVLWRYTGT RPSNLANNTI LVKWLPQNDL
LGHMTRAFI THAGSHGVYE SICNGVPMVM MPLFGDQMDN AKRMEFKGAG VTLNVLEMTS
EDLENALKAV INDKSYKENI MRLSSLHKDR PVEPLDLAVF WVEFVMRHKG APHLRPAAMD
LWYQYHSLD VIGFLLAVVL TVAFITFKCC AYGVRKCLGK KGRVKKAKHS KTH
```

//

Figura : Mutazione "V225G, polimorfismo" nell'esone1.
Prodotto amminoacidico: 533aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Virtual Sequence: VIRT11113

```
ID VIRT11113 Unreviewed; 191 AA.
AC VIRT11113;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 16-Nov-2009 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 6.14 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT11113; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 191 AA; 21088 MW; 424E518A487E9D6D CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFI KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF S
```

//

Figura : Mutazione "Y192X" nell'esone1.
Prodotto amminoacidico: 191aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Virtual Sequence: VIRT22214

```
ID VIRT22214 Unreviewed; 364 AA.
AC VIRT22214;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 16-Nov-2009 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 8.65 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT22214; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 364 AA; 41642 MW; 3A587986CFBBF3BB CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFI KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRFV KNMLIAFSQN FLCDVVYSPY ATLASFLQRF
EVTVQDLLSS ASVWLFSDV VKDYPRPSCP IWFLLESTA FTKIHYPRNL KPTLMLENM
ELWFSLWDQW SQKFQRRKLW QLLMLWAKSL RQSCGGTLEP DHRILRTRTY LLSGYPKTIC
LVTR
```

//

Figura : Mutazione "(delC) Pro267" nell'esone1.
Prodotto amminoacidico: 364aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Virtual Sequence: VIRT30268

```
ID VIRT30268 Unreviewed; 360 AA.
AC VIRT30268;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 18-Jan-2010 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 8.04 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT30268; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 360 AA; 41045 MW; 4EB8C255BB79456D CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFV KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRV KNMLIAFSQN FLCDVVYSPY ATLASFFLQR
EVTVQDLLSS ASVWLFERSDF VKDYPRPIMP NMVFVGGINC LHQNPLSQEF EAYINMELWF
SLWDQWSQKF QRRKLWQLLM LWAKSLRQSC GGTLEPDHRI LRTRYLLSG YPKTICLVTR
```

//

Figura : Mutazione “del13bp c.294” nell’esone2.
Prodotto amminoacidico: 360aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Virtual Sequence: VIRT12442

```
ID VIRT12442 Unreviewed; 360 AA.
AC VIRT12442;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 18-Jan-2010 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 7.61 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT12442; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 360 AA; 41029 MW; FAB8C90326B213F0 CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFV KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRV KNMLIAFSQN FLCDVVYSPY ATLASFFLQR
EVTVQDLLSS ASVWLFERSDF VKDYPRPIMP NMVFVGGINC LHQNPLSQEF EAYINMELWF
SLWDQWSQKF QRRKLWQLLM LWAKSLRQSC GGTLEPDHRI LRTRYLLSG YPKTICLVTR
```

//

Figura : Mutazione “del14bp insA c.292” nell’esone2.
Prodotto amminoacidico: 360aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Virtual Sequence: VIRT18942

```
ID VIRT18942 Unreviewed; 533 AA.
AC VIRT18942;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 16-Nov-2009 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 7.95 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT18942; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 533 AA; 59621 MW; 28CD51D0A95C9334 CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFV KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRV KNMLIAFSQN FLCDVVYSPY ATLASFFLQR
EVTVQDLLSS ASVWLFERSDF VKDYPRPIMP NMVFVGGINC LHQNPLSQEF EAYINASGEH
GIVVFSLGSV VSEIPEKKAM AIADALGKIP QTVLWNYTGT RPSNLANNNTI LVKWLQNDL
LGHMTRAFI THAGSHGVYE SICNGVPMVM MPLFGDQMDN AKRMETKGAG VTLNVLEMST
EDLENALKAV INDKSYKENI MRLSSLHKDR PVEPLDLAVF WVEFVMRHKG APHLRPAARD
LTWYQYHSLD VIGFLLAVVL TVAFITFKCC AYGKRCCLGK KGRVKKAHKS KTH
```

//

Figura : Mutazione “R336W” nell’esone3.
Prodotto amminoacidico: 533aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Virtual Sequence: VIRT14176

```
ID VIRT14176 Unreviewed; 533 AA.
AC VIRT14176;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 16-Nov-2009 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 8.19 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT14176; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 533 AA; 59633 MW; 1879192B17B515E6 CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSHAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFI KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRV KNMLIAFSQN FLCDVVYSPY ATLASFLQRF
EVTVQDLLSS ASVWLFERSDF VKDYPRPIMP NMVFGGGINC LHQNPLSQEF EAYINASGEH
GIVVFSLGSM VSEIPEKKAM AIADALGKIP QTVLWRYTGT RPSNLANNTI LVKWLQNDL
LGHPMTRAFI THAGSHVYVE SICNGVPMVM MPLFGDQMDN AKRMRKAG VTLNVLEMTS
EDLENALKAV INDKSYKENI MRLSSLHKDR PVEPLDLAVF WVEFVMRHKG APHLRPAAMD
LTWYQYHSLD VIGFLLAVVL TVAFITFKCC AYGVRKCLGK KGRVKKAHKS KTH
```

//

Figura : Mutazione "G377V" nell'esone4.
Prodotto amminoacidico: 533aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Virtual Sequence: VIRT29505

```
ID VIRT29505 Unreviewed; 533 AA.
AC VIRT29505;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 16-Nov-2009 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 8.19 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT29505; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 533 AA; 59633 MW; 05A57B48C81BB547 CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSHAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFI KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRV KNMLIAFSQN FLCDVVYSPY ATLASFLQRF
EVTVQDLLSS ASVWLFERSDF VKDYPRPIMP NMVFGGGINC LHQNPLSQEF EAYINASGEH
GIVVFSLGSM VSEIPEKKAM AIADALGKIP QTVLWRYTGT RPSNLANNTI LVKWLQNDL
LGHPMTRAFI THAGSHGVYE SICNGVPMVM MPLFGDQMDN AKRMRKAG VTLNVLEMTS
EDLENALKAV INDKSYKENI MRLSSLHKDR PVEPLDLAVF WVEFVMRHKG APHLRPAAMD
LTWYQYHSLD VIGFLLAVVL TVAFITFKCC AYGVRKCLGK KGRVKKAHKS KTH
```

//

Figura : Mutazione "G395V" nell'esone4.
Prodotto amminoacidico: 533aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Virtual Sequence: VIRT17721

```
ID VIRT17721 Unreviewed; 461 AA.
AC VIRT17721;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 02-Mar-2010 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 6.53 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT17721; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 461 AA; 51280 MW; 9611B08184D6C4FB CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSHAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFI KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRV KNMLIAFSQN FLCDVVYSPY ATLASFLQRF
EVTVQDLLSS ASVWLFERSDF VKDYPRPIMP NMVFGGGINC LHQNPLSQEF EAYINASGEH
GIVVFSLGSM VSEIPEKKAM AIADALGKIP QTVLWRYTGT RPSNLANNTI LVKWLQNDL
LGHPMTRAFI THAGSHGVYE SICNGVPMVM MPLFGDQMDN AKRMRKAG VTLNVLEMTS
EDLENALKAV INDKRTSCAS PAFTRTARWS RWTWPCSGWS L
```

//

Figura : Mutazione "IVS4 -1 (G>T)" nell'introne4.
Prodotto amminoacidico: 461aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Virtual Sequence: VIRT2244

```

ID VIRT2244 Unreviewed; 533 AA.
AC VIRT2244;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 16-Nov-2009 by imacl20.medrig.unimo.it.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
CC 8.36 PI.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT2244; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 533 AA; 59561 MW; 1D9C5335F85FB547 CRC64.
MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL QQRGHEIVVL
APDASLYIRD GAFYTLKTYV VPFQREDVKE SFVSLGHNVF ENDSFLQRFI KTYKKIKKDS
AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE
FEATQCPNPF SYVPRPLSSH SDHMTFLQRV KNMLIAFSQN FLCDDVVYSPY ATLASEFLQR
EVTVQDLLSS ASVWLFERSDF VKDYPRPIMP NMVFGGINC LHQNPLSQEF EAYINASGEH
GIVVSLGSM VSEIPEKKAM AIADALGKIP QTVLWRYTGT RPSNLANNTI LVKWLQNDL
LGHPMTRAFI THAGSHGVYE SICNGVPMVM MPLFGDQMDN AKRMETKAG VTLNVLEMTS
EDLENALKAV INDKSYKENI MRLSSLHKDR PVEPLDLAVF RVEFVMRHKG APHLRPAAH
LTWYQYHSLD VIGFLLAVAL TVAFITFKCC AYGYRKLCK KGRVKKAHKS KTH
  
```

//

Figura : Mutazione "W461R" nell'esone5.

Prodotto amminoacidico: 533aa; la porzione evidenziata è quella non omologa al WT.

Per una migliore classificazione delle alterazioni genetiche e del prodotto fenotipico che ne scaturisce, abbiamo mappato le mutazioni identificate in ogni paziente sulla sequenza proteica umana di UGT1A1: tali lesioni geniche possono essere la causa di uno shift dello schema di lettura dei nucleotidi, con la conseguente codifica di una porzione proteica non omologa al wild-type e con la formazione di un codone di stop prematuro; inoltre, possono coinvolgere le porzioni attive nel riconoscimento dello splicing tra i diversi esoni del gene, sia nel tratto N-term del sito accettore sia nel tratto C-term del sito donatore; infine, possono determinare un cambiamento critico specifico per un solo amminoacido in tutta la catena proteica, senza modificarne lo schema di lettura e senza provocarne l'interruzione anticipata.

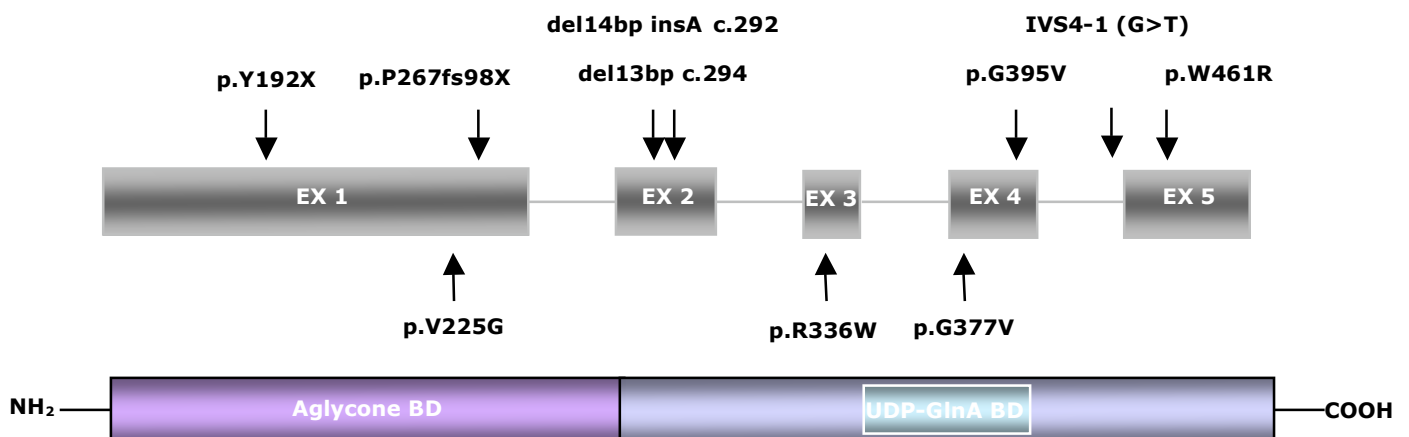


Figura : Mutazioni per la proteina hUGT1A1: porzioni esoniche (aa) e funzionali a confronto.
 Esone1 (1-288); Esone2 (289-332); Esone3 (333-361); Esone4 (362-434); Esone5 (435-533)

Aglycone BD: dominio di legame della molecola accettore

UDP-GlnA BD: dominio di legame della molecola donatore; Cuore Catalitico PROSITE (354-397).

E' interessante vedere che le mutazioni mappano indistintamente in tutte le porzioni del gene, anche se la cerchia di pazienti analizzati è piuttosto ristretta: abbiamo scelto di raggruppare nella porzione alta dell'immagine le mutazioni causative il tipo I e nella porzione bassa le alterazioni genetiche causative il tipo II per i pazienti affetti dalla sindrome di Crigler Najjar.

C.N.	CLINICA	UCB (mg/dl)	UCB/ALB (<0.6)	promotore A(TA) _n TAA	mutazioni UGT1A1	proteina (533aa)	omologia
Tipo IB	PPT, farmaci	12.92	0.32	7/7	(delC)Pro267 fs 98X	364/364	267/267
Tipo IA	PPT, farmaci	20.28	0.62	6/6	del13bp c.294	360/360	295/295
Tipo IA	PPT, farmaci	24.90	0.62	7/7	G395V	533/533	532/532
Tipo IA	PPT, farmaci	21.73	0.62	NP	del14bp insA c.292	360/360	292/292
Tipo IA	PPT, farmaci	16.30	0.49	6/6	W461R	533/533	532/532
Tipo II	OLT	NP	NP	NP	p.R336W / p.G377V	533/533	532/532
Tipo II	PPT, farmaci	18.05	0.46	6/6	p.R336W / p.G377V	533/533	532/532
Tipo II	-	NP	NP	6/7	p.V225G / del14bp insA c.292	533/360	533/292
Tipo II	-	8.07	NP	6/7	p.V225G / del14bp insA c.292	533/360	533/292
Tipo II	variabile	14.02	0.39	NP	R336W / IVS4-1(G>T)	533/461	532/434
Tipo II	farmaci	14.40	0.39	NP	NP	NP	NP
Tipo II	PPT, farmaci	11.10	0.22	NP	Y192X / G377V	191/533	191/532

Tabella : Correlazione genotipo-fenotipo per i pazienti Crigler Najjar italiani.
PPT: fototerapia; OLT: trapianto ortotopico di fegato; NP: non pervenuto.

Per ogni individuo affetto abbiamo riportato in una tabella excel (NP), accanto all'analisi genetica e allo studio del polimorfismo A(TA)_nTAA del promotore, l'approfondimento dei dati clinici: i valori di bilirubina diretta, indiretta e totale; il valore di albumina; eventuali interventi chirurgici; allergie o intolleranze alimentari; ed, ovviamente, le terapie convenzionali adottate: qui, abbiamo riportato una tabella riassuntiva delle principali caratteristiche analizzate.

Per la forma più grave della sindrome (tipo I) è costante la somministrazione farmacologica e l'applicazione notturna della fototerapia, al fine di mantenere circoscritto l'accumulo di bilirubina non coniugata nel siero, limitando il valore di tossicità al di sotto del valore soglia (bilirubina / albumina < 0.6). Queste procedure vengono applicate giornalmente, sia nel caso in cui il paziente abbia la mutazione localizzata nell'esone 1 (tipo IB) che inficia la sola isoforma UGT1A1, sia nel caso in cui il paziente abbia la mutazione localizzata tra l'esone 2 e l'esone 5 (tipo IA), andando ad inficiare così l'attività di tutte le altre isoforme codificate dal locus.

Per la forma meno grave della sindrome (tipo II) l'applicazione della fototerapia e la somministrazione di farmaci sono terapie discutibili e, alle volte, molto variabili: si valuta attentamente il rapporto rischio - beneficio, cercando di ledere il meno possibile la sfera socio-sentimentale del paziente ma mantenendosi in un range di valori di ormai comprovata sicurezza

DISCUSSIONE

PROGENITORI STAMINALI EPATICI NEL RODITORE

Le cellule ovali (*Oval Cells*, OCs) nel roditore sono il corrispettivo dei precursori staminali epatici nell'uomo: soltanto quando il fegato è in una grave fase di danno, le cellule ovali si attivano durante il processo di rigenerazione epatica, dando luogo ad una evoluzione dinamica ove progenitori (PR), cellule ad amplificazione transiente (TA) e cellule mature differenziate si susseguono nel disegno di un vero life-span.

L'analisi di animali trattati con dieta normale (ctr) e con dieta CDE (test) ci ha permesso di chiarire in parte un argomento di grande interesse: l'identificazione e l'isolamento dei progenitori e delle cellule ad amplificazione transiente in un fegato adulto di roditore.

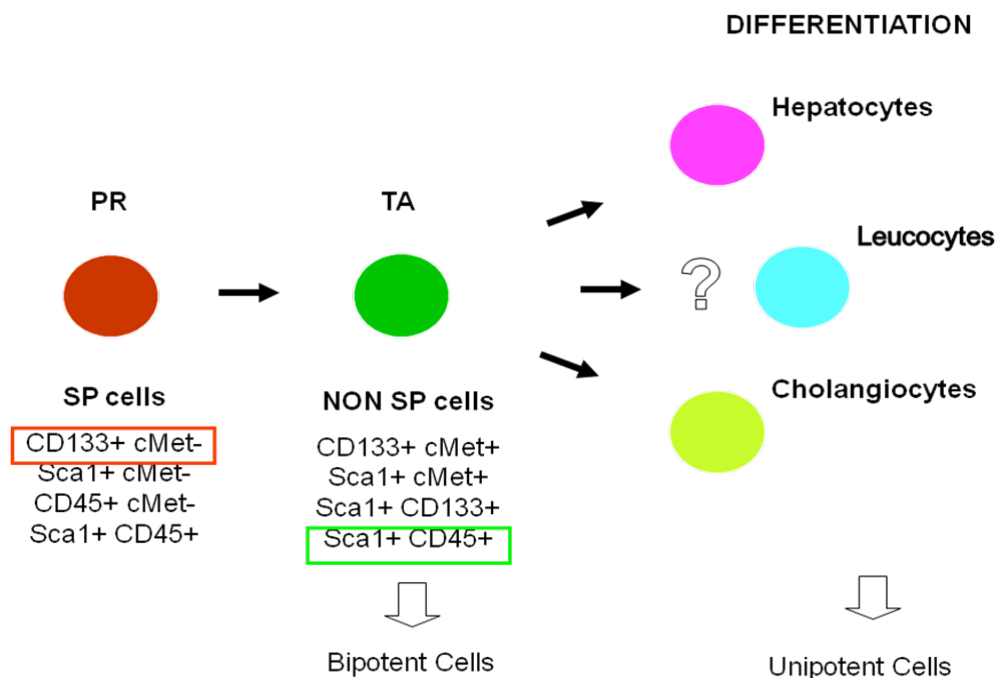


Figura : Life-span delle cellule ovali nel roditore: da PR a TA a cellule differenziate.

I dati raccolti nel nostro studio ci spingono ad ipotizzare che i progenitori non-parenchimali adulti del fegato (PR) siano cellule SP positive al marcatore CD133, normalmente espresso sulla membrana di cellule indifferenziate ed in via di sviluppo. Le cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente (TA), invece, si pensa siano cellule NON-SP enormemente positive ai marcatori Sca1 e CD45, fisiologicamente co-espressi in un'ampia cerchia di cellule bipotenti; durante il differenziamento, tale popolazione cellulare può dare origine sia ad epatociti che a colangiociti, entrambe cellule funzionali ed unipotenti del fegato. I nostri dati, però, non permettono di escludere a priori la possibilità che cellule non-parenchimali epatiche adulte ad amplificazione transiente possano dare origine anche ai leucociti, un sottogruppo di cellule del sangue fisiologicamente positive al marker CD45.

Dati recenti su nematodi e zebrafish suggeriscono che l'endoderma ed alcune porzioni del mesoderma possano avere una origine embrionale comune, derivando da un foglietto cellulare bipotente definito 'meso-endoderma' (Rodaway e Patient, 2001).

L'ipotesi più plausibile è che anche le cellule ovali abbiano origine meso-endodermica: l'espressione di alcuni marcatori mesenchimali potrebbero non evitare, ma più probabilmente facilitare, lo sviluppo verso un fenotipo epatico epiteliale. Più in dettaglio, si è evidenziato il ruolo chiave del fattore di crescita renale BMP7, che facilita la rigenerazione del fegato e regola la proliferazione degli epatociti: come nei fibroblasti renali adulti, si pensa che anche nelle cellule ovali BMP7 svolga il ruolo di 'guardiano epiteliale', inducendo la perdita di espressione dei marcatori mesenchimali e acquisendo gradualmente un fenotipo più propriamente epiteliale. (Yovchev et al, 2008)

CELLULE STAMINALI EPITELIALI NELL'UOMO

Gli olocloni, cioè le cellule staminali epiteliali umane, sono cellule con un'enorme capacità proliferativa, localizzate nello strato basale dell'epidermide: ad oggi, sono note le modalità di isolamento da una biopsia di pelle, le condizioni di crescita in coltura, la biologia e le tempistiche di proliferazione, tanto da poter produrre in vitro un lembo sterile di epidermide, applicabile sul corpo stesso del paziente da cui deriva e capace dunque di curare ulcere croniche od ustioni senza necessitare di terapia anti-rigetto.

La crescita in laboratorio di un lembo di epidermide autologa geneticamente modificata mediante l'utilizzo di un vettore retro-virale ha inoltre permesso la correzione stabile e sicura di un difetto di adesione della pelle, senza conferire alcuna tossicità al paziente anche dopo anni dal trattamento.

Da qui, l'interesse a trovare una strategia alternativa per la sindrome di Crigler Najjar: cheratinociti estratti da diverse parti del corpo umano sono stati analizzati per un profilo di espressione genica e proteica, con lo scopo di indagare un possibile coinvolgimento delle cellule staminali epiteliali per uno studio di terapia genica ex vivo non solo per malattie di pelle, ma anche per altri disordini con origine epiteliale.

Il nostro studio ha permesso di mettere in luce l'espressione sia del gene che della proteina hUGT1A1 nei cheratinociti umani estratti da una biopsia di mammella: questo dato apre una spiraglio di speranza per un futuro utilizzo di questa popolazione cellulare anche per la cura di disordini del fegato.

Ovviamente, essendo la sindrome di Crigler Najjar una malattia genetica, è stato necessario identificare non solo la cellula di elezione per una futura terapia genica ex vivo, ma anche una sicura e permanente strategia di correzione genica. Abbiamo così studiato la possibilità di infettare cheratinociti di pelle con lentivirus SIN per un tempo diverso (3h; 6h; o/n), facendo esprimere loro un gene marker in quantità variabile (molteplici MOI), andando poi ad analizzare dati specifici per l'efficienza di transduzione e la safety di infezione.

Considerando che l'attività di infezione virale dovrebbe risolversi entro le 8h dal contatto virus-cellula, abbiamo ritenuto opportuno valutare la possibilità di ridurre tale contatto al minimo, per minimizzare gli effetti tossici del vettore ma ottenere comunque la massima efficienza di transduzione. Questo è molto importante se si considera inoltre che la % transduzione potrebbe crollare nel caso in cui si introducesse come transgene non un gene marker ma un gene di interesse terapeutico per un trial di terapia genica ex vivo: riteniamo perciò migliore la scelta dell'infezione a 6h, tanto da minimizzare il contatto virus-cellula ma consentendo comunque di mantenere una % transduzione stabile anche per una futura applicazione clinica.

Se poi aggiungiamo la valutazione della % di cellule clonogeniche e la % di cellule abortive ci accorgiamo che i dati relativi alla condizione di infezione a 6h con MOI=10 garantiscono non solo un 85% di efficienza di transduzione su cheratinociti umani cresciuti per oltre un mese, ma soprattutto il perpetuarsi di una popolazione clonogenica (>10%, dato molto migliore rispetto allo stesso MOI per le altre condizioni di infezione: 3h---2%; o/n---6%) con un limitato numero di colonie abortive (<8%). Questo ultimo dato è il più importante, poiché ci permette di valutare la safety di infezione delle cellule trasdotte: a paragone con le altre tempistiche analizzate, soltanto l'infezione di cheratinociti umani con lentivirus SIN integranti a 6h dal contatto virus-cellula con MOI=10 garantisce un'alta % transduzione, una cospicua riserva clonogenica ed una ridotta presenza di colonie abortive.

I dati ottenuti sono preliminari ma certamente incoraggianti: dovranno essere ripetuti su cheratinociti estratti da altri donatori sani, magari valutando altre porzioni del corpo e altre strategie di correzione genica. E' solo un inizio, ma di buon auspicio.

DATABASE ITALIANO DEI PAZIENTI CRIGLER NAJJAR

In un organismo diploide, in cui sono presenti due copie di ogni cromosoma, anche il corredo di ogni singolo gene è doppio: le varianti di sequenza di ogni gene si definiscono 'alleli' e verranno ereditati indipendentemente, una copia dalla madre e l'altra copia dal padre. Nella classificazione genetica di un individuo affetto dalla sindrome di Crigler Najjar è necessario ricordare tale concetto poiché, essendo una patologia autosomica recessiva, se fosse presente un solo allele mutato sarebbe sufficiente la presenza dell'altro allele sano per evitare l'insorgenza del difetto. Lo stesso concetto è valido nella classificazione delle due forme della sindrome: un paziente sarà tipo I se entrambi gli alleli codificano per una forma troncata dell'enzima o se le mutazioni che vi mappano sono già state identificate in altri soggetti aventi la forma grave della patologia; un paziente sarà tipo II se almeno uno dei due alleli ha una variante genica riconosciuta essere responsabile della forma sindromica più lieve.

Un altro elemento chiave per interpretare bene la genetica e correlarla agli effetti fenotipici di ogni paziente è l'analisi del promotore A(TA)₆TAA prossimale del gene: in casi abbastanza frequenti si potrebbe verificare un'inserzione nucleotidica (TA) nella sequenza ripetuta della regione promotrice (i.e. A(TA)₇TAA) andandone a ridurre notevolmente (circa un 20%) l'efficienza della trascrizione genica, generando così un decremento dell'attività glicuronica verso la bilirubina epatica rispetto ai soggetti omozigoti wild-type.

Come è già stato supposto per altri disordini genetici (Kadacol et al, 2000) anche per la sindrome di Crigler Najjar le mutazioni che causano l'interruzione anticipata della catena proteica sono più comunemente associate alla forma più grave della patologia, mentre le mutazioni che comportano una singola sostituzione amminoacidica sono più spesso relazionate alla forma più lieve.

Analizzando la corte di pazienti di questo database ci si può accorgere di come queste linee guida risultano essere veritiere: le alterazioni causative lo shift dello schema di lettura o l'interruzione anticipata del prodotto proteico (i.e. (delC)Pro267fs98X; Y192X; del13bp c.294; del14bp insA c.292; IVS4-1 G>T) sono responsabili di un fenotipo sindromico più complicato mentre sostituzioni singole di un solo amminoacido (i.e. p.V225G; p.R336W; p.G377V) sono più frequentemente associate al fenotipo più lieve.

All'interno delle forme più gravi riveste un particolare interesse la sostituzione amminoacidica p.G395V in quanto mappa nel cuore catalitico PROSITE, regione responsabile del legame all'acido glucuronico. Tale dominio è ampiamente conservato in topo, ratto e tutte le isoforme UGTs dell'uomo: sostituzioni amminoacidiche localizzate in questo tratto di sequenza potrebbero ridurre, più di altre, la capacità di legare e riconoscere il substrato donatore, andando ad inficiare notevolmente l'attività dell'enzima verso la bilirubina e gli altri substrati. Essendo per di più una mutazione collocata nel tratto comune alle altre isoforme del locus, non si può escludere anche un loro coinvolgimento, con una conseguente riduzione complessiva del processo di de-tossificazione, normalmente attuato dalle UGTs in diversi distretti del corpo.

In base alla tipologia della mutazione, alla sua localizzazione nella sequenza genica e al polimorfismo del promotore prossimale ci possono essere alcune considerazioni importanti da fare, sia per un corretto approccio verso le problematiche giornaliere del paziente, sia per approfondire le incertezze per una futura applicazione di terapia genica.

Per tutte quelle modificazioni di sequenza che mappano nella regione comune di UGT1A1 ed inficiano il processo di de-tossificazione di tutte le UGTs codificate dal locus, sarà necessario un occhio di riguardo al paziente, per valutare nel migliore dei modi qualsiasi sintomo di allergia od intolleranza verso farmaci, alimenti o altre sostanze esogene, conoscerne l'effetto e limitarlo nel tempo.

Per tutte quelle alterazioni che si localizzano nella porzione N-term indipendente e che inficiano la sola attività dell'isoforma UGT1A1, sarà necessario valutare bene l'ipotesi di una futura terapia genica in quanto la somministrazione di una proteina non fisiologicamente prodotta (not-self) potrebbe scaturire una importante risposta anticorpale e dunque necessitare di farmaci anti-rigetto.

Il lavoro di classificazione che abbiamo portato avanti in Italia è ancora incompleto ed andrebbe implementato con i dati di altri pazienti europei: soltanto così, allargando il perimetro delle conoscenze genetiche e fenotipiche per la sindrome di Crigler Najjar, si può pensare di approfondire al meglio la correlazione genotipo-fenotipo e dunque ricercare strategie utili per alleviare e migliorare la vita di questi malati.

CONCLUSIONI

Il fegato è un organo con origine epiteliale; le cellule staminali epatiche, ad oggi, non sono state con certezza né identificate né isolate nell'uomo, anche se si pensa essere localizzate nell'interfaccia tra parenchima epatico ed albero biliare e si ritiene essere in grado di attivarsi durante il processo di rigenerazione epatica, dando origine alla reazione duttale.

Come tutti gli altri organi e tessuti del corpo umano, anche la pelle ha al suo interno una nicchia staminale, cioè un comparto prestabilito a proliferare e a differenziarsi in cellule mature in caso di necessità, per tutta l'intera vita dell'individuo. Le cellule staminali epiteliali si localizzano nelle papille dermiche, sono facilmente isolabili da una piccola biopsia cutanea, crescono in coltura mantenendo intatta la loro clonogenicità ed hanno una tremenda capacità proliferativa, che le rende uniche nel loro genere. La generazione in vitro di lembi sterili di epidermide ha permesso di trattare con successo ustioni, ulcere croniche e persino un debilitante disordine genetico della pelle, l'Epidermolisi Bollosa Giunzionale, andando ad applicare sul paziente un lembo autologo di epidermide geneticamente corretto. Questa è la brillante dimostrazione che le cellule staminali epiteliali possono essere applicate con successo in clinica, anche quando geneticamente modificate: il trattamento innovativo è risultato stabile nel tempo, senza conferire tossicità al paziente, ed è dunque considerato ben tollerabile.

La sindrome di Crigler Najjar è una invalidante malattia monogenica del fegato che costringe le persone affette ad un rigido stile di vita riducendone enormemente la qualità, ma senza il quale potrebbero insorgere gravi danni cerebrali e dunque la morte. Per questi pazienti, oggi, l'unica alternativa alla fototerapia è il trapianto di fegato, purtroppo non privo di rischi. L'idea di trapiantare un intero organo, per il resto sano, e la consapevolezza che sarebbe sufficiente solo una attività enzimatica del 10% per conferire a questi malati un migliore stile di vita, ci ha spinto a cercare un'alternativa: le cellule staminali epiteliali di donatori sani sono state indagate per l'espressione genica e proteica dell'enzima hUGT1A1, poiché considerate le cellule di elezione per una futura terapia genica ex vivo per la sindrome di Crigler Najjar.

Sono state tante le motivazioni che ci hanno condotto verso questa strada innovativa: fegato e pelle hanno origini epiteliali comuni; il processo di de-tossificazione svolto dalle UGTs umane avviene anche nella cute; la pelle è il mezzo della fototerapia, poiché proprio nei sinusoidi cutanei si ha la trasformazione tra bilirubina non coniugata e lumirubina; infine, pensando ad una futura applicazione clinica, il lembo trapiantato geneticamente corretto sarebbe esterno al corpo e dunque monitorabile: ciò lo renderebbe molto più sicuro rispetto ad una infusione di cellule all'interno del corpo.

L'espressione genica e proteica di hUGT1A1 nei cheratinociti umani sani di mammella ha aperto uno spiraglio di luce e di speranza ai malati di questa rara patologia genetica per i quali, oggi, non esiste una cura.

L'obiettivo primario sarà quello di verificare tale espressione in altri soggetti sani ed in altri distretti del corpo; cercare nuove strategie di correzione genica, sempre più stabili e sicure; ampliare la classificazione dei pazienti Crigler Najjar su larga scala, spingendosi anche in altri paesi europei, per raccogliere nuovi dati, approfondire ulteriormente la correlazione genotipo-fenotipo e trovare strategie alternative che migliorino la vita di questi ragazzi, in attesa di una futuro trial di terapia genica ex vivo con cellule staminali epiteliali.

BIBLIOGRAFIA

Congenital familial non hemolytic jaundice with kernicterus.

Crigler JF, Najjar VA. 1952. *Pediatric*. 10: 169-180

Inherited disorders of bilirubin metabolism.

Bosma PJ. *J Hepatol*. 2003 Jan;38(1):107-17.

Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease.

Tukey RH, Strassburg CP. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:581-616.

Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. Gong et al. *Pharmacogenetics*. 2001 Jun;11(4):357-68.

Characterization of the UDP glucuronosyltransferase activity of human liver microsomes genotyped for the UGT1A1*28 polymorphism. Zhang et al. *DMD*. 2007 Dec;35(12):2270-80.

Role of cysteine residues in the function of human UDP glucuronosyltransferase isoform 1A1.

Ghosh et al. *Biochem. J.* (2005) 392, 685–692.

Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer.

Nagar S, Rimmel RP. *Oncogene*. 2006 Mar 13;25(11):1659-72.

Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity.

Muraoka et al. *FEBS Lett*. 2001 Apr 20;495(1-2):87-93.

Adaptive evolution of multiple-variable exons and structural diversity of drug-metabolizing enzymes. Can Li, Qiang Wu. *BMC Evolutionary Biology* 2007, 7:69 1471-2148-7-69.

An active and water-soluble truncation mutant of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A9. Kurkela et al. *Mol Pharmacol*. 2004 Apr; 65(4):826-31.

Spectrum of UGT1A1 mutations in Crigler-Najjar (CN) syndrome patients: identification of twelve novel alleles and genotype-phenotype correlation.

Servedio et al. *Hum Mutat*. 2005 Mar;25(3):325.

Management of hyperbilirubinemia and prevention of kernicterus in 20 patients with Crigler-Najjar disease. Strauss et al. *Eur J Pediatr*. 2006 May;165(5):306-19.

Successful pregnancy in a Crigler-Najjar type I patient treated by phototherapy and semimonthly albumin infusions. Gajdos et al. *Gastroenterology*. 2006 Sep;131(3):921-4.

Disruption of the *ugt1* locus in mice resembles human Crigler-Najjar type I disease.

Nguyen et al. *J Biol Chem*. 2008 Mar 21;283(12):7901-11.

Blue light and bilirubin excretion.

McDonagh et al. *Science*. 1980 Apr 11, vol. 208.

Liver cell transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I: update and perspectives.
Lysy et al. *World J Gastroenterol*. 2008 Jun 14;14(22):3464-70.

Hepatic repopulation with stably transduced conditionally immortalized hepatocytes in the Gunn rat. Kawashita et al. *J Hepatol*. 2008 Jul;49(1):99-106.

Liver repopulation with bone marrow derived cells improves the metabolic disorder in the Gunn rat. Muraca et al. *Gut*. 2007 Dec;56(12):1725-35.

Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors. Bellodi-Privato et al. *Hepatology*. 2005 Aug;42(2):431-8.

Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. Nguyen et al. *Mol Ther*. 2005 Nov;12(5):852-9.

Adeno-associated virus vector serotypes mediate sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats. Seppen et al. *Mol Ther*. 2006 Jun;13(6):1085-92.

Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. Toietta et al. *PNAS*. 2005 Mar 15;102(11):3930-5.

Pseudo-hydrodynamic delivery of helper-dependent adenoviral vectors into non-human primates for liver-directed gene therapy. Brunetti-Pierri et al. *Mol Ther*. 2007 Apr;15:732-40.

PEGylated helper-dependent adenoviral vectors: highly efficient vectors with an enhanced safety profile. Croyle et al. *Gene Ther*. 2005 Apr;12(7):579-87.

Update on hepatic stem cells. Alison et al. *Liver*. 2001 Dec;21(6):367-73.

The new stem cell biology: something for everyone.
Preston et al. *Mol Pathol*. 2003 Apr;56(2):86-96.

Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells.
Shafritz et al. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S89-98.

Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.
Petersen et al. *Science*. 1999 May 14. Vol. 284.

Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo.
Lagasse et al. *Nature Medicine*. 2000 Nov. Vol. 6.

The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells.
Wang et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11881-8.

Side population (SP) cells: taking center stage in regeneration and liver cancer?
Forbes SJ, Alison MR. *Hepatology*. 2006 Jul;44(1):23-6.

The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis.
Russo et al. *Gastroenterology*. 2006 May;130(6):1807-21.

The sources of parenchymal regeneration after chronic hepatocellular liver injury in mice.
Vig et al. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2):316-24.

Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair.
Duffield et al. *J Clin Invest*. 2005 Jan;115(1):56-65.

Stem cell therapy for chronic liver disease--choosing the right tools for the job.
Forbes SJ. *Gut*. 2008 Feb;57(2):153-5.

Activation of stem cells in hepatic diseases.
Bird et al. *Cell Tissue Res*. 2008 Jan;331(1):283-300.

Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver.
Yovchev et al. *Hepatology*. 2007 Jan;45(1):139-49.

New cell surface markers for murine fetal hepatic stem cells identified through high density complementary DNA microarrays.
Nierhoff et al. *Hepatology*. 2007 Aug;46(2):535-47.

A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential.
Rountree et al. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10):2419-29.

Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver.
Yovchev et al. *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):636-47.

Stem cells, cell transplantation and liver repopulation.
Oertel M, Shafritz DA. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Feb;1782(2):61-74.

The importance of epidermal stem cells in keratinocyte-mediated gene therapy.
De Luca M, Pellegrini G. *Gene Therapy*. 1997. 4, 381-383.

Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture.
Mathor et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep; 10371-10376. Vol.93.

p63 identifies keratinocyte stem cells.
Pellegrini et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 13;98(6):3156-61.

Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells.
Mavilio et al. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1397-402.

Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy.
Pellegrini et al. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):217-28.

Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery.
Lombardo et al. *Nature Biotechnology*. 2007 Nov. Vol 25.

Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors.
Follenzi et al. *Human Gene Therapy*. 2002 Jan 20. 13:243-260.

Human embryonic stem cell-derived keratinocytes: how close to clinics?
Pellegrini G, De Luca M. *Cell Stem Cell*. 2010 Jan 8;6(1):8-9.

INDICE

PREFAZIONE

INTRODUZIONE

LA SINDROME DI CRIGLER NAJJAR

IL GENE

LA PROTEINA

IL METABOLISMO DELLA BILIRUBINA

FISIO-PATOLOGIA

CLASSIFICAZIONE CLINICA

Sindrome di Crigler Najjar tipo I

Sindrome di Crigler Najjar tipo II

Sindrome di Gilbert

LA DIAGNOSI

IL MODELLO ANIMALE

TERAPIA CONVENZIONALE

Fototerapia

Farmaci

Plasmaferesi

Infusioni di Albumina

Trapianto di Fegato

TRATTAMENTI INNOVATIVI

Terapia Cellulare

Terapia Genica in vivo

Terapia Genica ex vivo

LA RIGENERAZIONE DEL FEGATO

PROGENITORI STAMINALI EPATICI NEL RODITORE

LA RIGENERAZIONE DELL'EPIDERMIDE

CELLULE STAMINALI EPITELIALI NELL'UOMO

PROGETTO DI RICERCA

MATERIALI E METODI

PROGENITORI STAMINALI EPATICI NEL RODITORE

Animali

Isolamento di progenitori non-parenchimali adulti del fegato

Analisi al citofluorimetro e colorazione con Hoechst 33342

Immunofluorescenza

Separazione tramite MACS

Reazione di RT-PCR

CELLULE STAMINALI EPITELIALI NELL'UOMO

Isolamento di cellule staminali epiteliali da biopsia di pelle

Cellule

Transduzione di cheratinociti primari

Analisi per la safety di infezione

Reazione di RT-PCR

Isolamento della frazione microsomale

Western Blot

Test di funzionalità per la glicurono-coniugazione

DATABASE ITALIANO DEI PAZIENTI CRIGLER NAJJAR

RISULTATI

PROGENITORI STAMINALI EPATICI NEL RODITORE

Identificazione di progenitori non-parenchimali adulti del fegato

Identificazione di cellule non-parenchimali epatiche adulte ad AT

Isolamento di cellule non-parenchimali epatiche adulte ad AT

CELLULE STAMINALI EPITELIALI NELL'UOMO

Terapia genica ex vivo con vettori lentivirali SIN integranti

Terapia genica ex vivo con lentivirali SIN non-integranti per le ZFNs

Cellule staminali epiteliali nella terapia genica ex vivo per la C.N.

DATABASE ITALIANO DEI PAZIENTI CRIGLER NAJJAR

DISCUSSIONE

PROGENITORI STAMINALI EPATICI NEL RODITORE

CELLULE STAMINALI EPITELIALI NELL'UOMO

DATABASE ITALIANO DEI PAZIENTI CRIGLER NAJJAR

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

INDICE