

# INTERAZIONE TRA IGF1 ED ESTROGENI NELLA MODULAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE DEI COLANGIOCITI

Dott.ssa VERONICA DRUDI METALLI

Dottorato in EPATOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA  
(Dipartimento di Anatomia Umana, "LA SAPIENZA")

Direttore: Chiar.mo Prof. EUGENIO GAUDIO (Dip. Anatomia Umana , La sapienza)

Tutore: Prof. DOMENICO ALVARO (Dip. Medicina Clinica, La Sapienza)

## Docenti esaminatori:

Prof. EUGENIO GAUDIO (Dip. Anatomia Umana , La sapienza)

Prof. PAOLO ONORI (Dip. Medicina Sperimentale, L'Aquila)

Prof. OLIVIERO RIGGIO (Dip. Medicina Clinica, La Sapienza)

## ABSTRACT:

L'**IGF-1** (Insulin-like Growth Factor) è coinvolto nei fenomeni di crescita, differenziamento e protezione di vari tessuti e parallelamente è noto ormai da tempo che gli **Estrogeni** ricoprono un ruolo di primaria importanza nella regolazione della proliferazione dei colangiociti.

Alla luce di numerosi recenti lavori, che indicano l'esistenza di forti relazioni tra Estrogeni ed IGF1 in diversi tessuti umani, gli **scopi del progetto** sono stati: valutare la capacità dei colangiociti di esprimere l'IGF-1 (e il suo recettore), come tale produzione è regolata, se le cellule sono in grado di rispondere alla somministrazione esogena del fattore di crescita, ed infine le eventuali interazioni tra Estrogeni ed IGF-1 nella modulazione della proliferazione e dell'apoptosi dei colangiociti.

**Risultati:** I colangiociti esprimono l'IGF1 (e il suo recettore) e rispondono proliferando alla sua somministrazione esogena. Nel fegato sono co-esprese più isoforme di IGF1, e la loro espressione varia a seconda dello stato cellulare; gli effetti più drastici sono a carico della specie "locale" (X06107). La produzione basale dell'IGF1 nei colangiociti è sotto l'influsso dell'ormone della crescita (GH). La doppia somministrazione di IGF1 ed Estrogeni ha un effetto additivo sulla stimolazione della proliferazione dei colangiociti in coltura. IGF1 ed Estrogeni hanno un ruolo centrale nei fenomeni protettivi contro l'apoptosi indotta da Sali Biliari. .

**Conclusioni:** La dimostrazione che l'IGF-1 è in grado di potenziare gli effetti degli estrogeni nella modulazione della proliferazione dei colangiociti potrebbe aprire la possibilità di agire su patologie umane caratterizzate da deregolazione della proliferazione dei colangiociti utilizzando modulatori specifici.

Inoltre difendere epatociti e colangiociti dall'apoptosi indotta da sali biliari, magari potenziando il potere citoprotettivo di fattori come l'IGF1 e gli estrogeni in corso di colestasi, potrebbe rappresentare una strategia di protezione dal danno epatico o, di rallentamento della sua progressione.

## INTRODUZIONE

L'albero biliare intraepatico è il bersaglio di numerose patologie colestatiche croniche caratterizzate da una progressiva sparizione dei dotti che porta ad un conseguente stato di severa duttopenia (Desmet V et al 1998 ACP; Desmet V et al 1995; Desmet V et al 1998 KAP); tali malattie sono state recentemente classificate come "Vanishing Bile Duct Syndromes" (sindromi da sparizione dei dotti biliari Boyer JL 1997).

Nel caso delle sindromi da sparizione dei dotti biliari quello che osserviamo, almeno nelle prime fasi della malattia, è che i dotti biliari residui proliferano attivamente, proprio per bilanciare la perdita di funzionalità dell'albero (Desmet V et al 1995).

E' noto ormai da tempo che gli estrogeni (in particolare il  $17\beta$ -estradiolo) ricoprono un ruolo di primaria importanza nella regolazione della proliferazione dei colangiociti (Alvaro D et al 2002; Alvaro D et al 2000).

Tra i fattori di crescita conosciuti, l'IGF-1 viene prodotto principalmente nel fegato, ma nonostante ciò nulla è noto circa la produzione del fattore di crescita e l'espressione del suo recettore da parte dei colangiociti.

Recenti lavori hanno mostrato poi una stretta correlazione tra estrogeni ed IGF-1, e tra i loro recettori, nella modulazione della crescita e differenziamento di diversi tessuti.

Nel cervello di ratti adulti per esempio si è visto come Estrogeni ed IGF1 hanno praticamente le stesse funzioni, ovvero regolano fenomeni come stimolazione neuroendocrina, plasticità sinaptica e risposte neuronali a danni di varia natura (Cardosa-Gomez GP et al 2000; Chan TW et al 2001; Mendez P et al 2003).

Il gruppo di Cardona-Gomez GP et al (2000) ha dimostrato, con un elegante lavoro di tipo immunohistologico e supportato dall'ausilio del microscopio confocale, come l'IGF-Receptor e l'ERbeta siano sempre coespressi in certe zone del cervello di femmina di ratto come: ipotalamo, ippocampo, corteccia celebrale.

Tale colocalizzazione è esclusiva, ovvero: o entrambi i recettori erano presenti, o nessuno dei due; questo a indicare probabilmente che in queste zone i due recettori siano in qualche modo accoppiati nei loro signaling intracellulari.

In un altro interessante lavoro del 2003, il gruppo di Mendez P si spinge più avanti in questo campo, dimostrando come non solo i recettori siano coespressi in certe zone del cervello, ma come essi interagiscano tra loro fisicamente (coimmunoprecipitazione) e chimicamente (transattivazione).

La somministrazione sistemica di Estradiolo a ratti adulti ovariectomizzati infatti si traduce con una transiente coimmunoprecipitazione dell'IGF-Receptor con l'Eralfa e un aumento della fosforilazione dell'IGF-Receptor; entrambi i fenomeni sono reversibili, con un picco tra 1 e 3 ore dalla somministrazione degli estrogeni. A tre ore dal trattamento poi, si osserva anche la coimmunoprecipitazione dell'Eralfa con la subunità da 85 KD dell'IP3-chinasi e con IRS1 (insulin receptor substrate 1), stando ad indicare interazioni molecolari anche a livello postrecettoriale di traduzione del segnale.

Infine, sempre nel lavoro di Mendez P et al (2003), si è visto come il fenomeno fosse in qualche modo specifico per la forma alfa del recettore estrogenico e reciproco, nel senso che anche la somministrazione per iniezione intracerebroventricolare di IGF1 induce la coprecipitazione dei due recettori.

Partendo come base da questi interessanti dati, primario interesse per questo progetto è stato quello di investigare le eventuali interazioni, tra estrogeni ed IGF-1 nella modulazione della proliferazione nei colangiociti (le cellule di nostro interesse), quindi gli obbiettivi iniziali della ricerca erano:

1. valutare la capacità dei colangiociti di esprimere l'IGF-1, il suo recettore e le principali proteine del signaling tramite analisi con RT-PCR qualitativa;
2. valutare eventuali alterazioni nell'espressione dell'IGF-1 e del suo recettore in modelli sperimentali di proliferazione (ratti BDL);

Nella fase più avanzata dello studio siamo poi passati all'analisi più specifica dei meccanismi intracellulari d'azione ed interazione tra le due sostanze e gli obbiettivi specifici sono stati:

3. studiare gli effetti della somministrazione del fattore di crescita sulla proliferazione dei colangiociti in coltura.
4. capire se estrogeni ed IGF-1 hanno un effetto di tipo additivo sulla proliferazione dei colangiociti;
5. studiare i meccanismi di interazione tra IGF-1 ed estrogeni sia a livello recettoriale che post recettoriale (akt, PI-3-chinasi, ERK, Shc, Src;) nei colangiociti di ratto in coltura primaria trattati con le due sostanze.

L'IGF-1 esplica varie ed importanti funzioni fisiologiche nella regolazione del metabolismo di grassi e carboidrati, e oltre a regolare crescita, sviluppo e differenziamento nelle cellule degli organismi superiori possiede spiccate capacità di tipo "protettivo".

I sali biliari che si accumulano negli epatociti in corso di colestasi sono il principale meccanismo di danno apoptotico (Guicciardi et al 2005; Higuchi H, Gores GJ 2003 J hepatol; Higuchi H, Gores GJ 2003 Curr Mol Med).

Per tale motivo i meccanismi attraverso cui i sali biliari causano l'apoptosi degli epatociti e dei colangiociti, ed i meccanismi di resistenza cellulare sono stati oggetto di estese investigazioni che hanno chiaramente dimostrato come:

- i sali biliari attivano in maniera dose e tipo dipendente cascate apoptotiche Fas-dipendenti/indipendenti;
- PI3-kinasi, ed alcune MAP-kinasi, sono indispensabili per la resistenza al danno (Guicciardi et al 2005; Higuchi H, Gores GJ 2003 J hepatol; Higuchi H, Gores GJ 2003 Curr Mol Med).

Che i sali biliari abbiano un ruolo determinante nella progressione negativa di certe patologie è dimostrato dal fatto che l'unico farmaco in grado di ridurre parzialmente il danno epatico è l'acido ursodesossicolico (analogo nonattivo dei sali biliari) il quale agisce riducendo il potenziale citotossico dei sali biliari (Paumgartner G et al 2004).

E' stato recentemente dimostrato da Paumgartner G et al (2004) che in corso di colangiopatie, i colangiociti proliferanti overesprimono IGF1 ed i recettori per IGF1 e che nelle fasi terminali di queste patologie persistono solamente i colangiociti che overesprimono IGF1 ed i suoi recettori. Questi colangiociti residui sono caratterizzati da un bilancio proteine anti/pro-apoptotiche favorevole alle prime e da una attivazione di alcune vie di sopravvivenza come PI3-kinasi/AKT e ERK il tutto verosimilmente mediato da IGF1.

E' stato inoltre visto (Alvaro D, Drudi-Metalli V et al 2005) che questo è associato ad una progressiva riduzione della funzione estrogenica che come è noto è capace di sostenere l'asse GH/IGF1 tanto che queste patologie progrediscono tipicamente dopo la menopausa quando crollano sia livelli di estrogeni che il sistema GH-IGF1.

La capacità di produrre IGF1 e la risposta del fegato al GH decresce con l'età ma quanto questo possa influire sulla sensibilità del fegato al danno è oscuro. Sappiamo inoltre che alcune vie di trasduzione intracellulare del segnale, tra cui PI3-kinasi/AKT ed alcune MAP-kinasi (ERK1/2), sono coinvolte nell'attivazione di meccanismi cellulari di sopravvivenza e di resistenza all'apoptosi, attivati negli epatociti e colangiociti esposti al danno (Guicciardi ME et al 2005; Higuchi H et al 2003 Curr Mol Med; Higuchi H et al 2003), ma quanto l'IGF1 sia responsabile dell'attivazione di queste vie è oscuro.

Lo scopo del nostro lavoro, nella seconda fase, è stato dunque quello di verificare che la produzione di IGF1 da parte dei colangiociti è come per gli epatociti sotto l'influenza dell'ormone della crescita (asse GH-IGF1) e quello di valutare un eventuale ruolo protettivo dell'IGF1 e degli estrogeni nel fegato durante colestasi in modelli in vitro (colture primarie di epatociti e colangiociti trattati con sali biliari) che mimassero la condizione colestatica.

Gli obbiettivi specifici di questa seconda fase sono stati:

1. lo studio dell'espressione del recettore del GH da parte dei colangiociti tramite RT-PCR qualitativa
2. la valutazione dell'effetto della somministrazione del GH sulla proliferazione dei colangiociti
3. la simulazione sperimentale della colestasi, tramite somministrazione di Sali biliari a concentrazioni definite ad epatociti e colangiociti di ratto isolati e tenuti in sospensione per tre ore,
4. lo studio dei livelli di apoptosi tramite kit della caspasi 3,
5. la valutazione ruolo dell'IGF1 e degli estrogeni nella protezione dall'apoptosi tramite somministrazione di inibitori specifici (aIR3 per IGFreceptor, SERM's per ERalfa e/o ERbeta) e tramite silenziamento genico specifico ad opera di siRNA.

Abbiamo detto fin'ora che il principale organo produttore dell'IGF1 è il fegato, ma non sapevamo che ne esistono differenti tipi, in diversi tessuti (Musarò A et al 2001). Il gene del fattore di crescita (localizzato in 7q12-q13 del genoma murino) contiene infatti due diversi promotori che possono dare origine ad altrettanti trascritti primari, i quali a loro volta sono poi soggetti a differenti splicing alternativi (fig. 1).

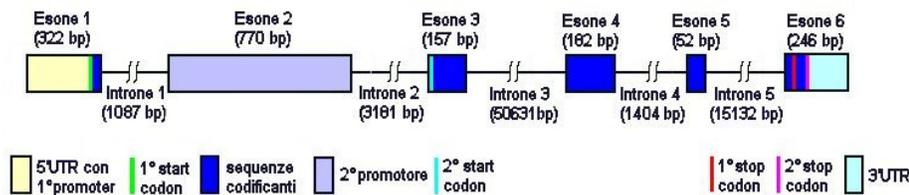


Figura 1: Struttura del gene dell'IGF1 di ratto 7q12-q13.

I trascritti che iniziano dal promotore più a monte (nel 5'UTR, esone 1) sono, principalmente, di origine "extra-epatica" con azione locale, ed hanno effetto anabolizzante sul muscolo scheletrico (Hammed M et al 2003); i trascritti che iniziano dal promotore più a valle (nell'esone 2) sono, principalmente, di origine epatica e rappresentano la maggior quota di IGF1 prodotto nel fegato (quello circolante). Il database genomico Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) riporta le sequenze di tre diversi messaggeri di IGF1 (fig. 2), verosimilmente isolati dal fegato di ratto, con i seguenti accession numbers: NM\_178866, X06107 e X06108.

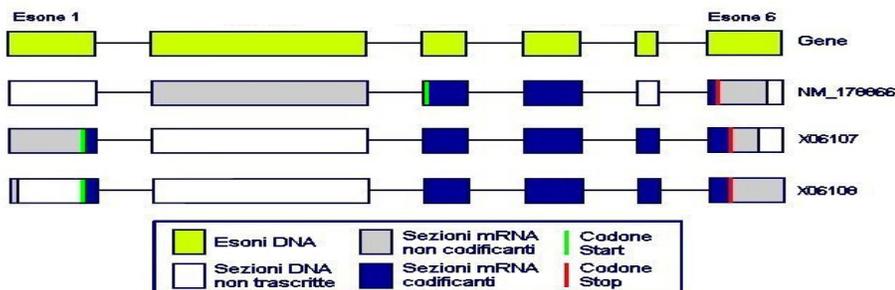


Figura 2: Gene dell'IGF1 (in alto colorato in verde) e suoi trascritti nel ratto, nm\_178866, X06107 e X06108.

Il trascritto relativo alla sequenza NM\_178866 è il tipico trascritto epatico perché ha il codone di inizio della traduzione nell'esone 3 che viene attivato dal 2° promotore. Le altre due sequenze (X06107 e X06108) sono probabilmente forme comuni a vari tessuti perché hanno il

codone d'inizio nell'esone 1 e sono attivate dal promotore nella regione 5'UTR del gene (McCall GE et al 2003).

Studi effettuati su diverse linee cellulari hanno comunque dimostrato che la struttura dei promotori è complessa e contiene elementi di attivazione e di silenziamento specifici per ogni tipo cellulare.

Da ciò si deduce che l'espressione del gene varia col tipo cellulare e con lo sviluppo della cellula e dell'organismo in quanto è soggetta a differenti stimoli endocrini, principalmente ad opera dell'ormone della crescita (Wang X et al 2003; Pfaffl MW et al 2002).

L'interesse per le isoforme di IGF1 deriva dal fatto che alcuni gruppi di ricerca che operano nel settore delle patologie muscolari e del tessuto nervoso hanno recentemente dimostrato che questi tessuti sintetizzano delle isoforme tessuto specifiche di IGF1 che agiscono solo localmente con meccanismo autocrino/paracrino ed hanno un ruolo fondamentale nella riparazione al danno perché modulano tutti i processi cellulari (resistenza all'apoptosi, proliferazione cellulare, reclutamento di cellule staminali residenti, neoangiogenesi ecc.) che sottintendono del processo riparativo (Barton ER. et al 2002; Aperghisa M et al 2004; Musarò A et al 1999; Dobrowolny G et al 2005; Barton-Davis ER et al 1998).

Il risultato di questi studi è che topi transgenici che producono alti livelli di isoforme "locali" muscolare e nervose di IGF1 sono estremamente resistenti al danno e che strategie di infusione di queste isoforme sembrano indurre effetto trofico per tessuto muscolare e nervoso tanto da ipotizzare possibili applicazioni per patologie distrofiche degenerative del tessuto nervoso e muscolare come sclerosi laterale amiotrofica, demenze, distrofie muscolari, cardiopatie dilatative e malattie degenerative del muscolo (Barton ER. et al 2002; Aperghisa M et al 2004; Musarò A et al 1999; Dobrowolny G et al 2005; Barton-Davis ER et al 1998; Barton-Davis ER et al 1999; Kaspar BK et al 2003). Queste strategie terapeutiche sono state già applicate con successo in modelli sperimentali di danno muscolare e nervoso (Dobrowolny G et al 2005; Barton-Davis ER et al 1998; Barton-Davis ER et al 1999; Kaspar BK et al 2003).

Sebbene il fegato sia il principale organo capace di sintetizzare IGF1 in risposta al GH (ormone della crescita) ed è responsabile di oltre il 90% dell'IGF1 circolante (Jones JI et al 1995; Sepp-Lorenzino L et al 1998; Butler AA et al 2001; Giustina A et al 1998; Lupu F et al 2001), nulla è noto sulla espressione delle varie isoforme di IGF1 negli epatociti e nei colangiociti.

L'ipotesi alla base dell'ultima parte del progetto è che nelle prime fasi compensate di malattie il compenso si raggiunge grazie alla capacità di attivazione del sistema IGF1 e dei processi riparativi (resistenza al danno e proliferazione compensatoria) da esso guidati. Con il progredire della patologia epatica, l'esaurimento funzionale del sistema IGF1, tipico della malattie epatiche avanzate, porta alla evoluzione della malattia verso la duttopenia e la distruzione della funzione epatica.

Gli obiettivi dell'ultima parte del progetto sono stati:

1. l'identificazione di diverse isoforme di IGF1 espresse dal fegato,
2. la valutazione di eventuali differenze d'espressione tra isoforme in relazione al progredire di danni epatici nel modello del ratto BDL,
3. la generazione un topo transgenico che sovraesprima una certa isoforma IGF1.

La speranza è che il topo transgenico risulti più resistente al danno epatico, aiutandoci così a chiarire fino in fondo i meccanismi cellulari e subcellulari attraverso cui queste isoforme modulano la "epatoprotezione".

## METODOLOGIA SPERIMENTALE

Nel corso dei tre anni si sono utilizzate diverse tecniche analitiche su diversi modelli sperimentali:

- un modello *in vivo* di colangiociti proliferanti: ratto con legatura del dotto biliare (BDL). Questo modello è stato scelto poiché rappresenta uno dei pochi casi di proliferazione, *in vivo*, dei colangiociti in cui a seconda del tempo sono riconoscibile tutti e tre tipi di proliferazione: tipica (1 settimana), atipica (2-3 settimane) e delle cellule ovali (4 settimane). A differenza dei danni indotti da tossici o alla parziale epatectomia, che sono tecniche generali di danno epatico e sono meno specifiche, la legatura del coledoco permette di avere, almeno nella prima settimana, un'abbondante risposta del compartimento biliare senza contaminazioni da parte degli epatociti e senza eccessivi danni di tipo tossico o infiammatorio.
- un modello *in vitro*, di colture primarie di colangiociti ed epatociti in sospensione per 3 ore senza siero. Il tempo di trattamento è stato scelto in base a due criteri principali: Entro questo periodo i colangiociti in sospensione senza siero, mantengono un ottimo grado di differenziazione e non sono soggetti a fenomeni apoptotici significativi; è il tempo minimo in cui alcuni fattori, tra cui gli estrogeni, riescono ad indurre un aumento della proliferazione dei colangiociti.
- Colonie batteriche

Quindi partendo da questi differenti modelli sperimentali, abbiamo applicato più metodiche e più tecniche analitiche per poter ottenere i vari risultati ricercati negli obiettivi preposti.

I colangiociti e gli epatociti prelevati, tramite perfusione epatica, dal modello di ratto Normale (quiescente) e BDL (quindi proliferante) sono stati isolati e resi puri grazie a “separazione immunomagnetica”.

Le preparazioni sono state effettuate sia a tempi brevissimi (3 ore) che a dopo 1 settimana; questo è stato fatto per valutare le differenze d'espressione genica e proteica tra cellule in cui si è appena instaurata una situazione potenzialmente pericolosa (risposte cellulari a breve termine, 3 ore di legatura) e cellule sottoposte a un tipo di danno prolungato (risposte cellulari a lungo termine, 1 settimana di legatura) che sappiamo indurre proliferazione “tipica” dei colangiociti. Inoltre i campioni puri prelevati dopo 3 ore di legature sono “paragonabili” alle colture cellulari *in vitro* che hanno subito i vari trattamenti per lo stesso tempo.

I colangiociti e gli epatociti isolati da fegato di ratto Normale, quindi quiescenti, messi in coltura “in sospensione” sono stati trattati con varie sostanze.

Le colonie batteriche sono state usate per l'amplificazione di prodotti genici in colture su piastra (terreno solido AGAR) e in colture in sospensione o Mini/Maxi inoculo (terreno liquido LB).

Le preparazioni di colangiociti ed epatociti puri estratti da ratto normale e BDL sono stati trattati, in specifici buffer e secondo le metodiche riportate nella prossima sezione, in modo differente a seconda del saggio da eseguire:

1. Estrazione dell'RNA totale, per RT-PCR qualitative e quantitative, per verificare l'esistenza o quantifica l'espressione genica di una data proteina.
2. Lisati, per immunoelettroforesi quantitative, al fine di studiare la proliferazione e le variazioni dell'espressione delle preteine di nostro interesse.
3. Messa in coltura per tre ore, trattati con GH per valutare sul sovrantante, tramite Kit elisa, la secrezione di IGF1 e poi trattate come punti 1 e 2 per vedere le eventuali differenze nelle risposte di cellule quiescenti (da ratto normale) o proliferanti (da ratto BDL) allo stimolo dell'ormone della crescita.

I colangiociti e gli epatociti isolati da ratti normali, allo stesso modo, sono stati trattati in modo differente a seconda del saggio da eseguire:

1. Messa in coltura per tre ore, trattati con differenti sostanze stimolatorie come IGF1, 17 $\beta$ estradiolo e GH  $\pm$  inibitori specifici; a seguire punto 3.

2. Messi in coltura e trattati con sali biliari come GCDC e TCDC  $\pm$  inibitori specifici di IGFR o ERs, 17 $\beta$ estradiolo o siRNA contro IGF1; a seguire punti 3 e 4.
3. Lisati, per immunoelettroforesi quantitative, al fine di valutare la proliferazione e le eventuali variazioni dell'espressione delle preteine di nostro interesse dopo stimoli specifici.
4. Lisati, per saggiare le variazioni dell'apoptosi.

Per valutare la proliferazione in Western Blot a tempi così brevi (3 ore) si sono scelte due proteine generalmente attivate molto precocemente come il PCNA (Proliferative Cell Nuclear Antigen) e il fosfo-Istone H3.

Viceversa, nel caso dell'apoptosi, si è scelto un Kit per il saggio dell'attività enzimatica della Caspasi 3, anch'essa precocemente attivata nella cascata di eventi che portano alla morte programmata delle cellule in risposta a stimoli specifici.

Infine, per cercare di generare il transgene, da noi immaginato e da immettere stabilmente nel genoma murino, le culture batteriche sono state utilizzate trattate per:

1. "hit-schck" termico per inserire per trasfezione il gene d'interesse all'interno dei plasmidi batterici.
2. MiniPrep, per saggiare effettiva presenza plasmidi e l'efficacia di trasfezione.
3. MaxiPrep, per estrazione finale del plasmide trasfettato.

#### **Materiali e metodi:**

Tutti protocolli utilizzati durante i tre anni di lavoro, con particolare attenzione per il trattamento degli animali di laboratorio, sono tutti in accordo e seguono scrupolosamente le linee guida delle istituzioni.

Le cavie utilizzate sono fornite dalla Charles River Italia (Calco, Italia).

L'anestetico utilizzato per preparare gli animali alle operazioni è il Pentotal Sodium, un prodotto specificatamente veterinario e acquistato dalla Gellini (Italia).

I reagenti per la preparazione delle varie soluzioni ed alcuni inibitori di attività proteica sono, dove non altrimenti specificato, della Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo).

Le soluzioni per la preparazione dei terreni di coltura sono della Gibco-BRL, Life Technologies srl (Milano Italia).

Gli anticorpi primari e secondari utilizzati per Western Blot sono, dove non diversamente specificato, della Santa Cruz (California, USA).

I primer per le analisi PCR sono stati forniti dalla Gibco-BRL, Life Technologies srl (Milano, Italia).

L'anticorpo specifico per bloccare l'attività dell'IGF-Receptor, aIR3, è stato acquistato dalla DBA Italia srl (Segrate, Milano, Italia).

L'antagonista B2036, bloccante per il Recettore del GH, è fornito dalla TCI (Europe, Zwijndrecht, Belgium).

Gli siRNA (small interfering RNA), sono stati acquistati dalla AMBION (Italia).

I macchinari e gli altri materiali, di minor consumo, utilizzati durante il progetto sono specificati nelle prossime sezioni quando utilizzati.

Infine, tutti i materiali di consumo di laboratorio (puntali, provette, cuvette, ecc, ecc) sono stati acquistati alla Tecnochimica Moderna (Roma, Italia).

**Animali, Perfusion e Legatura del dotto biliare:** Ratti maschi, del peso approssimativo di 150-200g, sono stati mantenuti secondo le norme vigenti, nelle migliori condizioni possibili.

Sottoposti a cicli diurni e notturni di 12 ore sono stati nutriti *ad libitum*, con acqua sempre disponibile, fino al momento dell'utilizzo.

Sia la *perfusion* che la *legatura del dotto biliare* sono state effettuate seguendo scrupolosamente i dettagli descritti in precedenti lavori (Alvaro D et al 2000 Gastro; Alvaro D et al 2002 Gastro; Alvaro D et al 2002 Hepatol).

**Perfusione epatica:** E' la tecnica più comunemente usata per prelevare le cellule epatiche vive.

In breve, i ratti vengono preparati tramite iniezione intraperitoneale di 1ml/100g di Pentotal Sodium, preparato come da specifiche, che li fa dormire profondamente nell'arco di pochi minuti. Si effettua quindi un taglio a "V" sull'addome in modo da scoprire la parte inferiore del fegato, e una volta fissati i lembi si può procedere con l'operazione.

Per facilitare l'infusione delle soluzioni, prima di cominciare le manovre di incannulazione, bisogna iniettare 250µl di eparina nella vena cava ed attendere per 1-2 minuti che la stessa vada in circolo.

Passati due fili di sutura sotto la vena porta, a circa 1-2 cm dall'ingresso nel fegato, si procede con l'inserimento della cannula. La manovra è molto delicata, bisogna infatti stare attenti a non rompere le pareti della vena e una volta assicurati di essere "in circolo" (fuoriuscita di sangue venoso dall'estremità libera della cannula) si attaccano i tubi e si comincia la perfusione con la soluzione di lavaggio A\*: praticando un taglio nella vena cava inferiore il sangue e la soluzione da noi introdotta, trovano una via di fuga preferenziale (a bassa resistenza) e si crea così un circolo intraepatico escluso dalla circolazione sanguigna normale. Dopo 5-7 minuti si comincia ad infondere la soluzione B\*\* contenente collagenasi per un tempo di 3-5 minuti.

Alla fine dell'operazione rimane solo da isolare il fegato e metterlo in una provetta contenente la soluzione C\*\*\* a 4°C, in scatola di polistirolo con ghiaccio tritato, per proteggerlo dalla degradazione (proteasi endogene) fino al momento dell'uso (generalmente pochi minuti).

Per la **legatura del dotto biliare** il taglio iniziale è molto più piccolo e si cerca di operare nel modo meno invasivo possibile poiché l'animale deve risvegliarsi al termine dell'operazione e sopravvivere da 1 a 3 settimane prima del sacrificio tramite perfusione epatica.

La legatura del coledoco si effettua appena sopra allo sbocco dello stesso nel duodeno.

\*Soluzione A: Liver Perfusion Medium, pronto all'uso (Gibco-BRL).

\*\*Soluzione B : Liver Digest Medium, pronto all'uso (Gibco-BRL).

\*\*\*Soluzione C : Hank's 1X, preparato diluendo 10 volte un'aliquota di HBS 10X (Gibco-BRL)

**Isolamento delle cellule:** Una volta isolato il fegato si procede con una prima manovra meccanica di separazione delle cellule epatiche sotto cappa:

- si posiziona il fegato in apposite capsule di vetro contenenti Hank's 1X in appoggio su ghiaccio tritato per mantenere la temperatura attorno a 4°C.
- Si "spella" il fegato, eliminando la glissoniana che lo ricopre, con l'aiuto di pinzette ricurve.
- Sempre con l'aiuto di pinzette ricurve, si grattano via gli epatociti nel modo più delicato possibile fino a che non rimane visibile, e quasi completamente "pulito" l'albero biliare intraepatico.

L'albero biliare pulito deve essere ulteriormente sminuzzato meccanicamente con l'ausilio di forbici fino ad essere ridotto in tanti piccoli frammenti della grandezza media 2-3 mm (IBDU, Intrahepatic Bile Duct Units) che possono essere sospese nel terreno D\*.

Gli epatociti che vengono via via eliminati durante la pulizia del fegato vengono mantenuti in Hank'S a 4°C. Con l'ausilio di una garza sterile vengono poi filtrati per eliminare eventuali aggregati. La sospensione di epatociti viene quindi lavata 3 volte con Hank's 1X :

1. centrifuga 10 minuti a 600 rpm
2. si butta il super, che può contenere epatociti morti e globuli rossi, e si mantiene il pellet
3. si aggiunge Hank's 1X e si ripetono le manovre 1 e 2 per 3 volte.

A questo punto si possono sospendere gli epatociti nel terreno E\*\*, e si controlla la vitalità (che non deve mai essere inferiore al 90%) con il trypan blu.

**Colangiociti ed epatociti puri:** I colangiociti e gli epatociti *ultrapuri* sono stati preparati grazie ad una tecnica da anni in uso nei nostri laboratori (Alvaro D et al 2000 Gastro; Alvaro D et al 2002 Gastro; Alvaro d et al 2002 Hepatol; Gigliozzi et al 2004) tramite separazione

immunomagnetica, con una viabilità superiore al 90%. La purezza delle preparazioni è stata confermata tramite RT-PCR per i marker specifici di eventuali cellule contaminanti.

**\*Terreno D:** ogni 30 ml di DMEM-F12 medium si aggiungono: 300µl di MEM non essential, MEMvit, Penstrep e L-Glutamina; si aggiungono anche 75µl di Gentamicina e 25µl di Trypsin inhibitor. Tutte le soluzioni sono fornite dalla Gibco-BRL.

**\*\*Terreno E:** ogni 300 ml  $\alpha$ -MEM medium si aggiungono: 300µl di MEM non essential, MEMvit, Penstrep e L-Glutamina; si aggiungono anche 75µl di Gentamicina e 25µl di Trypsin inhibitor. Tutte le soluzioni sono fornite dalla Gibco-BRL.

**Culture primarie e Trattamenti:** I colangiociti e gli epatociti isolati come specificato sopra e messi rispettivamente nei terreni D ed E sono incubati in assenza di siero per 3 ore a 37 °C. Al momento dell'incubazione a 37 °C vengono aggiunti i vari trattamenti alle concentrazioni indicate:

IGF1 10ng/ml, 17 $\beta$ estradiolo 10nM, GH 50ng/ml,  $\alpha$ IR3 1µg/ml, B2036 20 nM, Ici 182,780 1µM, Wortmannina 25nM, UO126 10µM, GCDC 50/100/1000µM, TCDC 50/100/1000µM, Beauvericina 5µM. Tutte le sostanze utilizzate nei trattamenti sono fornite dalla SIGMA Chemical and Co (St. Luis, Mo).

In alcuni esperimenti le IBDU sono state anche incubate overnight nel terreno E con l'aggiunta dello specifico Small interfering RNA (siRNA) per l'esone 3 dell'mRNA dell'IGF1 50µM (SilencerTM Pre-Designed siRNA; annealed, 20 nMol of standard purità) fornito dalla AMBION per ottenere il silenziamento dell'IGF1. Dopo 14-16 di incubazione le varie capsule sono poi state trattate ancora per 3 ore con: GCDC 1mM, TCDC 1mM, 17 $\beta$ estradiolo 10nM, Ici 182,780 1µM,  $\alpha$ IR3 1µg/ml.

**Preparazione dei Lisati e Determinazione delle Proteine:** Tutti i campioni al termine dei trattamenti sono stati lisati per poter eseguire saggi di tipo immunoelettroforetico.

Le sospensioni cellulari sono state raccolte in diverse provette, siglate con i vari trattamenti eseguiti, e quindi, come da protocollo:

- 1) centrifugare a 3500 rpm per 5 minuti
- 2) buttare il super e risospendere il pellet in 50-200µl di Buffer F\*.
- 3) Sonicare 20 secondi, al massimo della potenza, per 1 volta gli epatociti e per 3 volte i colangiociti.
- 4) Centrifugare a 13000 rpm per 10 minuti
- 5) Recuperare il super e buttare il pellet

A questo punto per la determinazione della concentrazione proteica abbiamo utilizzati il saggio colorimetrico per il dosaggio delle proteine della BIORAD.

**\*Buffer F:** Tris-HCl 20mM, pH=7.4 ; NaCl 150mM; EDTA 5mM, pH=8 ; NP 40 1% or Igepal CA-630 (Sigma I-3021); Inibitori delle proteasi (da aggiungere al momento dell'uso) Aprotinina 10 µg/ml (stock 1mg/ml in PBS) Leupeptin 10 µg/ml (stock 1 mg/ml in PBS) e PMSF 1mM (stock 10mM in etanolo).

**Isolamento dell'RNA:** Preparazione del materiale: le cellule pure (epatociti, colangiociti N e BDL) isolate come precedentemente descritto o frammenti interi di tessuto epatico e muscolare (del peso approssimativo di 30 mg) venivano immersi, immediatamente dopo il prelievo, nel liquido conservante RNALater (Ambion, Inc., Austin, TX). Il materiale veniva quindi tenuto a +4 °C fino all'estrazione, se ciò avveniva entro una settimana. Se il tempo era più lungo, il materiale veniva conservato a -20 °C. Le cellule o i frammenti di tessuto del peso di circa 30 mg venivano trasferiti dalla provetta con RNALater ad una provetta eppendorf vuota.

**Estrazione dell'RNA:** si procedeva quindi all'estrazione dello RNA totale mediante il kit NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Duren, Germany).

Brevemente, il campione veniva omogeneizzato con un pestello di teflon in un apposito tampone preservante, i solidi venivano rimossi per filtrazione e centrifugazione e il DNA contaminante veniva eliminato per incubazione con DNAsi I.

Lo RNA veniva ulteriormente purificato mediante il passaggio su colonnina di L di acqua RNAsi-free. La purezza e la  $\square$ silice e, infine, eluito con 50 quantità dello RNA estratto veniva

valutata mediante il Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germania) equipaggiato con il LabChp RNA6000 Nano. Questa analisi dava luogo ad un elettroferogramma dal quale si risaliva alla qualità (mancanza di frammenti di rilievo oltre alle due bande di rRNA 18S e 28S e valore del rapporto 28S/18S non inferiore a 1.3) e alla quantità dello RNA estratto (Per maggiori dettagli vedere Cantatore A et al 2003).

#### **RT-PCR e real time PCR:**

**Trascrizione inversa:** Una quantità corrispondente a circa 2.5 µg di RNA totale veniva usata per la reazione di trascrizione inversa (RT). Questa veniva eseguita con una versione ingegnerizzata dell'enzima M-MuLV (Invitrogen s.r.l., S. Giuliano Milanese), con il suo specifico tampone, usando come primer un (dT)<sub>15</sub>, secondo quanto descritto dal produttore.

**PCR (Plimerase Chain Reaction):** Per le PCR qualitative sono state scelte condizioni standard: 94°C per 2 min seguiti da 30 cicli (30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 45 secondi a 72°C).

I primer delle sequenze da amplificare sono i seguenti:

**IGF1:** frammento atteso 160pb

Primer up (5'-3'): ttt gcg ggg ctg agc tgg

Primer down (5'-3'): gat cac agc tcc gga agc

**IGF1R:** frammento atteso 650pb

Primer up (5'-3'): aca gtc atc cgt ggc tgg aaa c

Primer down (5'-3'): agt aca tgc tct ggg tgc tgt tg

**IRS1:** frammento atteso 720pb

Primer up (5'-3'): acc atg ggg aca agc ccg gcg

Primer down (5'-3'): ggg gct gct ggt gtt gga atc

**IRS2:** frammento atteso 335pb

Primer up (5'-3'): aca atc ctg act aca ccg ag

Primer down (5'-3'): ctgctt ttc ctg aga gag ac

**real time PCR:** Per le PCR quantitative le amplificazioni sono state condotte in una mix di 25 µL contenenti 1U di Taq Polimerasi Platinum (Invitrogen, gruppo Gibco-BRL), con il suo specifico tampone e una concentrazione finale di Mg<sup>++</sup> 2 mM alle seguenti condizioni: 94°C per 2 min seguiti da 30 cicli (94°C per 30", 55°C per 30", 72°C per 1').

I primer utilizzati in varie combinazioni, per l'identificazione di diverse isoforme di IGF1 e la loro successiva quantizzazione sono i seguenti:

Sezione Gene	Nome Primer	Sequenza Primer (5' -> 3')	Tipo
Esone 1	FEX1RT1	GTT TCC TGT CTA CAG TGT CTG TG	Senso
Esone 1	FEX1RT2	CCT GCG CAA TCG AAA TAA AGT CC	Senso
Esone 1	FEX1RT3	CGA ATG TTC CCC CAG CTG TTT CC	Senso
Esone 1	REX1RT1	TTC AAG AAG TCA CAG AGG CAG ATC	Antis.
Esone 2	FEX2RT1	TCT GAC CTG CTG TGT AAA CGA CC	Senso
Esone 2	FEX2RT2	GCA GGC ATT CAT TTC GCG TTT GG	Senso
Esone 2	REX2RT1	AGG TGC TTG ACA AGG TTG TCT CC	Antis.
Esone 2	REX2RT2	TTA CAT TTG GAC ACC CAG GCA GG	Antis.
Esone 3	FEX3RT1	CTC TTC AGT TCG TGT GTG GAC CA	Senso
Esone 3	REX3RT1	TAA AGG TGA GCA AGC AGA GTG CC	Senso
Esone 4	FEX4RT1	CAT TGT GGA TGA GTG TTG CTT CC	Senso
Esone 4	REX4RT1	ACG AGC TGA CTT TGT AGG CTT CA	Antis.
Esone 5	REX5RT1	CAC CTC TGA TTT TCT GAG TTG CC	Antis.
Esone 6	REX6RT1	TTT TCT GTT CCT CGG GAG GCT CC	Anti.

Tutti i primer e le soluzioni per eseguire le RT-PCR sono forniti dalla Gibco-BRL, Life Technologies srl (Milano, Italia).

**Elettroforesi e Western Blot:** Le elettroforesi in gel di poliacrilammide (dal 7 al 15% a seconda della grandezza della proteina da testare) sono state eseguite tutte con macchinari per MiniGel della BIORAD secondo i protocolli ufficialmente forniti dalla casa produttrice, come anche i Wester Blot.

Gli anticorpi utilizzati per le immunorivelazioni sono i seguenti:

PCNA: mouse monoclonal anti-PCNA (Santa Cruz, 1:400); IGF1-R: rabbit polyclonal anti IGF-receptor (Santa Cruz, 1:400); p-IGF1-R: mouse monoclonal anti p-IGF-R (Cell Signaling Technology 1:500); ER- $\alpha$ : rabbit polyclonal anti-ER-  $\alpha$  (Santa Cruz , 1:400); ER- $\beta$ : rabbit polyclonal anti ER- $\beta$  (Santa Cruz, 1:200 dilution); IGF1: rabbit polyclonal anti IGF 1 (Santa Cruz, 1:500) and mouse monoclonal anti IGF 1 (UPSTATE, 1:500).

Anticorpi secondari: anti-mouse IgG peroxidase conjugated (1:2000; Sigma); anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (1:10,000; Santa Cruz).

Dopo sviluppo radiografico le immagini sono state acquisite tramite scanner (EPSON Perfection 1260) e utilizzate per le analisi densitometriche.

**Culture batteriche:** Infine, per cercare di generare il transgene, da noi immaginato e da immettere stabilmente nel genoma murino, le colonie batteriche sono state utilizzate con diverse tecniche:

1. colture su piastra (terreno solido AGAR), overnight per crescita primaria e selezione colonie resistenti.
2. trasfezione per "hit-schck" termico per inserire transgene all'interno dei plasmidi batterici.
3. Mini inoculo in sospensione (5 ml terreno liquido LB), per 3 ore per prima amplificazione
4. MiniPrep, per saggiare effettiva presenza plasmidi e l'efficacia di trasfezione
5. Maxi inoculo in sospensione (200 ml terreno liquido LB) per amplificazione in grande quantità
6. MaxiPrep, per estrazione plasmide trasfettato.

Il transgene è composto dall'mIGF1 preceduto da uno specifico promotore epatico apoE (Pitas et al forniti da il prof. Antonio Musarò (università di Roma, La sapienza) e dal prof. Robert Pitas (Università di San Francisco).

## RISULTATI

### Espressione genica di IGF1, IGF-R e IRS1/2 nei colangiociti:

Come primo passo del nostro studio abbiamo analizzato se i colangiociti, come gli epatociti, producono l'IGF1 andando a verificare l'espressione del messaggero tramite RT-PCR qualitativa.

Come si vede in figura 19 (pannello A, frammento di 169 pb), effettivamente sia i colangiociti normali (quiescenti) che quelli BDL (proliferanti) esprimono il messaggero per l'IGF1.

Parallelamente ci siamo anche chiesti se possono rispondere alla stimolazione e quindi abbiamo visto se esprimono anche i messaggeri delle principali proteine necessarie per il signaling intracellulare, ovvero l'IGF-R, IRS-1 e IRS2 (figura 3, pannelli B, C e D; frammenti amplificati rispettivamente di 650, 720 e 335 pb).



**Figura 3: Elettroforesi su gel d'agarosio all'1% con i prodotti della RT-PCR qualitativa per IGF1 (A), IGF-R (B), IRS-1 (C) e IRS-2 (D) in colangiociti puri, isolati da ratti normali (N) e BDL; il cervello di ratto (Brain) è stato utilizzato come controllo positivo.**

Quindi l'analisi RT-PCR qualitativa, utilizzando come controllo positivo il cervello di ratto che sappiamo esprimere tutte le proteine da noi ricercate (fig. 3; brain in pannelli A, B, C e D), dimostra chiaramente come i colangiociti puri isolati da ratti normali e BDL esprimono le proteine di nostro interesse, ovvero l'IGF1 e le proteine necessarie per il signaling intracellulare del fattore di crescita.

### Attivazione del sistema IGF1 nel ratto BDL:

Dopo aver dimostrato l'espressione genica delle proteine di nostro interesse, siamo andati a vedere se e come queste subivano variazioni di tipo quantitativo nel modello del ratto BDL.

Tramite analisi in Western Blot abbiamo confrontato l'espressione di IGF1, IGF-R, IRS-1 e IRS-2 in colangiociti normali e BDL.

In figura 4 sono riportati due Western Blot tipo, con i relativi grafici della media degli esperimenti, per l'IGF1 (7 KD) e l'IGF-Receptor.

Possiamo osservare come l'espressione di entrambe le proteine è aumentata nei colangiociti proliferanti (BDL).

Rispetto al livello basale dei colangiociti normali troviamo infatti un incremento di 4 volte dell'espressione dell'IGF1 e 2,5 volte dell'IGF-Receptor.

Un aumento nella quota di espressione è stata ritrovata anche per le due principali proteine del signaling dell'IGF-Receptor, IRS-1 e IRS-2 (fig.5)

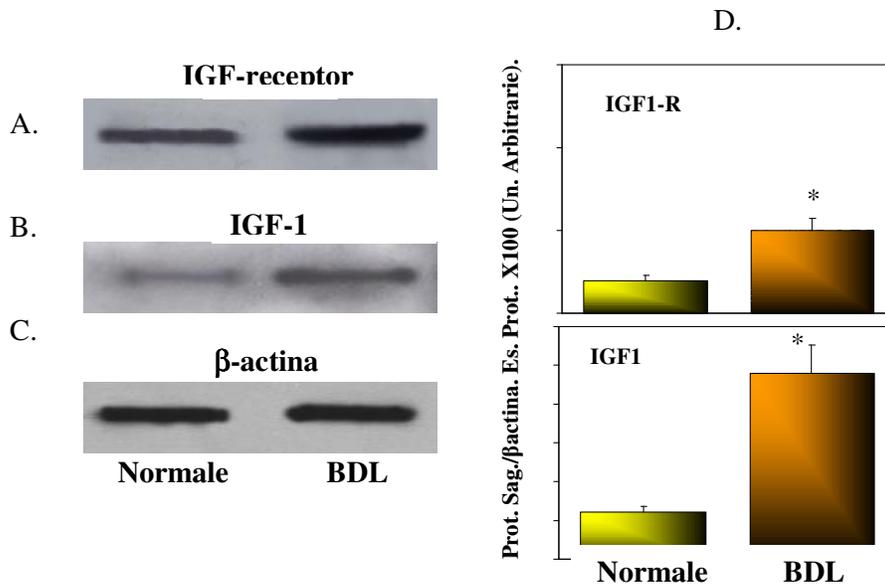


Figura 4: Confronto tramite analisi Western Blot dell'espressione di IGF1 (B) e IGF-R (A) in colangiociti normali e proliferanti (BDL). Come controllo di caricamento e per la normalizzazione negli istogrammi della media degli esperimenti è stata usata la *beta*-actina (C). Nel pannello di destra (D) sono riportati gli istogrammi di normalizzazione della media degli esperimenti: N° esperimenti= 8. \*P<0.01 vs normale.

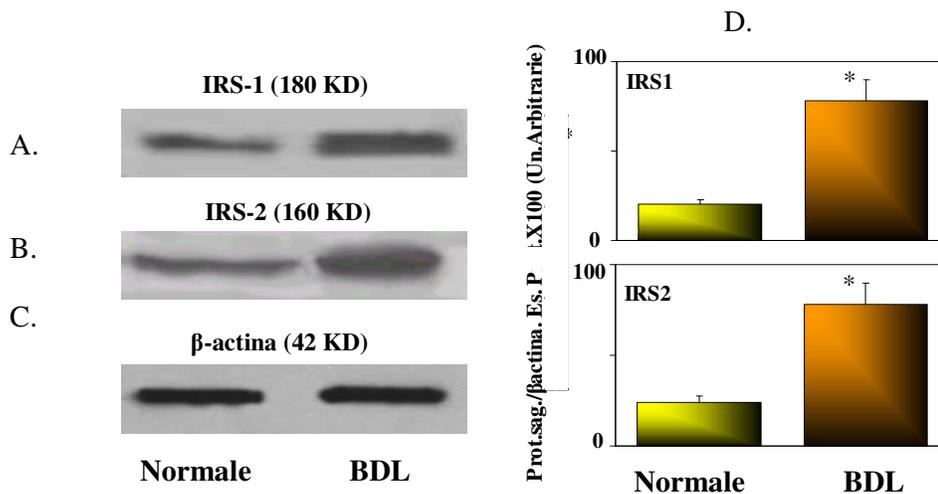


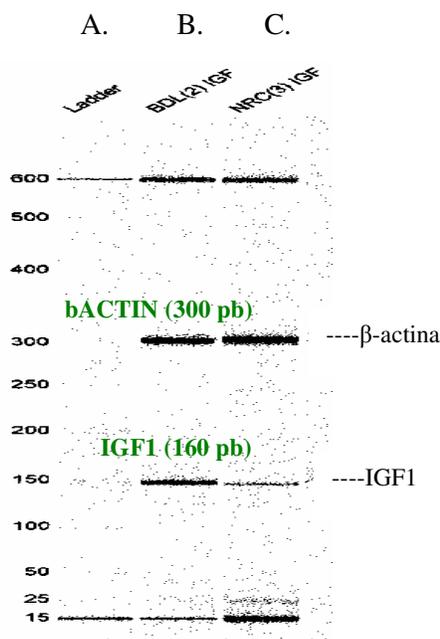
Figura 5: Confronto tramite analisi Western Blot dell'espressione di IRS-1 (A) e IRS-2 (B) in colangiociti normali e proliferanti (BDL). Come controllo di caricamento e per la normalizzazione negli istogrammi della media degli esperimenti è stata usata la *beta*-actina (C). Nel pannello di destra (D) sono riportati gli istogrammi di normalizzazione della media degli esperimenti. N° esperimenti= 8. \*P<0.01 vs normale.

Si vede bene nell'istogramma della media degli esperimenti (pannello di destra D) come sia IRS-1 che IRS-2 subiscono un aumento significativo di circa 3,5 volte durante BDL (colonne arancio) rispetto alla quota riscontrabile nel fegato normale (in giallo).

Nelle primissime fasi del lavoro disponevamo di anticorpo primario anti IGF1 non molto efficiente (Santa Cruz, Goat anti-IGF1), quindi i risultati per questa proteina erano scarsi e spesso incerti.

Prima di riuscire a reperire, dopo diverse prove con anticorpi diversi, l'anti-IGF1 migliore (Santa Cruz, Rabbit anti-IGF1) ci siamo affidati, durante il primo anno, ad una seconda analisi di tipo quantitativo: la *real time* PCR: questo tipo di RT-PCR esprime il numero di copie di un dato gene in relazione al tempo di reazione e, ovviamente, in modo proporzionale rispetto al messaggero disponibile nella cellula al momento dell'analisi.

In figura 6 è riportata l'elettroforesi (immagine trasposta, ricostruita dall'apparecchiatura per PCR quantitative) dell'mRNA dell'IGF1 in cellule normali e BDL, in relazione con il messaggero per la  $\beta$ -actina (controllo interno).



**Figura 6:** Analisi quantitativa della quantità di messaggero per l'IGF1 in cellule normali (C) e BDL (B); Si riconoscono le due bande di IGF1 (160pb) e  $\beta$ -actina (310pb) in relazione alla prima colonna (A) con DNA ladder.

Anche l'RNA messaggero del fattore di crescita è aumentato nelle cellule BDL rispetto ai colangiociti normali, stando ad indicare un aumento della quota di trascrizione genica.

Questo dato, in accordo con quelli ottenuti in Western Blot, conferma che durante proliferazione i colangiociti sovraesprimono l'IGF1, come anche il suo recettore e le due proteine adattatrici del signaling IRS-1 e IRS-2.

E' noto da tempo che durante BDL, nei colangiociti di ratto proteine come le ERK1/2 (Map-chinasi) e Akt (principale substrato della PI3-chinasi) sono indispensabili per la resistenza al danno apoptotico (Guicciardi et al 2005; Higuchi H, Gores GJ 2003 J hepatol; Higuchi H, Gores GJ 2003 Curr Mol Med); inoltre la loro attivazione (fosforilazione) fa parte della cascate di trasduzione del segnale necessario per la attivazione della risposta mitogenica delle cellule eucariotiche.

In figura 7 è riportato il confronto tra cellule normali e BDL dell'espressione del PCNA e delle forme fosforilate di ERK1/2 e Akt., in Western Blot.

Si vede che i colangiociti isolati da ratto BDL, in fase di attiva proliferazione, mostrano uno spiccato aumento dell'espressione del PCNA e l'attivazione delle cascate intracellulari pro-mitotiche e anti-apoptotiche, con un aumento delle forme fosforilate di ERK1/2 e Akt.

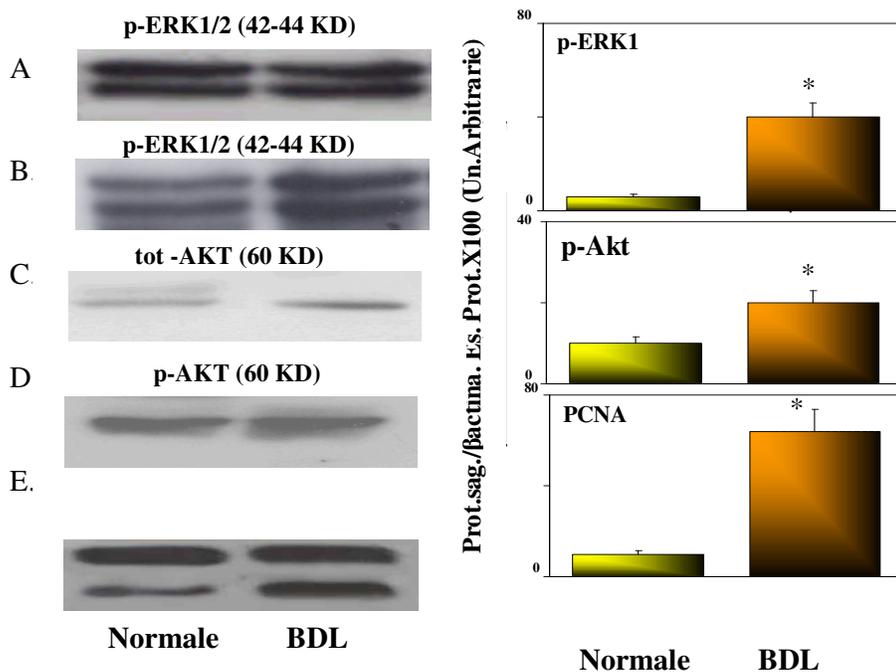


Figura 7: Western Blot per PCNA (E), p-ERK1/2 (B) e p-AKT (D); come controllo di caricamento e per la normalizzazione degli istogrammi è stata usata la  $\beta$ -actina (segnale più alto pannello E). N° esperimenti=8. \*P<0.01 vs normale.

Abbiamo visto che durante BDL le principali proteine del sistema dell'IGF1 subiscono una upregulation dopo una settimana di legatura del dotto biliare, e visto che il signaling intracellulare dell'IGF-Receptor coinvolge generalmente l'attivazione di proteine come ERK e Akt (Jones JJ et al 1995; Sepp-Lorenzino L et al 1998) siamo anche andati a vedere se vi potesse essere una qualche relazione.

In figura 8 vediamo ancora un confronto tra cellule normali e BDL in Western Blot in cui abbiamo rilevato la quota di IGF-Receptor fosforilato, ovvero attivo nella traduzione del suo segnale.

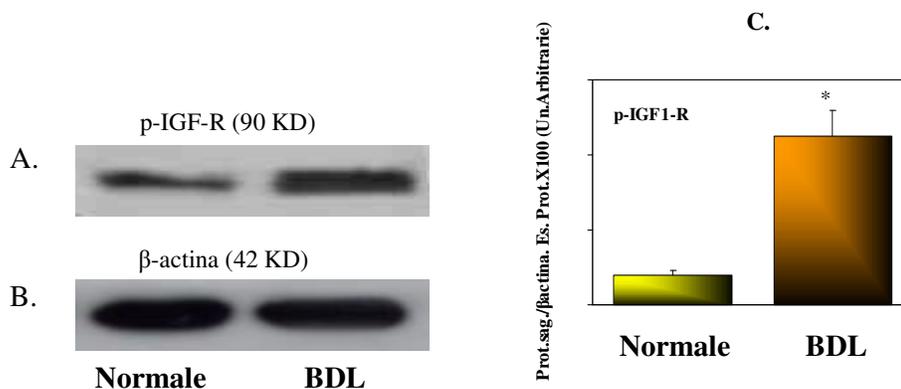


Figura 8: Confronto tramite analisi Western Blot dell'espressione di pIGF-Receptor (A) in colangiociti normali e proliferanti (BDL). Come controllo di caricamento e per la normalizzazione negli istogrammi

della media degli esperimenti è stata usata la beta-actina (B). Nel pannello di destra (C) è riportato l'istogramma di normalizzazione della media degli esperimenti. N° esperimenti= 8. \*P<0.01 vs normale.

Nell'istogramma di normalizzazione della media degli esperimenti si vede bene come la quota di recettore fosforilato aumenta nei colangiociti BDL rispetto al controllo di ben 5,6 volte quindi molto di più rispetto alla quota totale della proteina (2,5 volte); questo indica che vi è un aumento significativo dell'attività del recettore e quindi del signaling intracellulare a valle dello stesso.

Come conclusione possiamo dire che dopo una settimana di legatura del dotto biliare, in una fase di intensa proliferazione dei colangiociti, tutto il sistema dell'IGF1 è attivato.

### Effetto della somministrazione di IGF1 a colangiti isolati di ratto:

Abbiamo appena visto come il sistema dell'IGF1 è attivato durante la proliferazione indotta da legatura biliare, ma è anche vero che in vivo vi sono numerosi fattori regolatori che si attivano contemporaneamente per indurre la risposta compensatoria.

Ci siamo allora chiesti, e siamo andati a verificare, se l'IGF1 fosse in grado di stimolare da solo una risposta proliferativa in colangiociti di ratto isolati e messi in coltura in terreno basale (senza aggiunta di siero e/o fattori di crescita) per 3 ore.

Il tempo di trattamento è stato scelto in base a due criteri principali:

- Entro questo periodo i colangiociti in sospensione senza siero, mantengono un ottimo grado di differenziazione e non sono soggetti a fenomeni apoptotici significativi;
- È il tempo minimo in cui altri fattori di crescita e gli estrogeni riescono ad indurre un aumento del PCNA.

In figura 9 e 10 sono riportati i Western blot dell'esperimento modello con i relativi grafici di normalizzazione della media degli esperimenti.

Il trattamento con IGF1 (10ng/ml) induce da solo l'aumento dell'espressione del PCNA, delle proteine di nostro interesse come anche la fosforilazione dell'IGF-Receptor (fig. 26).

Anche in questo caso l'aumento dell'fosforilazione del recettore (5,8 volte) è maggiore

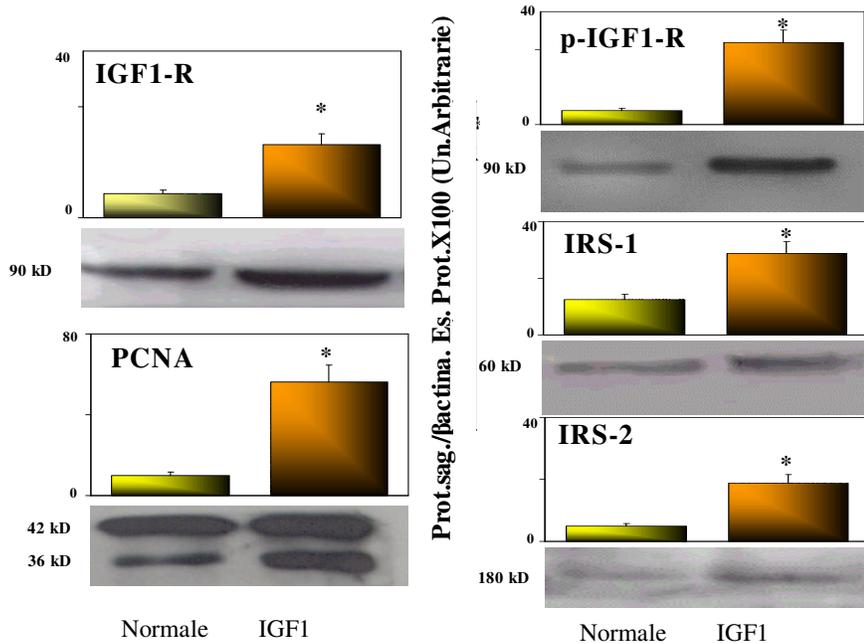
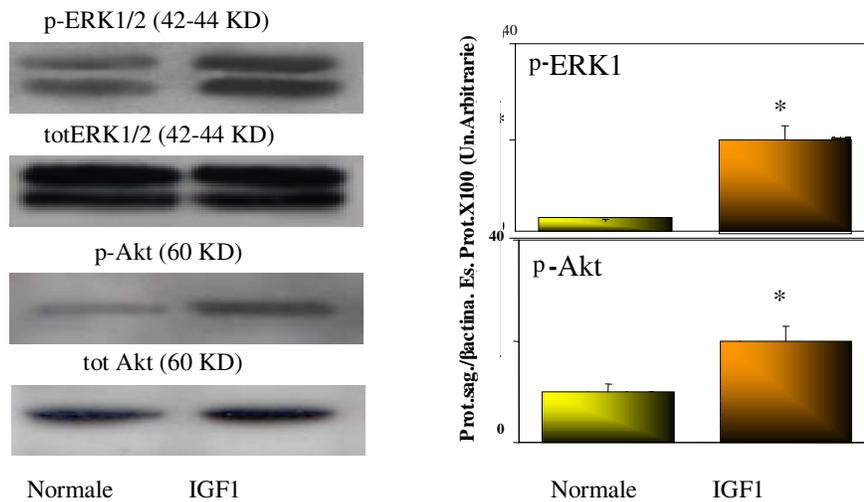


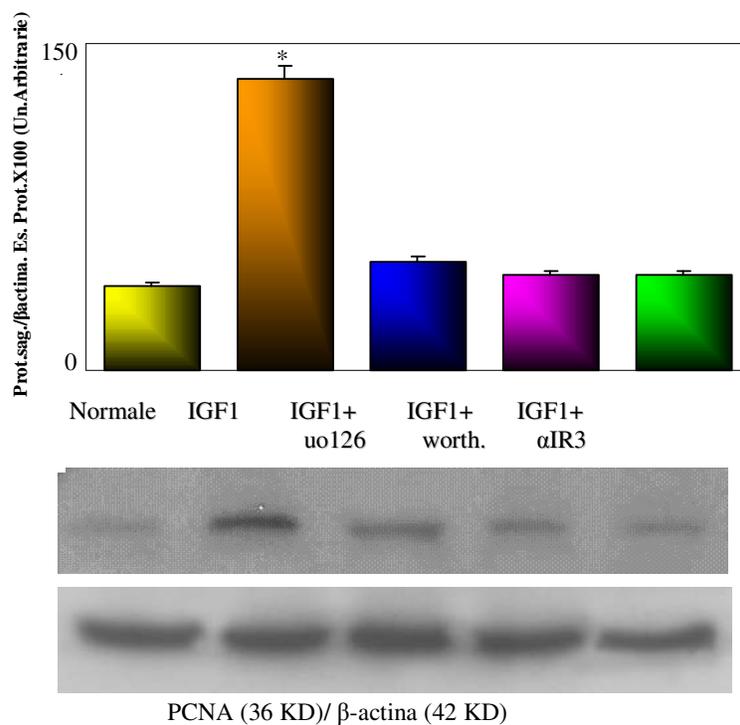
Figura 9: Western Blot e relativi istogrammi della media degli esperimenti (normalizzati per β-actina) per PCNA, IGF-R, p-IGFR, IRS1 e IRS2, in colangiociti normali trattati per 3 ore con IGF1 (10ng/ml). N° esperimenti= 8. \*P<0.01 vs normale.



**Figura 10:** western Blot, e relativi istogrammi normalizzati con  $\beta$ -actina, per p-ERK1/2 e p-Akt, in colangiociti normali trattati per 3 ore con IGF1 (10ng/ml). N° esperimenti= 8. \*P<0.01 vs normale.

Anche ERK e Akt sono fosforilate dalla somministrazione di IGF1 (fig 10) e la loro attivazione è necessaria per l'induzione della proliferazione.

La somministrazione dell'anticorpo bloccante per l'IGF-Receptor ( $\alpha$ IR3, 1  $\mu$ g/ml), dell'inibitore delle Map-chinasi (UO126, 10  $\mu$ M) o dell'inibitore di PI3-chinasi (Worthmannina, 25 nM), si traduce con un blocco dell'aumento del PCNA (fig. 11).



**Figura 11: Western Blot per PCNA; controllo interno  $\beta$ -actina; i colangiociti sono stati trattati per 3 ore con IGF1 con l'aggiunta dei singoli inibitori specifici per le proteine del signaling. N° esperimenti= 3-8. \*P<0.01 vs normale.**

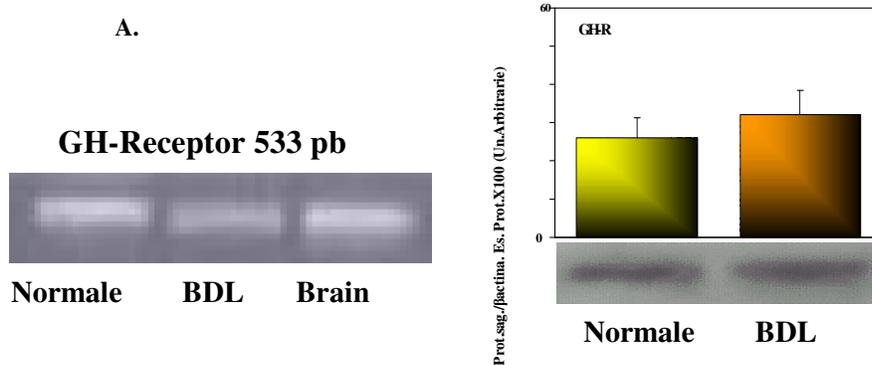
Questo esperimento indica chiaramente che inattivando anche una sola delle proteine del signaling si causa il blocco della proliferazione IGF1-dipendente e che quindi anche nei colangiociti il fattore di crescita utilizza questa via di traduzione del segnale.

**Effetto del GH sulla proliferazione e sulla regolazione della produzione di IGF1 nei colangiociti:**

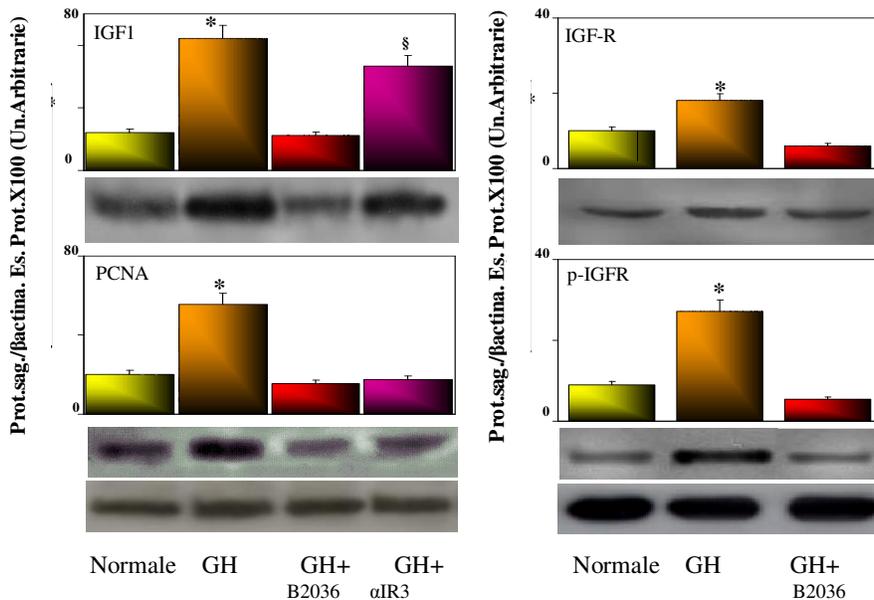
Negli epatociti la produzione e secrezione dell'IGF1 è sotto l'influsso principale dell'ormone della crescita, ma il ruolo del GH in tale modulazione nei colangiociti è sconosciuta.

Visto che l'azione dell'ormone si attua tramite legame con il proprio specifico recettore, come prima cosa siamo andati a vedere se i colangiociti esprimono il GH-Receptor.

In figura 12 si vede che i colangiociti puri, isolati da ratto normale e BDL, esprimono il recettore sia come mRNA che come prodotto proteico.



**Figura 12: Elettroforesi su gel d'agarosio (1%) con i prodotti della RT-PCR qualitativa (A) e Western Blot (B) per GH-Receptor; come controllo positivo per la RT-PCR è stato usato il cervello di ratto (Brain); come controllo controllo di caricamento nel Western Blot e per la normalizzazione degli istogrammi è stata usata la  $\beta$ -actina. N°=3.**



**Figura 13: Western Blot e relativi istogrammi della media degli esperimenti (normalizzati per  $\beta$ -actina) per PCNA, IGF1 (pannello A), IGF-R e p-IGFR (pannello B), in colangiociti normali trattati per 3 ore con GH (50ng/ml, 2nM) +/- inibitore del GHR (B2036) e/o inibitore dell'IGF-R ( $\alpha$ IR3). N° esperimenti=4-8. \*P<0.01 vs normale e GH+inibitori, §P<001 vs normale e GH+B2036.**

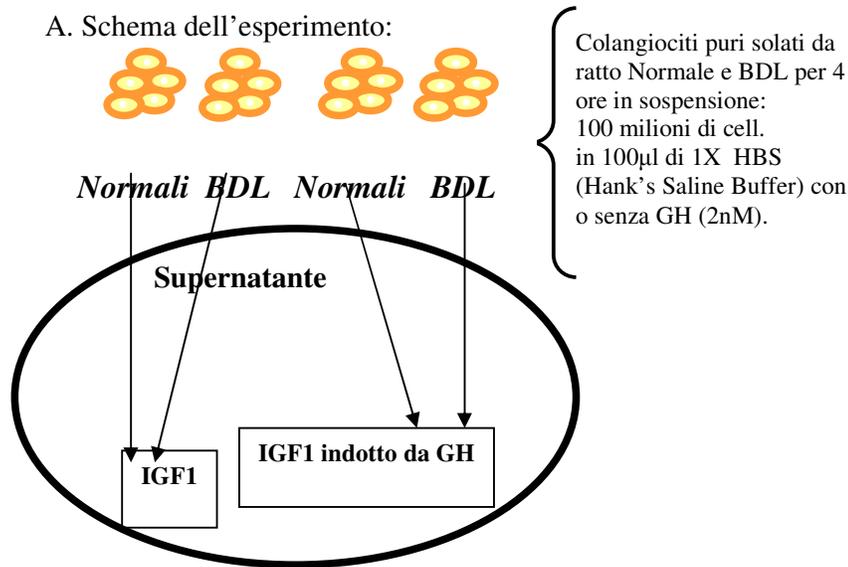
Siamo quindi andati a vedere l'effetto della somministrazione di GH (50ng/ml, 2nM) su colangiociti normali (quiescenti) e isolati da ratto BDL.

Il trattamento a tre ore di colangiociti normali induce la proliferazione come dimostrato dall'aumento dell'espressione del PCNA (fig. 30, pannello A); il GH promuove anche l'espressione dell'IGF1 (fig.13, pannello A), dell'IGF-Receptor e la sua fosforilazione (fig 13, pannello B).

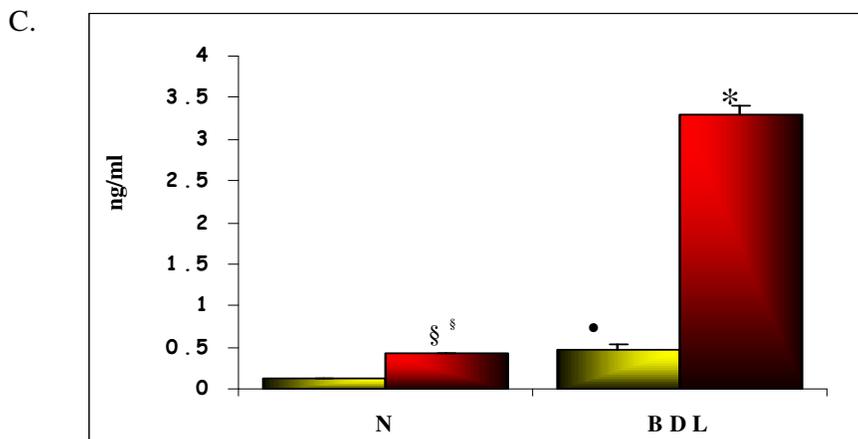
L'effetto stimolatorio sulla proliferazione (PCNA) e sulle proteine testate (IGF1, IGF-R e p-IGFR) è bloccato dalla somministrazione dello specifico inibitore dell'attività del GH-Receptor (B2036, 20nM), viceversa la somministrazione dell'inibitore dell'IGF-Receptor ( $\alpha$ IR3, 1 $\mu$ g/ml) è in grado di bloccare la proliferazione ma non l'aumento dell'espressione dell'IGF1 da parte del GH.

Questi dati suggeriscono quindi che il GH stimola la proliferazione dei colangiociti attraverso l'induzione alla produzione di più IGF1, il quale di contro modula direttamente la proliferazione cellulare.

A conferma di questi dati c'è anche l'effetto della somministrazione del GH a colangiociti puri isolati da ratto normale e BDL e messi in sospensione per 4 ore (Fig. 14).



B. Raccolta del sovrinatante e saggio quantitativo per l'IGF1 (Kit Elisa)



**Figura 14:** Schema dell'esperimento (A) per il dosaggio dell'IGF1 secreto dai colangiociti Normali e BDL; il sovranatante (B) è raccolto dopo 4 ore di coltura in sospensione  $\pm$  GH (2nM), e saggiato tramite Sandwich Kit Elisa (Diagnostic System Laboratories Huston, TX). L'istogramma (C) della media di 7 esperimenti riporta in ascisse i campioni saggiati e in ordinate la quantità di IGF1 secreto, espresso in ng/ml. §P<0.01 vs colangiociti quiescenti non trattati con GH (in giallo), •P<0.01 vs colangiociti quiescenti non trattati con GH (in giallo), \*P<0.01 vs colangiociti BDL non trattati con GH (in giallo).

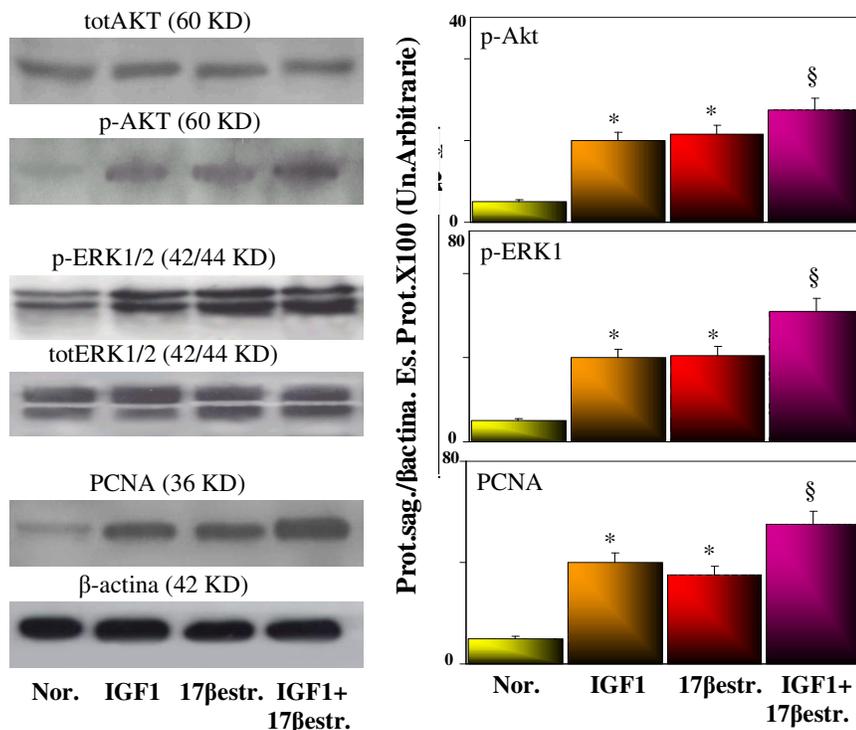
Dopo 4 ore di sospensione alla densità di 100 milioni di cellule/100 $\mu$ l di HBS 1X (Hank's Buffer Saline) la concentrazione di IGF1 nel sovranatante dei colangiociti quiescenti è quasi nulla (0,12 $\pm$ 0,06 ng/ml), mentre nei colangiociti isolati da ratto BDL è 4 volte più concentrato (0,47 $\pm$ 0,21 ng/ml, •P<0.01 vs normali non trattati, in giallo).

Se con le stesse condizioni sperimentali le cellule vengono trattate con GH (2nM) la concentrazione dell'IGF1 secreto dalle cellule normali aumenta di 3,5 volte (0,42 $\pm$ 0,15 ng/ml; §P<0.01 vs normali non trattati) e la secrezione delle cellule BDL aumenta di ben 7 volte (3,33 $\pm$ 0,95 ng/ml; \*P<0.01 vs BDL non trattati).

Questa differenza nella risposta secretoria di IGF1 delle cellule normali e BDL quando trattate con GH (rispettivamente 3,5 e 7 volte di incremento) nasconde probabilmente meccanismi di tipo amplificativi delle cellule proliferanti che dovranno essere approfonditi.

### Interazioni tra IGF1 e 17 $\beta$ -estradiolo nella modulazione della proliferazione dei colangiociti:

Come è noto (Alvaro et al 2000 Gastro) anche l'incubazione per 3 ore con 17 $\beta$ -estradiolo (10 nM) induce nei colangiociti quiescenti l'aumento dell'espressione del PCNA e della fosforilazione delle proteine del signaling ERK1/2 e Akt, indicando la stimolazione a proliferare (barre rosse, fig 15).



**Figura 15:** Western Blot e relativi istogrammi della media degli esperimenti (normalizzati per  $\beta$ -actina) per PCNA, p-ERK1/2 e pAkt, in colangiociti normali trattati per 3 ore con IGF1 (10 ng/ml) e/o 17 $\beta$ -estradiolo (10 nM). N° esperimenti=4-8. \*P<0.01 vs normale; § P<0.05 vs IGF1 o 17 $\beta$ -estradiolo da solo.

Quando i colangiociti normali vengono trattati con entrambe le sostanze (barre viola, fig. 32) l'effetto stimolatorio è maggiore di quello indotto singolarmente (§P<0.05 vs IGF1 o 17β-estradiolo), indicando un potenziamento reciproco nella stimolazione della proliferazione che verosimilmente si attua tramite sentieri intracellulari simili.

In più, la somministrazione dell'estrogeno da solo riesce ad indurre un lieve aumento dell'espressione dell'IGF-Receptor e anche un più significativo aumento della fosforilazione dello stesso (fig. 16).

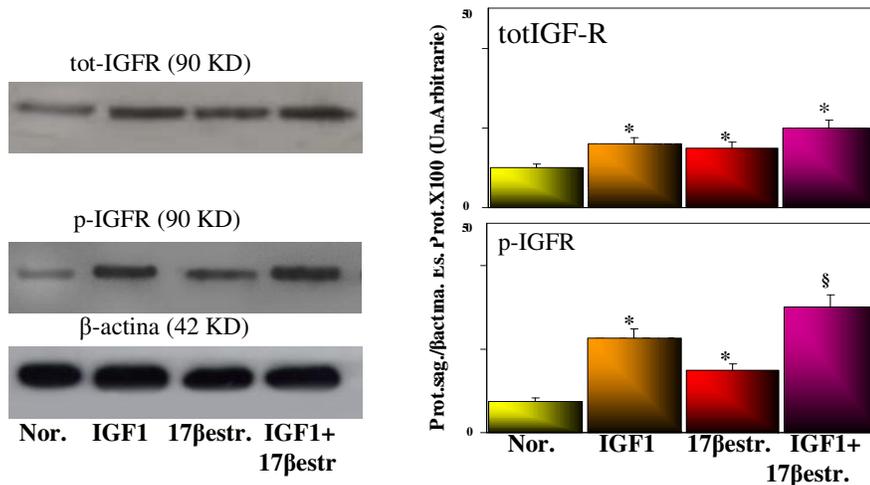


Figura 16: Western Blot e relativi istogrammi della media degli esperimenti (normalizzati per β-actina) per IGF-R e p-IGFR, in colangiociti normali trattati per 3 ore con IGF1 (10 ng/ml) e/o 17β-estradiolo (10 nM). N° esperimenti=4-8. \*P<0.01 vs normale; § P<0.05 vs IGF1 o 17β-estradiolo da solo.

Tale effetto è amplificato dalla doppia somministrazione, dati che presi insieme suggeriscono che le interazioni tra IGF1 ed Estrogeni avvengono sia a livello recettoriale (transattivazione) che post-recettoriale (stimolazione stessi sentieri intracellulari).

Un ultimo risultato conferma l'ipotesi di transattivazione e quindi interazione a livello recettoriale delle due sostanze (fig. 17).

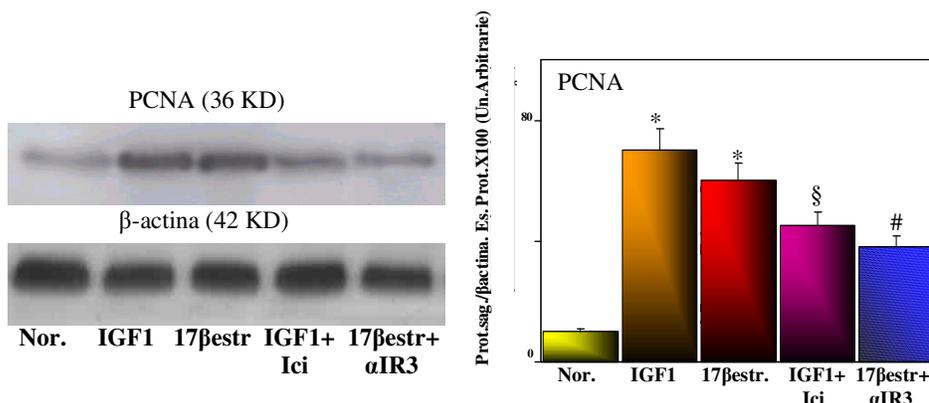


Figura 17: Western Blot e relativi istogrammi della media degli esperimenti (normalizzati per β-actina) per PCNA, in colangiociti normali trattati per 3 ore con IGF1 (10 ng/ml) ± ICI 182,780 (1 μM) o 17β-estradiolo (10 nM) ± αIR3 1μg/ml). N° esperimenti=4-8. \*P<0.02 vs normale; § P<0.05 vs IGF1 da solo; #P<0.05 vs 17β-estradiolo da solo.

L'effetto stimolatorio dell'IGF1 sull'espressione del PCNA nei colangiociti è parzialmente bloccato dalla somministrazione dell'antagonista specifico per i recettori degli estrogeni (ERs), l'Ici 182,780 (1  $\mu$ M) e d'altraparte la stessa stimolazione del PCNA da parte del 17 $\beta$ -estradiolo è parzialmente inibita dalla somministrazione dell'anticorpo bloccante specifico dell'IGF-Receptor, l'alfaIR3 (1 $\mu$ g/ml).

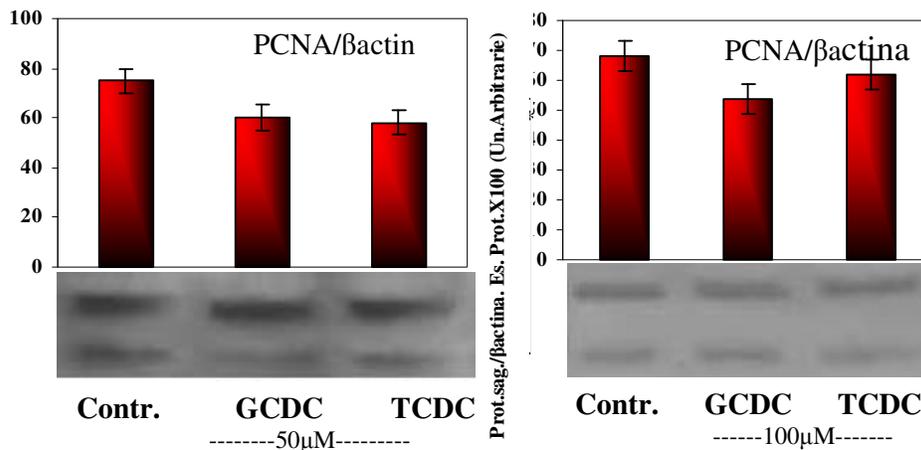
### **Ruolo di IGF1 ed Estrogeni nella modulazione di apoptosi/proliferazione da Sali Biliari su epatociti e colangiociti:**

Sappiamo dunque che i colangiociti di ratto (come anche gli epatociti) esprimono i due recettori per gli Estrogeni (Franacavilla A et al 1989), l'IGF1 e IGF-Receptor.

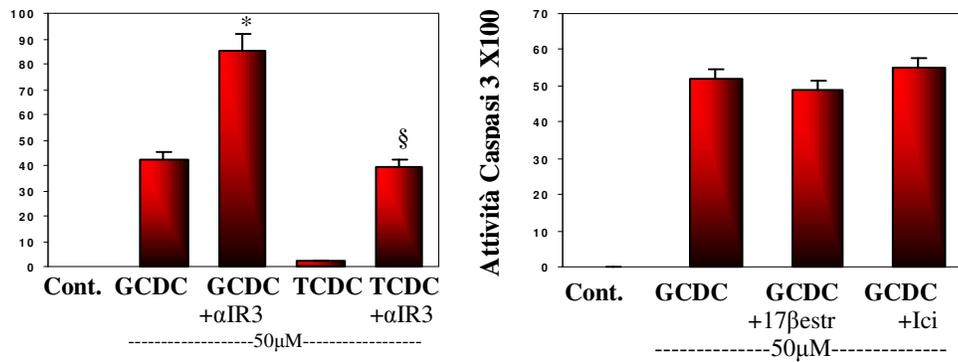
Durante la legatura del dotto biliare, una situazione potenzialmente tossica per tutte le cellule del fegato, i colangiociti sopravvivono e, almeno nelle prime fasi, addirittura proliferano per un meccanismo compensatorio del danno che verosimilmente implica complesse interazione tra le due sostanze e reciproci recettori.

Per studiare i meccanismi alla base delle risposte delle cellule epatiche durante accumulo di sali biliari, abbiamo utilizzato un modello *in vitro* che mimasse la colestasi: abbiamo quindi somministrato ad epatociti e colangiociti in coltura sali biliari per tre ore a concentrazioni scelte in letteratura e che non si allontanano da quelle fisiologiche dei fenomeni colestatici.

La somministrazione per 3 ore, di GCDC e TCDC 50 e 100 $\mu$ M ad epatociti isolati da ratto normale in coltura, non ha effetti significativi sull'espressione del PCNA, e quindi sulla proliferazione (fig. 18), viceversa la quota di apoptosi indotta nelle cellule è dipendente dal tipo di sale utilizzato e viene influenzata dalla somministrazione degli inibitori dei recettori di IGF1 ed Estrogeni (fig. 19).



**Figura 18:** Western Blot e relativi istogrammi della media degli esperimenti (normalizzati per  $\beta$ -actina) per PCNA, in epatociti in coltura trattati per 3 ore con GCDC o TCDC 50 e 100 $\mu$ M. N° esperimenti=4-8, differenze non significative.



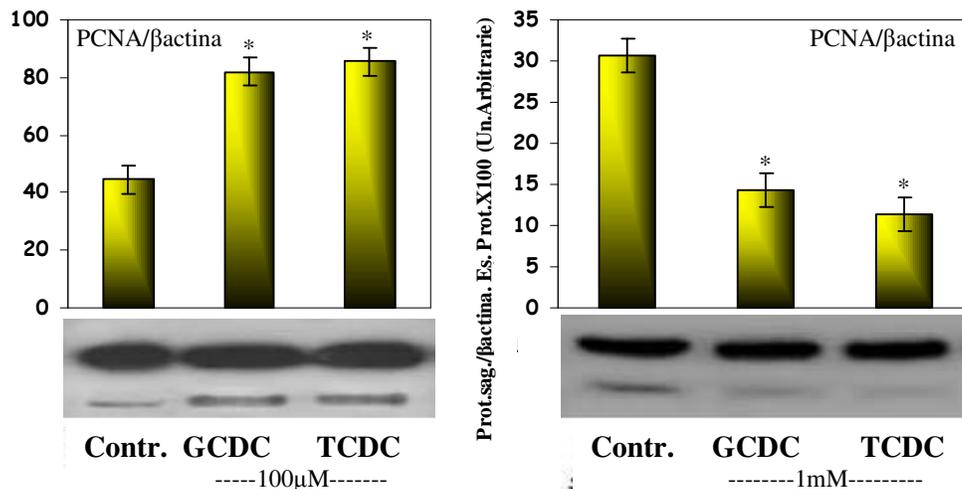
**Figura 19:** Grafico della media di tre esperimenti per la valutazione dell'apoptosi (SIGMA apoptosis assay, kit for caspase3) su epatociti in coltura trattati con GCDC o TCDC (50 μM) ± 17βestradiolo (10nM), αIR3 (1μg/ml) o Ici 182,780 (1 μM) . \*P<0.01 vs GCDC da solo; §P< 0,01 vs TCDC da solo

Il GCDC 50 μM induce l'apoptosi del 42% delle cellule, mentre il TCDC, sempre 50 μM, non ha effetti sugli epatociti in coltura (pannello A, fig. 19).

Bloccando l'attività dell'IGF-Recettor tramite l'anticorpo specifico (αIR3) si osserva che l'apoptosi indotta da GCDC sale all'85% e che anche il TCDC 50μM diventa apoptotico per gli epatociti (39 % di apoptosi).

Sempre in figura 36 (pannello B) si può vedere come sia il 17βestradiolo, sia lo specifico inibitore dell'attività degli ERs, (Ici 182,78) non abbiano nessun effetto sull'apoptosi indotta da GCDC.

In figura 20 vediamo invece l'effetto del trattamento con sali biliari sulla proliferazione dei colangiociti.



**Figura 20:** Western Blot e relativi istogrammi della media degli esperimenti (normalizzati per β-actina) per PCNA, in epatociti in coltura trattati per 3 ore con GCDC o TCDC 100μM 1 mM. N° esperimenti=4-8; \*P<0.01 vs epatociti non trattati (controllo).

Il GCDC e il TCDC alla concentrazione di 100μM inducono un aumento significativo dell'espressione del PCNA, indice che i colangiociti sono stati stimolati a proliferare mentre quando somministrati a 1mM, l'espressione del PCNA diminuisce e tramite saggio

dell'attività della Caspasi3 (fig21), si trova che le cellule sono state indotte ad andare in apoptosi; anche nei colangiociti l'effetto proapoptotico del GCDC è maggiore di quello del TCDC (46% vs 30%, °P<0.05).

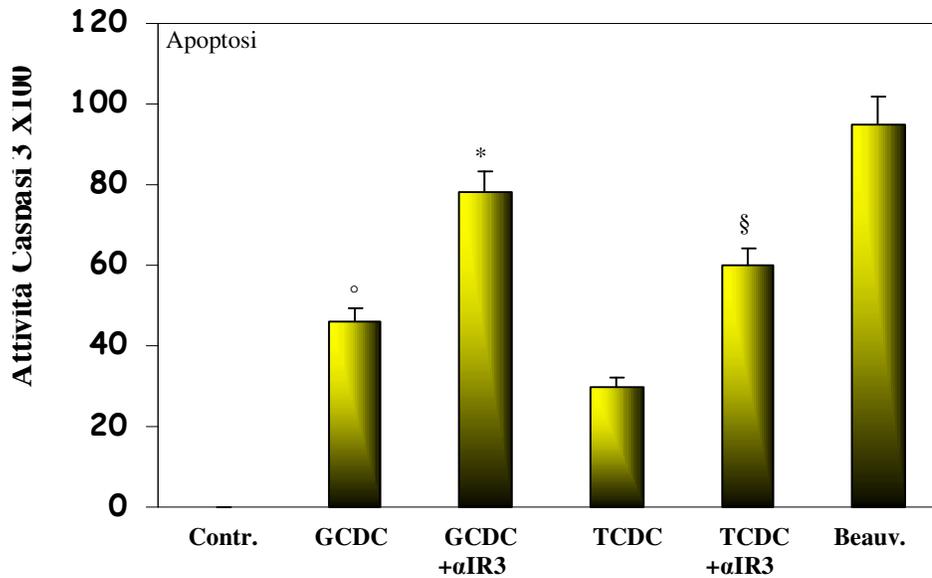
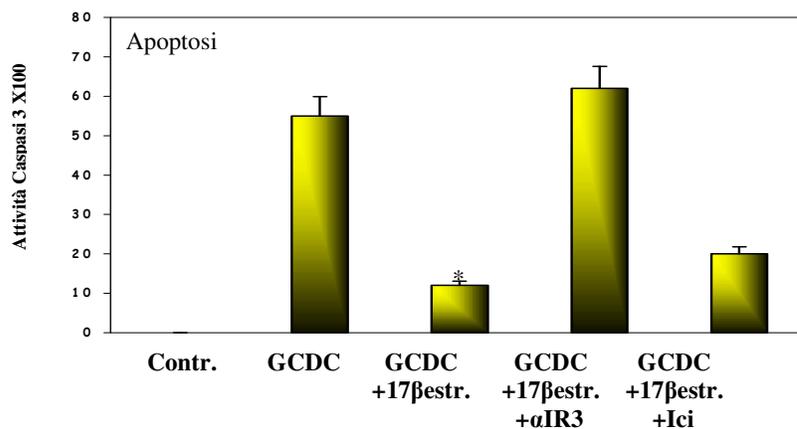


Figura 21: Grafico della media di tre esperimenti per la valutazione dell'apoptosi (SIGMA apoptosis assay, kit for caspase3) su colangiociti in coltura trattati con GCDC o TCDC (1mM) ± αIR3 (1µg/ml); controllo positivo per apoptosi di colangiociti Beauvericina; °P<0.05 vs TCDC; \*P<0.01 vs GCDC da solo; §P<0,01 vs TCDC da solo.

La somministrazione dell'anticorpo contro IGF-R (αIR3) aumenta sia l'apoptosi indotta da GCDC (\*P<0.01 vs GCDC da solo) che quella indotta da TCDC (§p<0.01 vs TCDC da solo), indicando che nei colangiociti, come negli epatociti, il sistema dell'IGF1 ha ruolo fondamentale nella protezione da sali biliari.

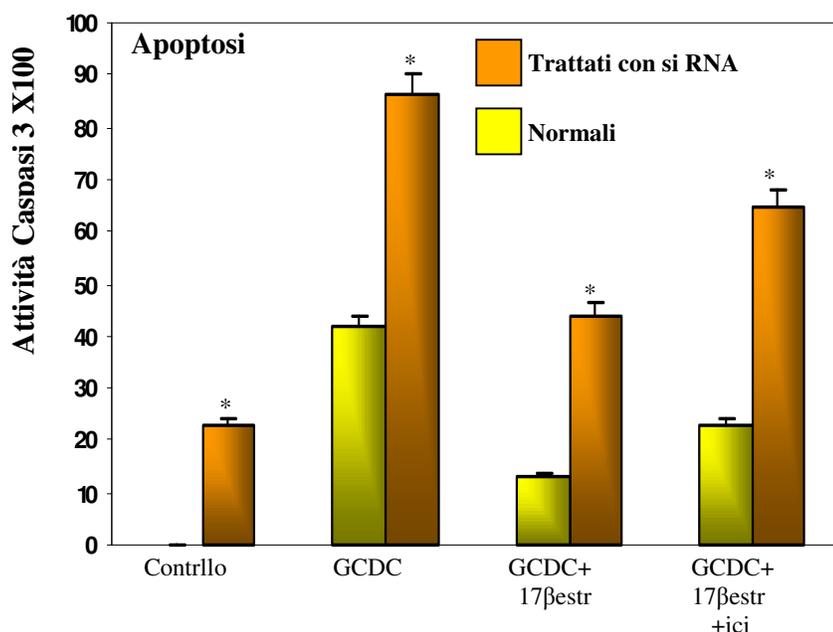
Se alle sospensioni cellulari aggiungiamo gli estrogeni troviamo ancora un effetto protettivo contro l'apoptosi indotta da GCDC 1mM (\*P<0.01 vs GCDC da solo), ma tale effetto non sembrerebbe essere mediato dagli specifici ERs, visto che l'aggiunta di Ici 182,780 non modifica la protezione in modo significativo (fig. 22).



**Figura22:** Grafico della media di tre esperimenti per la valutazione dell'apoptosi (SIGMA apoptosis assay, kit for caspase3) su colangiociti in coltura trattati con GCDC (1mM)  $\pm$ 17 $\beta$ estradiolo,  $\pm$  $\alpha$ IR3 (1 $\mu$ g/ml) o  $\pm$  Ici 182,780 (1  $\mu$ M); \*P<0.01 vs GCDC da solo.

Per meglio capire il l'iterazione tra IGF1, Estrogeni e recettori nella modulazione della protezione da apoptosi abbiamo anche utilizzato lo specifico siRNA antisenso per annullare l'effetto dell'IGF1.

In figura 23 si vede allora che la somministrazione dello siRNA (bande arancio) si traduce in un marcato aumento dell'apoptosi in tutti i campioni trattati (\*P<0.01 vs non incubati con siRNA, in giallo).



**Figura 23:** Grafico della media di tre esperimenti per la valutazione dell'apoptosi (SIGMA apoptosis assay, kit for caspase3) su colangiociti in coltura trattati con GCDC (1mM) e/o 17 $\beta$ estradiolo (10 nM),  $\pm$  siRNA (Silencer™ Pre-Designed siRNA; annealed, 20 nM of standard purity; AMBION) contro l'IGF1; \*P<0.01 vs colangiociti non incubati con siRNA, in giallo.

Il 17 $\beta$ estradiolo sembra esercitare la propria attività protettiva, diminuendo la quota apoptotica indotta da GCDC, in modo Recettore-indipendente (fig. 23), tramite l'attivazione del sistema dell'IGF1 in quanto sensibile al trattamento con  $\alpha$ IR3 (fig 22) e al trattamento con siRNA, contro l'IGF1.

### Studio dell'espressione delle varianti dell'IGF1 in colangiociti ed epatociti di ratto:

L'identificazione delle diverse specie di trascritti è stata effettuata disegnando una serie di primers senso e antisense, posizionati in vari punti del gene e capaci di formare un gran numero di coppie alternative, tali da amplificare ogni possibile trascritto. La precisa dimensione degli amplificati è stata successivamente determinata mediante sizing con il Bioanalyzer 2100 equipaggiato con il DNA500 LabChip (Cantafora A et 2003).

Il database genomico Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) riporta le sequenze di diversi messaggeri di IGF1 di cui, spesso, non è indicato il tessuto dal quale sono stati isolati. Questi messaggeri danno luogo ad almeno 7 trascritti che differiscono per la presenza o meno degli amino acidi (aa) codificati dagli esoni 1, 4 e 5 e per la lunghezza della sequenza trascritta dall'esone 6 (la Tabella 1 riassume le informazioni relative a questi trascritti).

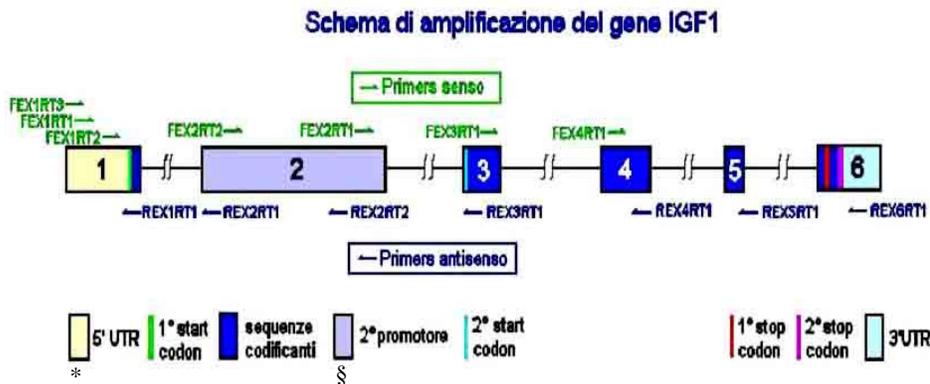
In figura 41 è riportata schematicamente la posizione dei primers nella sequenza del gene e in Tabella 2 sono riportate le sequenze dei diversi primers utilizzati e le condizioni di amplificazione utilizzate.

In Tabella 3 sono riportati i risultati del sizing dei prodotti di PCR nei 4 tipi di prodotti amplificati unitamente ai valori attesi sulla base delle tre sequenze dei messengeri riportati nella banca dati Entrez.

**TABELLA 1:**

Var.	Seq.Proteina	Seq.mRNA	Ex.1	Ex.4	Ex.5	Ex.6	Origine
1	CAA29480.1	<u>X06107</u>	Si	APL	17aa	8aa	Extra-epat
	CAA29481.1	X06108					
2	NP_849197.1	<u>NM_178866</u>	No	VCR	0aa	19aa	Epatica
		M15481					
3	AAA41215.1	M15647	Si	APL	0aa	19aa	Extra-epat
		M15649					
4	AAA41214.1	M15650	Si	APL	47aa	0aa	Extra-epat
		M15651					
5	BAA00604.1	D00698	No	APL	0aa	19aa	Epatica
6	AAA41385.1	M15480	No	VCR	17aa	8aa	Epatica
7	AAA41386.1	M17335	No	APL	0aa	19aa	Epatica
		X06043					

**TABELLA 1:** Varianti della proteina e del messaggero di IGF1 murino riportate in Entrez. Per ogni variante è indicato se il messaggero include o meno la sequenza che codifica l'esone 1. Non è menzionato l'esone 3 che è espresso in tutte le varianti. Anche l'esone 4 è espresso in tutte le varianti ma, in alcuni casi una terna di aa forma la combinazione APL, in altri casi la combinazione VCR. Per gli esoni 5 e 6 è riportata la differente lunghezza del trascritto da ciascun esone.



**Figura 24:** Schema di amplificazione del gene dell'IGF1 di ratto che contiene due diversi promotori, uno nella estremità 5' UTR (\*), l'altro nell'esone 2 (§), dalla cui attivazione si producono differenti trascritti; posizione dei primers nella sequenza del gene.

**TABELLA 2:**

Sezione Gene	Nome Primer	Sequenza Primer (5' -> 3')	Num. basi	Tipo
Esone 1	FEX1RT1	GTT TCC TGT CTA CAG TGT CTG TG	23	Senso
Esone 1	FEX1RT2	CCT GCG CAA TCG AAA TAA AGT CC	23	Senso

Esone 1	FEX1RT3	CGA ATG TTC CCC CAG CTG TTT CC	23	Senso
Esone 1	REX1RT1	TTC AAG AAG TCA CAG AGG CAG ATC	24	Antis.
Esone 2	FEX2RT1	TCT GAC CTG CTG TGT AAA CGA CC	23	Senso
Esone 2	FEX2RT2	GCA GGC ATT CAT TTC GCG TTT GG	23	Senso
Esone 2	REX2RT1	AGG TGC TTG ACA AGG TTG TCT CC	23	Antis.
Esone 2	REX2RT2	TTA CAT TTG GAC ACC CAG GCA GG	23	Antis.
Esone 3	FEX3RT1	CTC TTC AGT TCG TGT GTG GAC CA	23	Senso
Esone 3	REX3RT1	TAA AGG TGA GCA AGC AGA GTG CC	23	Senso
Esone 4	FEX4RT1	CAT TGT GGA TGA GTG TTG CTT CC	23	Senso
Esone 4	REX4RT1	ACG AGC TGA CTT TGT AGG CTT CA	23	Antis.
Esone 5	REX5RT1	CAC CTC TGA TTT TCT GAG TTG CC	23	Antis.
Esone 6	REX6RT1	TTT TCT GTT CCT CGG GAG GCT CC	23	Antis.

**TABELLA 2:** Sequenze degli oligo utilizzati per amplificare le diverse sezioni dei potenziali trascritti del gene IGF1. Tutti gli oligo sono stati disegnati in modo da risultare compatibili tra loro ed essere abbinati in qualunque modo, alle stesse condizioni di amplificazione: 94°C per 7 min seguiti da 30 cicli (94°C per 30 sec, 57°C per 30 sec, 72°C per 1 min) e completati da un'estensione a 72°C per 5 min .

**TABELLA 3:**

Coppia Primers	Seq NM _178 866	Seq. X061 07	Seq. X061 08	Fegato Normale	Fegato BDL	Colangio Normali	Colangio BDL
FEX1RT3- REX1RT1	NA	320	135	135+ 304 <sup>A</sup>	135+ 304 <sup>A</sup>	135+304 <sup>A</sup>	135+304 <sup>A</sup>
FEX1RT1- REX1RT1	NA	304	118	NA <sup>B</sup>	NA <sup>B</sup>	NA <sup>B</sup>	NA <sup>B</sup>
<b>FEX1RT2 - REX1RT1</b>	<b>NA</b>	<b>193</b>	<b>NA</b>	<b>182<sup>C</sup></b>	<b>181<sup>C</sup></b>	<b>182<sup>C</sup></b>	<b>181<sup>C</sup></b>
FEX1RT3- REX2RT1	NA	NA	NA	1500 <sup>D</sup>	1500 <sup>D</sup>	1500 <sup>D</sup>	1500 <sup>D</sup>
FEX1RT1- REX2RT1	NA	NA	NA	NA <sup>B</sup>	NA <sup>B</sup>	NA <sup>B</sup>	NA <sup>B</sup>
FEX1RT2- REX2RT1	NA	NA	NA	1200 <sup>E</sup>	1200 <sup>E</sup>	1200 <sup>E</sup>	1200 <sup>E</sup>
FEX1RT3- REX6RT1	NA	386	201	197+	195+	198+370 <sup>F</sup>	197+370

REX3RT1				370 <sup>F</sup>	368 <sup>F</sup>		<sup>F</sup>
FEX1RT1- REX3RT1	NA	369	184	920 <sup>B</sup>	920 <sup>B</sup>	920 <sup>B</sup>	920 <sup>B</sup>
FEX1RT2- REX3RT1	NA	259	NA	244 <sup>G</sup>	244 <sup>G</sup>	246 <sup>G</sup>	247 <sup>G</sup>
<b>FEX2RT1 - REX3RT1</b>	<b>116</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>	<b>123<sup>H</sup></b>	<b>121<sup>H</sup></b>	<b>122<sup>H</sup></b>	<b>124<sup>H</sup></b>
FEX2RT2- REX2RT2	480	NA	NA	467 <sup>I</sup>	466 <sup>I</sup>	466 <sup>I</sup>	466 <sup>I</sup>
<b>FEX3RT1 - REX4RT1</b>	<b>176</b>	<b>176</b>	<b>176</b>	<b>176</b>	<b>176</b>	<b>179</b>	<b>176</b>
FEX4RT1- REX4RT1	88	88	88	92 <sup>L</sup>	92 <sup>L</sup>	93 <sup>L</sup>	95 <sup>L</sup>
FEX4RT1- REX6RT1	218	270	270	216+ 263 <sup>M</sup>	216+ 263 <sup>M</sup>	216	216
FEX4RT1- REX5RT1	NA	NA	NA	NA <sup>N</sup>	NA <sup>N</sup>	NA <sup>N</sup>	NA <sup>N</sup>

**TABELLA 3:** Size (bp) dei prodotti di PCR ottenuti dalle diverse combinazioni di primers: valori teorici per le sequenze dei trascritti NM\_178866, X06107 e X06108 e valori trovati con i campioni di fegato e colangiociti, normali e BDL. La sigla NA (Non Amplificato) significa che non si prevede teoricamente alcun prodotto di amplificazione ovvero che non c'è stata amplificazione. L'ultima coppia di primers evidenzia l'eventuale presenza della 4<sup>a</sup> variante del messaggero (v. Tabella 1) attraverso la formazione di una banda di 254 bp. **Note:**

<sup>A</sup> Ottenuti due amplificati: uno coincidente col teorico, l'altro inferiore di 16bp.

<sup>B</sup> Tutte le amplificazioni effettuate col primer FEX1RT1 hanno dato valori anomali o NA .

<sup>C</sup> In tutti i casi si è ottenuto un amplificato con un deficit medio di 12 bp

<sup>D</sup> Non doveva aversi alcun amplificato; si è avuta invece una banda anomala di circa 1500 bp.

<sup>E</sup> Non doveva aversi alcun amplificato; si è avuta invece una banda anomala di circa 1200 bp.

<sup>F</sup> Ottenuti due amplificati: uno quasi coincidente col teorico, l'altro inferiore di 16bp.

<sup>G</sup> In tutti i casi si è ottenuto un amplificato con un deficit medio di 14 bp.

<sup>H</sup> In tutti i casi si è ottenuto un amplificato con circa +6 bp (al limite della significatività).

<sup>I</sup> In tutti i casi si è ottenuto un amplificato con un deficit medio di 14 bp.

<sup>L</sup> In tutti i casi si è ottenuto un amplificato con circa +5 bp (al limite della significatività).

<sup>M</sup> L'amplificato di 263 bp è molto debole.

<sup>N</sup> L'assenza di amplificazione conferma la mancanza del trascritto alternativo M15650.

Considerato che il sizing degli amplificati mediante il Bioanalyzer ha un margine di incertezza di  $\pm 4$  bp, è evidente che diversi amplificati si discostano significativamente dai valori attesi (discrepanze sono evidenziate nelle note della stessa Tabella 3).

I risultati delle determinazioni riportate in Tabella 4 indicano che vi sono amplificati a singola banda che possono derivare da uno specifico trascritto oppure dalla combinazione di più trascritti.

In particolare, l'amplificato con i primers **FEX1RT2-REX1RT1** (size atteso: 193 bp, trovato 182 bp) deriva da una sequenza uguale o simile alla **X06107**, l'amplificato con i primers **FEX2RT1-REX3RT1** (size atteso: 116 bp, trovato 124 bp) deriva da una sequenza simile o uguale alla **NM\_178866**, mentre i primers **FEX3RT1-REX4RT1** (size atteso: 176 bp, trovato 176 bp) dovrebbe provenire da qualsiasi trascritto e quindi rappresenta **l'IGF1 totale**.

Sono stati quindi effettuati i dosaggi quantitativi di questi amplificati mediante real-time PCR per rappresentare, rispettivamente, alcuni messaggeri in cui è trascritto l'esone 1 (ma non l'esone 2), alcuni messaggeri in cui è trascritto l'esone 2 (ma non l'esone 1) e il totale dei trascritti.

A tal fine sono stati isolati e purificati i tre prodotti in questione dagli amplificati di RNA totale estratto da epatociti e colangiociti puri isolati da ratto normale e BDL (1 settimana). Tali prodotti sono stati quantizzati mediante il Bioanalyzer e ne sono state preparate varie diluizioni scalari contenenti da  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^4$  copie per microlitro.

Le varie diluizioni sono state utilizzate per preparare tre diverse curve standard: numero di copie vs ciclo soglia (ciclo al quale la real-time PCR rivela la formazione dell'amplificato), mediante le quali si quantizza in modo assoluto il numero di copie del messaggero per microlitro in ciascuno dei 4 cDNA esaminati.

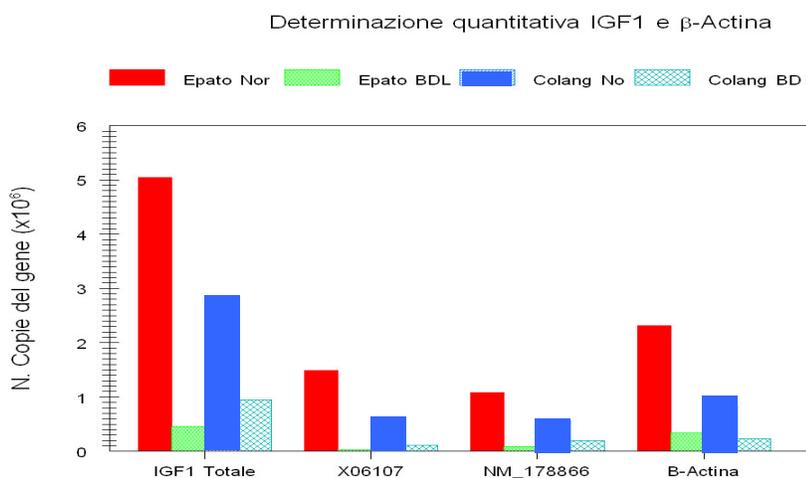
Si è quantizzato anche il gene della  $\beta$ -actina come parametro di riferimento e normalizzazione dei dati di espressione del gene IGF1.

I dati ottenuti sono riportati in forma tabulare in Tabella 4 e, come grafico, in figura 25.

**TABELLA 4:**

Messaggero	Size (bp)	Epatoc. Norm (n.copie/ $\mu$ L)	Epatoc. BDL (n.copie/ $\mu$ L)	Colangio Norm (n.copie/ $\mu$ L)	Colangio BDL (n.copie/ $\mu$ L)
X06107	193	$1.49 \times 10^6$	$2.30 \times 10^4$	$5.98 \times 10^5$	$1.07 \times 10^5$
NM178866	116	$1.08 \times 10^6$	$9.19 \times 10^4$	$5.72 \times 10^5$	$1.93 \times 10^5$
IGF1 totale	176	$5.05 \times 10^6$	$4.58 \times 10^5$	$2.72 \times 10^6$	$9.46 \times 10^5$
$\beta$ -actina	492	$2.31 \times 10^6$	$3.37 \times 10^5$	$8.33 \times 10^5$	$2.38 \times 10^5$

**TABELLA 4 – Determinazione quantitativa delle copie del messaggero del gene IGF1 e del gene  $\beta$ -Actina in ciascuno dei 4 tipi di campione esaminati (per  $\mu$ L di cDNA)**



**Figura 25: Istogramma di amplificazione quantitativa (real-timePCR) del gene dell'IGF1 totale di ratto, della variante epatica (NM\_178866), di quella extraepatica (X06107) e della  $\beta$ -actina. In ascisse troviamo le specie analizzate, in ordinate il n° di copie ottenute ( $\times 10^6$ ). Il colore delle bande rappresenta i diversi campioni utilizzati: ROSSO, epatociti normali; VERDE, epatociti BDL; BLU, colangiociti normali; CELESTE, colangiociti BDL:**

Da questi dati si vede chiaramente che il gene IGF1(totale) ha un andamento parallelo a quello del gene della beta actina e quindi non è necessario apportare normalizzazioni o correzioni dei valori.

Risulta quindi evidente che nei campioni BDL si riduce la proporzione del messaggero X06107, ma non quella del messaggero NM\_178866 rispetto ad IGF1 totale.

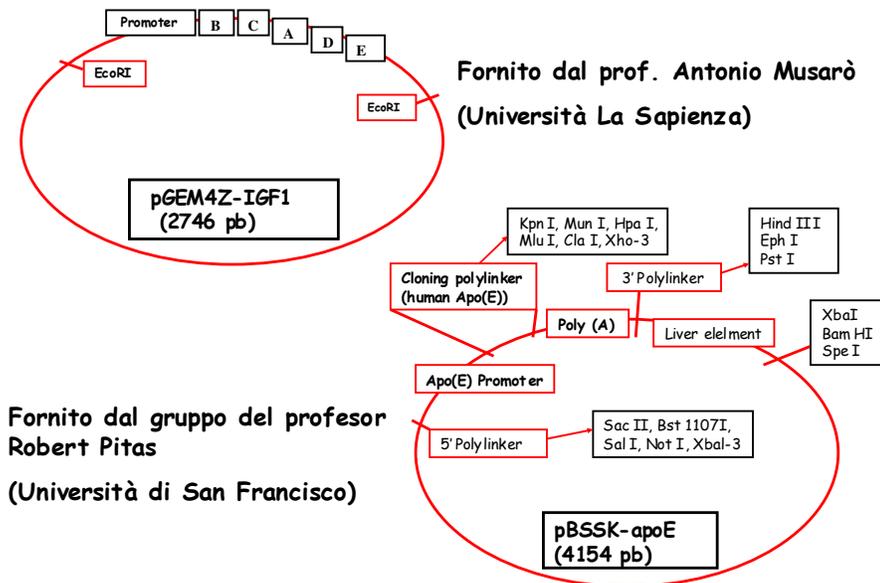
Infatti, la proporzione di X06107 su IGF1 totale è, rispettivamente: 29.5%, 5.02%, 21.99% e 11.31% negli epatociti normali, epatociti BDL, Colangiociti normali e colangiociti BDL. Invece, la proporzione di NM\_178866 su IGF1 totale è, rispettivamente: 21.4%, 20.1%, 21.03% e 20.4% negli epatociti normali, epatociti BDL, Colangiociti normali e colangiociti BDL.

Si osserva ancora che la somma dei messaggeri X06107 e NM\_178866 raggiunge, nel migliore dei casi, il 50% della valore ottenuto per IGF1 totale. E' probabile che manchi in questo computo il contributo di altri messaggeri, è però difficile stabilire quanto manchi esattamente alla quadratura dei conti perché gli errori analitici in questo tipo di determinazioni sono piuttosto elevati.

### Creazione del transgene

Tramite tecniche di ingegneria genetica su colture batteriche e supportati dal gruppo del prof. Antonio Musarò, abbiamo generato a partire da due vettori distinti il transgene da inserire nel genoma murino per creare un topolino che sovraesprima l'isoforma locale dell'IGF1 (X06107). Tale isoforma coincide con l'mIGF1, il gene appunto utilizzato dal gruppo di Musarò et al per generare i topi "Swartzenegger" (Musarò et al Nature Genet 2001). In figura 43 sono schematizzati i due vettori di partenza e il vettore finale ottenuto.

## Generation of the transgenic mice



### Sommario:

I risultati ottenuti al termine del dottorato di ricerca, possono essere così riassunti:

1. I colangiociti esprimono l'IGF1, l'IGF-receptor e le due principali proteine del signalig intracellulare IRS1 e IRS2 e queste sono sovraesprese durante proliferazione nel ratto BDL.
2. La legatura del dotto biliare provoca anche un aumento della fosforilazione di ERK1/2, Akt e dell'IGF-Receptor.
3. La somministrazione di IGF1 a colangiociti quiescenti di ratto in coltura per 3 ore, induce proliferazione come dimostrato dall'aumento del PCNA (e del p-H3).
4. Il trattamento con IGF1 provoca anche l'aumento dell'espressione dell'IGF-Receptor, di IRS1, di IRS2 e l'aumento della fosforilazione di ERK1/2 e Akt.

5. L'utilizzo di inibitori specifici per l'IGF-Receptor, per le Map-chinasi o per PI3-chinasi provoca l'inibizione della proliferazione IGF-1 dipendente, indicando che questa è proprio la specifica via di traduzione del segnale utilizzata dall'IGF1 nei colangiociti.
6. I colangiociti esprimono il recettore di membrana (GHR) per l'ormone della crescita (GH).
7. Il trattamento di colangiociti quiescenti di ratto in coltura per 3 ore con il GH stimola i colangiociti a proliferare (aumento del PCNA e di p-H3).
8. Il GH induce nei colangiociti un aumento dell'espressione dell'IGF1, come dimostrato in Western Blot e con Kit elisa, e l'aumento della fosforilazione dell'IGF-Receptor.
9. L'utilizzo di inibitori specifici per l'IGFR o per il GHR ci dimostra che l'induzione della proliferazione GH-dipendente nei colangiociti è mediata dal sistema dell'IGF1.
10. La doppia somministrazione di IGF1 ed Estrogeni ha un effetto additivo sulla stimolazione della proliferazione dei colangiociti in coltura (PCNA e p-H3) e sull'attivazione di ERK1/2 e Akt.
11. Il 17 $\beta$ estradiolo è capace da solo di indurre la fosforilazione dell'IGFR.
12. L'utilizzo di inibitori specifici per l'IGFR o per gli ERs ci dimostra come nell'induzione della proliferazione entrambe le sostanze cooperano a livello recettoriale mediante meccanismi di transattivazione.
13. La somministrazione di GCDC e TCDC ad epatociti in coltura 3 ore non ha effetti sull'espressione del PCNA.
14. Il GCDC, e non il TCDC, è fortemente apoptotico per gli epatociti.
15. Il trattamento con l'inibitore per l'IGFR aumenta la quota di apoptosi indotta da GCDC e fa diventare apoptotico anche il TCDC, mentre il trattamento con l'inibitore per l'ERs non ha effetti significativi sull'apoptosi GCDC-dipendente.
16. La somministrazione dei sali ai colangiociti può avere effetti contrari sull'espressione del PCNA in modo dose-dipendente.
17. A basse concentrazioni GCDC e TCDC stimolano la proliferazione, viceversa ad elevate concentrazioni sono proapoptotici.
18. L'apoptosi indotta da GCDC e TCDC nei colangiociti è maggiore se viene utilizzato l'inibitore dell'IGFR.
19. Gli estrogeni proteggono i colangiociti dall'apoptosi indotta da GCDC, ma tale effetto non è recettore specifico, anzi sembrerebbe essere mediato dal sistema dell'IGF1 come dimostrato dagli esperimenti con le somministrazioni multiple di GCDC, 17 $\beta$ estradiolo, e inibitori dell'IGFR, degli ERs dagli esperimenti di incubazione con gli specifici siRNA contro l'IGF1.
20. Per quanto riguarda le diverse isoforme di IGF1 possiamo dire che esistono più trascritti del gene dell'IGF1 tanto negli epatociti quanto nei colangiociti.
21. I campioni analizzati di epatociti e colangiociti, sia normali sia BDL, presentano pattern di amplificazione simili, quindi non vi sono differenze a livello qualitativo tra i due tipi cellulari ma piuttosto differenze a livello quantitativo tra normali e BDL.
22. La *real-time* PCR mette in evidenza una caduta dell'IGF1 totale soprattutto negli epatociti in seguito alla legatura del dotto biliare.
23. Se si osservano le proporzioni di X06107 (isoforma ad azione "locale") e di NM\_178866 (isoforma "circolante") rispetto ad IGF1 totale, si vede che mentre la proporzione di NM\_178866 oscilla di poco, la proporzione di X06107 subisce un drastico calo con la legatura sia negli epatociti sia nei colangiociti.
24. Infine, nell'ambito del progetto di generare un topo transgenico che sovraesprima l'IGF1, per ora abbiamo ottenuto il vettore d'espressione da inserire nel genoma murino.

## DISCUSSIONE

I colangiociti sono normalmente cellule quiescenti nel fegato ma sono caratterizzati da una spiccata capacità proliferativa sotto certe condizioni sperimentali e durante numerose colangiopatie umane come ad esempio la Cirrosi biliare Primitiva (CBP), la Colangite Sclerosante Primitiva (CSP) o la colestasi (acuta e cronica).

In queste patologie i colangiociti proliferanti cercano di riparare il danno e mostrano aumentate capacità secretorie ormone-dipendenti/indipendenti.

Nella prima parte del lavoro, tramite RT-PCR qualitativa, abbiamo dimostrato che i colangiociti esprimono l'IGF1 e possono rispondere alla stimolazione del fattore di crescita poiché esprimono anche le principali proteine del signaling intracellulare come IGF-Receptor, IRS-1 e IRS-2.

Dopo legatura sperimentale del dotto biliare principale (BDL) i colangiociti proliferanti di ratto, over-esprimono (dato ottenuto in Western Blot) tutte le proteine trovate in PCR, e mostrano un aumento della fosforilazione di ERK1/2 (Map-chinasi) e Akt (principale substrato della PI3-chinasi), le proteine che mediano l'effetto proliferativo dell'IGF1 in molte cellule eucariotiche.

I colangiociti BDL liberano nel mezzo di coltura 4 volte (quantizzazione tramite Kit Elisa) più IGF1 rispetto ai colangiociti quiescenti e anche la real-timePCR ci ha confermato che il messaggero dell'IGF1 è aumentato dopo 1 settimana di BDL.

Questi dati presi insieme indicano chiaramente che:

il sistema dell'IGF1 sostiene la proliferazione dei colangiociti dopo legatura del dotto biliare.

Per misurare direttamente l'effetto dell'IGF1 sulla proliferazione, abbiamo incubato per 3 ore, in assenza di siero, colangiociti normali (quiescenti) di ratto con IGF1, a una concentrazione (10ng/ml) intermedia tra quella rilevata nel sovrantante dei colangiociti BDL (0,47ng/ml) e quella normalmente misurabile nella bile di ratto adulto (50ng/ml) (Phillips AF et al 2000).

Il trattamento induce un aumento di 4-6 volte dell'espressione del PCNA in modo IGFR-dipendente infatti se trattiamo con l'anticorpo bloccante specifico,  $\alpha$ IR3, tale effetto sulla proliferazione viene abolito. L'IGF1 induce anche l'aumento dell'espressione dell'IGF-R (e della sua fosforilazione), e di IRS1/2.

Questi dati indicano che:

la somministrazione in coltura di IGF1 a colangiociti quiescenti riesce ad attivare il signaling proliferativo del fattore di crescita.

I colangiociti stimolati a proliferare dall'IGF1 mostrano anche un' aumentata fosforilazione della proteina ERK1/2 e Akt; la somministrazione dell'inibitore delle Map-chinasi (UO126) e dell'inibitore di PI3-chinasi (Wortmannina) è in grado di bloccare la stimolazione a proliferare, dimostrando che:

l'IGF1 induce proliferazione, tramite il proprio recettore, attivando i sentieri intracellulari che coinvolgono ERK e Akt.

Poiché la produzione di IGF1 nel fegato (epatociti) è sotto il controllo dell'ormone della crescita (GH), il passo successivo del nostro lavoro è stato quello di studiare l'espressione del suo specifico recettore (GHR) nei colangiociti e di valutare la risposta delle cellule all'esposizione di GH.

Il GHR è espresso dai colangiociti i quali trattati con l'ormone della crescita (2nM) rispondono con l'aumento dell'espressione e della secrezione di IGF1, suggerendo che:

l'epitelio biliare è un target e un componente dell'asse GH-IGF1 del fegato.

Il GH è anche in grado di stimolare la proliferazione di colangiociti quiescenti in coltura in modo recettore-dipendente poiché tale effetto è abolito dalla somministrazione dello specifico antagonista del GHR, B2036.

Nei colangiociti stimolati a proliferare dall'ormone della crescita si ritrova lo stesso pattern di attivazione intracellulare osservato con la somministrazione di IGF1 e/o Estrogeni, quindi un

aumento della fosforilazione di IGF-R, ERK1/2, Akt e in un marcato aumento della produzione dell'IGF1.

La stimolazione del PCNA indotta da GH è bloccata dalla somministrazione dell'inibitore dell'IGF-R in modo specifico poiché viceversa non viene bloccato l'aumento della produzione di IGF1.

Questi dati quindi dimostrano come:

L'IGF1 è il mediatore degli effetti proliferativi del GH nei colangiociti

Nella seconda parte dello studio abbiamo analizzato le interazioni tra IGF1 ed Estrogeni nella modulazione della proliferazione dei colangiociti.

La doppia somministrazione (IGF1, 10ng/ml + 17βestradiolo 10nM) provoca un aumento del PCNA, della fosforilazione dell'IGFR, di ERK e Akt maggiore rispetto a quello indotto dai singoli trattamenti.

Il 17βestradiolo è anche in grado di stimolare da solo la fosforilazione dell'IGFR, e la sua capacità di indurre proliferazione nei colangiociti è parzialmente bloccata dalla somministrazione di αIR3, d'altronde, anche la capacità di indurre proliferazione dell'IGF1 è parzialmente bloccata dalla somministrazione di Ici 182,780.

Questi dati indicano quindi che:

IGF1 ed Estrogeni collaborano in modo positivo e con effetto additivo alla proliferazione dei colangiociti.

Le interazioni tra i due fattori avvengono sia a livello recettoriale che post-recettoriale

Le stesse patologie biliari nominate all'inizio (CBP, CSP ecc), capaci di indurre proliferazione dei colangiociti, presentano come sintomatologia fenomeni colestatici che, se protratti nel tempo, possono portare anche a importanti fenomeni apoptotici a carico sia degli epatociti sia dei colangiociti, così abbiamo pensato di studiare il ruolo di IGF1 ed Estrogeni in relazione alla somministrazione di Sali Biliari.

Negli epatociti il trattamento con GCDC 50μM induce l'apoptosi del 42% delle cellule, mentre il TCDC fallisce l'induzione. Bloccando l'IGFR tramite lo specifico anticorpo αIR3, l'apoptosi indotta da GCDC aumenta fino all'85% e anche il TCDC diventa apoptotico (39% di apoptosi rispetto al controllo).

La somministrazione insieme al GCDC di 17βestradiolo o l'inibitore dell'attività degli ERs (Ici 182,780) invece non ha nessun effetto sulla quota di apoptosi indotta dal sale.

Nei colangiociti sia il GCDC sia il TCDC 100μM inducono una risposta di tipo proliferativi (aumento dell'espressione del PCNA), ma se aumentiamo le dosi fino a 1mM osserviamo al contrario anche qui un'induzione all'apoptosi, maggiormente evidente con il GCDC (46% vs 305%).

Anche nei colangiociti l'apoptosi indotta da GCDC è influenzata negativamente (nel senso che aumenta) dal trattamento delle cellule con l'antagonista dell'IGFR, e in più anche l'incubazione dei campioni con siRNA contro l'IGF1 si traduce con un marcato aumento dell'apoptosi GCDC-dipendente.

A differenza degli epatociti che non sono influenzati dagli estrogeni e dagli antagonisti dei recettori degli estrogeni, nei colangiociti osserviamo un buon effetto protettivo del 17βestradiolo.

Tale protezione però sembra essere indipendente dagli ERs, infatti, la co-somministrazione dell'Ici al 17βestradiolo non è efficace per ristimolare una totale risposta apoptotica, effetto invece provocato dall'aggiunta di αIR3 o siRNA (contro IGF1).

Gli Estrogeni quindi sono in grado di proteggere solo i colangiociti dall'apoptosi indotta da sali biliari (ad elevate concentrazioni) e questo verosimilmente tramite l'interazione e l'attivazione del sistema IGF1.

Questi fatti presi insieme ci dimostrano che:

L'IGF1 interpreta un ruolo chiave anche nei fenomeni puramente protettivi, antiapoptotici, di colangiociti ed epatociti a contatto con sali biliari.

Capita l'importanza centrale dell'IGF1 nei fenomeni rigenerativi e protettivi del fegato, e alla luce delle ultime importanti scoperte fatte da alcuni gruppi di ricerca (Barton ER. et al 2002; Aperghisa M et al 2004; Musarò A et al 1999; Dobrowolny G et al 2005; Barton-Davis ER et al 1998) circa isoforme tessuto specifiche di IGF1 che agiscono solo localmente con meccanismo autocrino/paracrino ed hanno un ruolo fondamentale nella riparazione al danno, abbiamo pensato di studiare nel fegato del nostro modello di ratto BDL, l'espressione genica delle diverse isoforme di IGF1 sia livello qualitativo che quantitativo.

In primo luogo, si può sicuramente affermare che coesistono negli estratti più trascritti, dimostrato dalla presenza di amplificati doppi e i dati ottenuti ci dicono che esistano almeno tre trascritti diversi a partire dal gene dell'IGF1.

In secondo luogo, i quattro campioni esaminati (epatociti e colangiociti puri isolati da ratti normali e BDL) hanno pattern di amplificazione simili e non appaiono differenze qualitative. Vi sono, invece, differenze di ordine quantitativo, non tanto tra epatociti e colangiociti ma tra campioni normali e BDL della stessa specie cellulare.

Per dosaggio quantitativo abbiamo scelto le specie più rappresentative: NM\_178866 per l'IGF1 tipicamente epatico, X06107 per l'IGF1 ad azione locale e un trascritto generico (a partire dalla coppia di primer FEX3RT1-REX4RT1) presente in tutti gli amplificati che rappresenta quindi l'IGF1 totale presente nel fegato.

La real-time PCR mette in evidenza una caduta dell'IGF1 totale e della specie X06107 in particolare a seguito della legatura del dotto biliare. Il valore di IGF1 totale si riduce, infatti, a seguito della legatura, del 91% negli epatociti ( $5.06 \times 10^6$  contro  $4.58 \times 10^5$  copie) e del 65% nei colangiociti ( $2.72 \times 10^6$  contro  $9.46 \times 10^5$  copie).

Se poi si osservano le proporzioni di X06107 e di NM\_178866 rispetto ad IGF1 totale, si vede che mentre la proporzione di NM\_178866 oscilla di poco attorno al 21%, la proporzione di X06107 subisce un drastico calo con la legatura (29.5%, 5.02%, 21.99% e 11.31% negli epatociti normali, epatociti BDL, Colangiociti normali e colangiociti BDL, rispettivamente).

I dati ottenuti ci permettono di dire che

Nel fegato sono co-esprese più isoforme di IGF1

L'espressione dell'IGF1 totale, in seguito a legatura del dotto biliare, subisce una down-regulation, maggiore negli epatociti.

gli effetti più drastici sono a carico della specie attivata dal promotore sull'esone 1, l'IGF1 locale (X06107).

La dimostrazione che l'IGF-1 è in grado di potenziare gli effetti degli estrogeni nella modulazione della proliferazione dei colangiociti, agendo sia a livello recettoriale che su sentieri intracellulari, potrebbe aprire la possibilità di agire su patologie umane caratterizzate da deregolazione della proliferazione dei colangiociti utilizzando modulatori specifici.

Potenzialmente è possibile immaginare di poter ritardare l'evoluzione di alcune colangiopatie verso la fase duttopenica, inducendo la proliferazione dei colangiociti tramite la somministrazione di attivatori dei recettori per gli estrogeni e/o l'IGF-1. Viceversa, l'utilizzo di specifici antagonisti per i recettori, oppure inibitori delle proteine a valle del meccanismo di attivazione, potrebbero essere utili nel bloccare la proliferazione dei colangiociti in patologie come il fagato policistico o il colangiocarcinoma, per le quali non esiste attualmente alcun tipo di terapia.

La colestasi ed il conseguente accumulo di sali biliari complica il decorso e rappresenta un fattore prognostico negativo in quasi tutte le patologie epatiche.

La colestasi rappresenta l'elemento caratterizzante di un gruppo di patologie (colangiopatie) caratterizzate da danno primario dei colangiociti e che comprendono la fibrosi cistica e l'atresia biliare come principali malattie congenite e la cirrosi biliare primitiva (CBP) come principale malattia acquisita (Desmet V et al 1998 Adv Clin Path; Desmet V et al 1995; Desmet V et al 1998; Alpini G et al 2002; Alvaro D et al 2000); le colangiopatie rappresentano inoltre la prima indicazione per trapianto di fegato nel bambino e la terza

nell'adulto. Non potendo agire sulla causa del danno che è virtualmente sconosciuta in queste patologie, da un punto di vista teorico si potrebbe agire o aumentando la resistenza al danno dei colangiociti o aumentando la capacità proliferativa compensatoria o, infine, aumentando la resistenza degli epatociti al potere citotossico dei sali biliari.

Che i sali biliari abbiano un ruolo determinante nella progressione negativa di questa patologie è dimostrato dal fatto che l'unico farmaco in grado di ridurre parzialmente il danno epatico è l'acido ursodesossicolico (analogo non attivo dei sali biliari) il quale agisce riducendo il potenziale citotossico dei sali biliari (Paumgartner G et al 2004).

Difendere epatociti e colangiociti dall'apoptosi indotta da sali biliari, magari potenziando il potere citoprotettivo di fattori come l'IGF1 e gli estrogeni in corso di colestasi, rappresenta quindi sicuramente una strategia di protezione dal danno epatico o, di rallentamento della sua progressione.

Questo è ancora più importante alla luce di alcune recenti scoperte che hanno messo in evidenza come proprio l'IGF1, e in particolar modo l'isoforma "locale" ha un ruolo chiave in tutti i processi protettivi e rigenerativi di tessuti come il muscolo ed il cervello.

Infatti topi transgenici che producono alti livelli di isoforme "locali" di IGF1 sono estremamente resistenti al danno e le strategie di infusione locale di queste isoforme sembrano indurre effetto trofico per tessuto muscolare e nervoso tanto da ipotizzare possibili applicazioni per patologie distrofiche degenerative del tessuto nervoso e muscolare come sclerosi laterale amiotrofica, demenze, distrofie muscolari, cardiopatie dilatative e malattie degenerative del muscolo (Barton ER. et al 2002; Aperghisa M et al 2004; Musarò A et al 1999; Dobrowolny G et al 2005; Barton-Davis ER et al 1998; Barton-Davis ER et al 1999; Kaspar BK et al 2003).

L'Identificazione da parte nostra delle due forme principali di IGF1 (XO06107 e NM\_178866), prodotte dalle componenti cellulari del fegato (epatociti e colangiociti) in condizioni normali e patologiche (BDL) dimostra che oltre all'IGF1 prodotto e secreto in circolo con funzione ormonale, il fegato produce delle isoforme "locali" di IGF1 simili a quelle dimostrate avere una funzione trofica nel muscolo e tessuto nervoso.

In più avendo visto che tali isoforme hanno anche andamenti differenti nei colangiociti e negli epatociti prima e dopo la legatura del dotto biliare, si può ipotizzare che abbiamo ruoli differenti nel guidare i processi protettivi e riparativi nel fegato.

Questo, ovviamente richiede ulteriori e più approfonditi studi e anche nel campo epatologico potrebbe aprirsi quindi la strada ad una nuova strategia terapeutica più specifica basata sull'utilizzo di queste isoforme per la modulazione del danno epatico di molte patologie.

## BIBLIOGRAFIA:

- Alberts B et al. "Biologia molecolare della cellula"; III ed. italiana 1995; ZANICHELLI.
- Alpini G et al. "Bile acid depletion decreases cholangiocytes proliferative capacity and secretin-stimulated ductal bile secretion in bile duct ligated (BDL) rats". *Gastroenterology* 1997\*; 112: A1210.
- Alpini G et al. "Bile acid feeding induces cholangiocyte proliferation and secretion: evidence for bile acid-regulated ductal secretion". *Gastroenterology* 1989; 116: 179-186.
- Alpini G et al. "Bile acids stimulate proliferative and secretory events in large but not in small cholangiocytes". *Am J Physiol* 1997; 273: G518-529.
- Alpini G et al. "Bile secretory function of intrahepatic epithelium in the rat". *Am J Physiol* 1989; 257: G124-33
- Alpini G et al. "Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules". *J Clin Invest* 1988; 81: 569-578.
- Alpini G et al. "Functional expression of the apical Na-dependent bile acid in large but not in small cholangiocytes". *Gastroenterology* 1997; 113: 1734-1740.
- Alpini G et al. "Heterogeneity of proliferative capacity of rat cholangiocytes following bile duct ligation". *Am J Physiol* 1998; 274: G767-G776.
- Alpini G et al. "Large but not small intrahepatic bile duct units are involved in secretin-regulated ductal bile secretion in normal rat liver". *Am J Physiol* 1997. 272:G1064-G1074.
- Alpini G et al. "Molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from rat liver after bile duct ligation". *Am J Physiol* 1997; 273:G289-297.
- Alpini G et al. "Morphologic, molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver". *Gastroenterology* 1996; 110:1637-1643.
- Alpini G et al. "The Liver, Biology & Pathobiology" terza edizione. New York, Raven Press, 1994: 623-653.
- Alvaro D "Biliary epithelium: a new chapter in cell biology". *Italian J Gastroenterol Hepatol*, 1999; 31:78-83.
- Alvaro D et al. "Effect of secretin on intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells". *J Clin Invest* 1993; 92: 1314-1325
- Alvaro D et al. "Hormonal regulation of bicarbonate secretion in the biliary epithelium". *Yale J Biol Med* 1997; 70:417-426.
- Alvaro D et al. "Intracellular pathways mediate estrogen-induced cholangiocyte proliferation in the rat". *Hepatology* 2002; 36: 297-304.
- Alvaro D et al. "Role of kinases and phosphatase in the regulation of fluid secretion and Cl/HCO<sub>3</sub>-exchange in cholangiocytes". *Am J Physiol* 1997; 273: G303-G313.
- Alvaro D, Alpini G, Jezequel AM, Bassotti C, Francia C, Fraioli F, Romeo R, et al. "Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions". *J Clin Invest* 1997;100:1349-1362.
- Alvaro D, Alpini G, Onori P, Franchitto A, Glaser S, Le Sage G, Gigliozzi A, et al. "Effect of ovariectomy on the proliferative capacity of intrahepatic rat cholangiocytes". *Gastroenterology* 2002;123:336-344.
- Alvaro D, Alpini G, Onori P, Perego L, Svegliata Baroni G, Franchitto A, Baiocchi L, et al. "Estrogens stimulate proliferation of intrahepatic biliary epithelium in rats". *Gastroenterology* 2000;119:1681-1691.
- Alvaro D, Gigliozzi A, Attili AF. "Regulation and deregulation of cholangiocyte proliferation". *J Hepatol* 2000; 33: 333-340.
- Alvaro D. "Biliary epithelium: a new chapter in cell biology". *It J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 78-83.
- Alvaro D, Drudi-Metalli V et al. "The intrahepatic biliary epithelium is a target of the growth hormone/insulin like growth factor 1 axis". *Journal of Hepatology* 2005; 43: 875-883.
- Aperghisa M. et al. "Different levels of neuroprotection by two insulin-like growth factor-I splice variants". *Brain Research* 2004; 1009: 213- 218.
- Baiocchi et al. "Regulation of cholangiocytes bile secretion". *Journal of hepatology* 1999; 31:179-191.
- Baiocchi et al. "The inhibitory effect of ursodeoxycholate (UDCA) on cholangiocytes growth and secretion in bile duct ligated (BDL) rats is not affected by its conjugation with taurine". *Gastroenterology* 1999, 116: AL0033.
- Barton ER. et al. "Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice". *The Journal of Cell Biology* 2002; Vol 157, N° 1.
- Barton-Davis, E.R., D.I. Shoturma, A. Musarò, N. Rosenthal, and H.L. Sweeney. 1998. "Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95:15603-15607.

- Barton-Davis, E.R., D.I. Shoturma, and H.L. Sweeney. "Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle". *Acta. Physiol. Scand.* 1999; 167:301-305.
- Baxter RC. "The Somatomedins: insulin-like growth factors". *Adv Clin Biochem* 1986; 25: ; 25: 49-115.
- Bhathal PS and GallJAM "Deletion of hyperplastic biliary epithelial cells by apoptosis following removal of the proliferative stimulus". *Liver* 1985; 28: 1449-1453.
- Blomsma MC et al. "Insulin-like growth factor-I in liver cirrosis". *Journal of hepatology* 1997; 27: 1133-1138.
- Blum A et al. "Effects of oestrogens and selective oestrogen receptor modulators on serum lipoprotein and vascular function ». *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 575-586
- Boyer JL "Vanishing Bile Ducts Syndrome – from bench to bed side. In: Alvaro D et al editors. *Vanishing Bile Ducts Syndrome*. London: Kluwer Acad Publisher; 1997; 240-246.
- Butler AA, LeRoith D. "Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology". *Endocrinology* 2001; 142: 1685-1688.
- Caligiuri A et al. "Endolelin 1 inhibits secretin-stimulated ductal secretion by interacting with ETA receptors on large cholangiocytes". *Am J Physiol* 1998; 275: G835-G846.
- Cantafora A, Blotta I, Rivabene R, Pisciotto L, Bertolini S. "Evaluation of RNA messengers involved in lipid trafficking of human intestinal cells by reverse-transcription polymerase chain reaction with competitor technology and microchip electrophoresis". *Electrophoresis* 2003; 24: 3748-3754.
- Cardosa-Gomez GP et al. "Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain". *Brain Research Reviews* 2001; 37: 320-334.
- Casella C e Taglietti V. "Principi di FISILOGIA", Vol. I, edizione riveduta e corretta, settembre 1995.
- Celli A et al. "Dysregulation of apoptosis in the cholangiopathies and cholangiocarcinoma". *Semin Liver Dis* 1998; 2: 177-185.
- Celli A et al. "Glutathione depletion inassociated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes". *Am J Physiol* 1998; 275: G749-G757.
- Chan TW et al. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 2545-2554.
- Charlotte F et al. "Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver". *Am J Phatol* 1994; 144: 460-465.
- Cowich WS, Clemmons DR. "The insulin-like growth factors". *Ann Rev Phisiol* 1993; 55:131-153.
- Desmet V et al. "Ductular reaction in the liver". *Path Res Pract* 1995; 191: 513-524.
- Desmet V, Roskams T, and Van Eyken P. "Ductular reaction in the liver". *Path Res Pract* 1995; 191: 513-524.
- Desmet V, Roskams T, and Van Eyken P. "Histopathology of vanishing bile duct diseases". *Adv Clin Path* 1998; 2: 87-99.
- Desmet V, Roskams T, and Van Eyken P. "Pathology of the biliary tree in cholestasis: ductular reaction". In: Manns MP, Boyer JL, Jansen PLM, and Reichen J., editors. *Cholestatic liver diseases*. Kluwer Academic Publishers; 1998; pp. 143-154.
- Desmet VJ "Current problrms in diagnosis of biliary disease and cholestasis". *Semin Liv Dis* 1986; 6:233-245.
- Diakonova M et al. " Localization of five annexins in J774 macrophages and in isolated phagosomes J Cell sci 1997; 110: 1199-1213.
- Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musaro A. "Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model". *J Cell Biol.* 2005; 168(2):193-9.
- Eagon PK et al. "Estrogen and androgen receptors in liver: their role in liver disease and regeneration". *Semin Liver Dis* 1985; 5: 59-69.
- Eagon PK et al. "Sex steroid metabolism and receptor status in hepatic hyperplasia and cancer in rats ». *Gastroenterology* 1996; 110: 1199-1207.
- Farber E et al. "Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-aminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene". *Cancer Res* 1956; 16: 142-148.
- Farber E et al. "The sequential analysis of cancer induction with chemicals". *Acta Phatol japonica* 1981, 31: 1-11.
- Faubion WA et al. "Toxic bile acid induce rodent hepatocytes apoptosis via direct activation of Fas". *J Clin Invest* 1999; 103: 137-145.
- Fausto N and Webber E.M. "Liver regeneration" In. Arias I.M. et al editors. *The Liver: Biology and phathobiology*, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Raven Press, Ltd.; 1994. 1059-1084.
- Fausto N et al, 1993. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204 :273

- Feld S, Hirschberg R. "Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney". *Endocr Rev* 1996; 17: 423-480.
- Fisher B et al. "Relation of estrogen and its receptor to rat liver growth and regeneration". *Cancer Res* 1984; 44: 2410-2415.
- Francavilla A et al. "The effect of estrogen and tamoxifen on hepatocyte proliferation *in vivo* and *in vitro*". *Hepatology* 1989; 9: 14-620.
- Fromm M et al. "Segmental heterogeneity of epithelial transport in rat large intestine". *Pflugers Archiv-Euro J. Physiology* 1978; 378:71-83.
- Fukuda Y et al. "Immunohistochemical study on tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and pathological human livers". *Gastroenterology* 1991; 26: 37-41.
- Gaudio E et al. "Hepatic microcirculation and Pribiliary Plexus in experimental biliary cirrhosis: A morphological study". *Gastroenterology* 1999; 111: 1118-1124.
- Gigliozzi A, Alpini G, Baroni GS, Marucci L, Metalli VD, Glaser SS, Francis H, et al. "Nerve growth factor modulates the proliferative capacity of the intrahepatic biliary epithelium in experimental cholestasis". *Gastroenterology* 2004;127:1198-1209.
- Giustina A, Veldhuis JD. "Pathophysiology of the Neuroregulation of Growth Hormone Secretion in Experimental Animals and the Human". *Endocrine Reviews* 1998; 19: 717-797.
- Glaser S et al. "Gastrin inhibits secretin-induced ductal secretion by interaction with specific receptors on rat cholangiocytes". *Am J Physiol* 1997; 273:G1061-G1070.
- Goldfarb S et al. "Experimental cholangitis due to alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT)". *Am J Pathol* 1962; 40:585-598.
- Grisham JW "A Morphological study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation, in regenerating rat liver: autoradiography with thymidine-H3". *Cancer Res* 1962; 22: 842-849.
- Groothuis GM et al. "Hepatocytes heterogeneity in the bile formation and hepatobiliary transport of drug". *Enzyme* 1992; 46:94-138.
- Guggino WB "Functional heterogeneity in the early distal tubule of the Amphiuma kidney". *Am. J Physiol* 1986; 250:F430-F440.
- Guicciardi ME, Gores GJ. "Cholestatic hepatocellular injury: what do we know and how should we proceed". *J Hepatol.* 2005 Mar;42(3):297-300.
- Hameed M, Orrell RW, Cobbold M, Goldspink G, Harridge SDR. "Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise". *J Physiol* 2003; 547: 247-254.
- Harnois DM et al. "Bcl-2 is overexpressed and alters the threshold for apoptosis in a cholangiocarcinoma cell line". *Hepatology* 1997; 26: 884-890.
- Higuchi H, Gores GJ. "Bile acid regulation of hepatic physiology: IV. Bile acids and death receptors". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 ;284(5):G734-8.
- Higuchi H, Gores GJ. "Mechanisms of liver injury: an overview". *Curr Mol Med.* 2003 ;3(6):483-90.
- James L et al. "Application of keratin immunocytochemistry and sirius red staining in evaluation on intrahepatic changes with acute extrahepatic cholestasis due to hepatic duct carcinoma". *Hepato-Gastroenterology* 1989; 36:151-155.
- Jones JI, Clemmons DR. "Insulin-like growth factors and their binding protein: biological actions". *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34.
- Jones JI, Clemmons DR. "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions". *Endocr Rev* 1995; 16(1): 3-34.
- Joplin R et al. "Human intrahepatic biliary epithelial cells proliferate *in vitro* in response to human hepatocyte growth factor". *J Clin Invest* 1992; 90: 1284-1289.
- Kanno N et al. "Functional heterogeneity of intrahepatic biliary epithelium". *Hepatology* 2000; 31:555-561.
- Kaspar, B.K., J. Llado, N. Sherkat, J.D. Rothstein, and F.H. Gage. "Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model". *Science* 2003; 301:839-842.
- Katz N et al. "Metabolic heterogeneity of the liver". New York, Raven Press 1993:55-70
- Kuhlmann GD et al. "Correlation of histology and alpha1-fetoprotein resurgence in rat liver regeneration after experimental injury by galactosamide". *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1980; 387: 47-57.
- Kuiper GG et al. "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary ». *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 93: 5925-5930.
- Kuiper GG et al. *Endocrinology* 1997 ; 138 : 863-870.
- Kuiper GJM et al. "The estrogen receptor *beta* subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine system". *Front Neuroendocrinol* 1998; 19: 253-286.
- Kuiper GG et al. *Endocrinology* 1997; 138:863-870.
- Lazaridis KN et al. "Rat cholangiocytes absorb bile acid at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter". *J Clin Invest* 1997; 100: 2714-2721.

- Le Roith D. “Insulin-like growth factors”. *N Engl J Med* 1997; 336: 633-640.
- LeSage G et al. “Acute carbon tetrachloride feeding induces damage of large but not small cholangiocytes from bile ducts ligated rats liver”. *Am J physiol* 1999; 276: G1289-G1301.
- LeSage G et al. “Clonidine system modulates growth, apoptosis and secretion of cholangiocytes from bile duct ligated rats”. *Gastroenterology* 1999; 117: 191-199.
- LeSage G et al. “Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal bile secretion”. *Gastroenterology* 1996; 111:1633-1644
- LeSage GD et al. “Acute carbon tetrachloride feeding selectively damages large, but not small, cholangiocytes from normal rat liver”. *Hepatology* 1999; 29: 307-319.
- Liu Z et al. “Interleukin-6, HGF, and their receptors in biliary epithelial cells during a type I ductular reaction in mice: interactions between the periductal inflammatory and stromal cells and the biliary epithelium”. *Hepatology* 1998; 28: 1260-1268.
- Ippini G, McGill JM, LaRusso NF. “The pathobiology of biliary epithelia”. *Hepatology* 2002; 35: 1256-1268.
- Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. “Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth”. *Dev Biol* 2001; 229: 141-162.
- Malizia G et al. “growth factor and procollagen type I gene expression in human liver diseases”. *Gastroenterology* 1995; 145-156.
- Mangelsdorf DJ et al. *Cell* 1995 ; 83 :835-839.
- Margaret A Shupnik. “Crosstalk between steroid receptors and c-Src-receptor tyrosin kinase pathways: implication for cell proliferation”. *Oncogene* 2004; 23: 7979-7989.
- Marinelli RA et al. “Secretin induces the apical insertion of aquaporin-1 water channels in rat cholangiocytes”. *Am J physiol* 1999; 276:G280-G286.
- Marinelli RA et al. “Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane. Evidence for a secretin-induced vesicular translocation of aquaporin-1”. *J Biol Chem* 1997; 272:12984-12988.
- Mathis GA et al. “Enzyme profile of rat bile ductular epithelial cell in reference to the resistance phenotype in hepatocarcinogenesis”. *Hepatology* 1989;9: 477-485.
- Matsumoto K et al. “Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factor *in vitro*: interleukin-6, hepatocyte growth factor promote DNA synthesis *in vitro*”. *Hepatology* 1994; 20:376-382.
- McCall GE, Allen DL, Haddad F, Baldwin KM. “Transcriptional regulation of IGF-I expression in skeletal muscle”. *Am J Cell Physiol* 2003; 285: C831-C839.
- McGill et al. “Secretin activates CL- channel in bile duct epithelial cells through a cAMP-dependent mechanism”. *Am J Physiol* 1994; 266:G731-G736.
- Mendez P et al. “Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complex with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-Kinase in rat adult brain”. *Brain Res Mol Brain Res* 2003 ; 112: 170-176.
- Mennone A et al. “Isolation of small polarized bile duct units”. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:6527-6531.
- Michalopoulos GK “Liver regeneration : molecular mechanism of growth control ». *FASEB J* 1990; 4. 176-187.
- Morland CM et al. “Human biliary epithelial cells express chemokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in response to inflammatory cytokine stimulation”. *Hepatology* 1996; 24 suppl 332A.
- Mosselman S et al. “*Erbeta*: identification and characterization of a novel human estrogen receptor”. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53.
- Musarò A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N. “Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle”. *Nature Genet* 2001; 27: 195-200.
- Musaro, A., and N. Rosenthal. “Maturation of the myogenic program is induced by postmitotic expression of insulin-like growth factor I”. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19: 3115-3124.
- Nagore N et al. “Liver cell rosettes: structural differences in cholestasis and hepatitis”. *Liver* 1989; 9: 43-51.
- Noriatsu K et al. “Functional Heterogeneity of the Intrahepatic Biliary Epithelium”. *Hepatology*, Vol.31, N° 3, march 2000; 555-561.
- Okada Y et al. “Blood group antigens in the intrahepatic biliary tree”. *J Hepatol* 1988; 6:63-70.
- Omori M et al. “Expression of alpha-feto-protein and stem cell factor/c-kit system in BDL young rats”. *Hepatology* 1997; 25: 1115-1122.
- Palmer RH et al. “Production of bile duct hyperplasia and gallstones by lithocholic acid”. *J Clin Invest* 1966; 45: 1255-1267.

- Paradis K et al. "Characterization and response to interleukin 1 and TNF of immortalized murine biliary epithelial cells". *Gastroenterology* 1995; 109: 1308-1315.
- Patel T et al. "Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver diseases: an overview". *Semin Liver Dis* 1998; 18:105-114.
- Paumgartner G, Beuers U. "Mechanisms of action and therapeutic efficacy of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease". *Clin Liver Dis.* 2004 ; 8(1): 67-81.
- Petropoulos CJ et al. "Cell lineages in liver carcinogenesis: possible clues from studies of distribution of alpha-fetoprotein RNA in cell populations isolated from normal, regenerating, and preneoplastic rat livers". *Cancer Res* 1985; 43: 5762-5768.
- Pfaffl MW, Mirkeva Georgieva T, Penchev Georgiev I, Ontsouka E, Hageleit M, Blum JW. "Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in bovine species". *Domest Anim Endocrinol* 2002; 22: 91-102.
- Philipps AF et al. "Secretion of Insulin-like Growth Factor –II into bli of rats of different ages". *Biology of the Neonate* 2000; 78: 106-112.
- Polimeno L et al. "Cell proliferation and oncogene expression after bile duct ligation in the rat. Evidence of a specific growth effect on bile duct cells". *Hepatology* 1995, 21: 1070-1088.
- Que FG et al. "Development and initial application of an *in vitro* model of apoptosis in rodent cholangiocytes". *Am J Physiol* 1997; 272:G106-G115.
- Rabes HM "Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver". *Prog Liver Dis* 1976; 5:83-99.
- Roberts A et al. "Regulation of bicarbonate-dependent ductular secretion assessed by luminal micropuncture of isolated rodent intrahepatic bile ducts". *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:9080-9084.
- Roberts SK et al. "Cholangiocytes express aquaporin-CHIP and transport water via channel-mediated mechanism". *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:13009-13013.
- Schaffner F et al. "Electron microscopic studies of normal and proliferating bile ductules". *Am. J Phatol* 1961; 38:393-410.
- Sepp-Lorenzino L. "Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor". *Breast Cancer Res Treat* 1998; 47: 235-253.
- Shell S.S., 1994. *Mod. Phatol.* 7:105
- Sirica AE et al. "Isolation and partial characterization of oval and hyperplastic bile ductular cell-enriched populations from the liver of carcinogen and noncarcinogen-treated rats". *Cancer Res* 1984; 44: 3454-3466.
- Slott PA et al. "Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat". *Gastroenterology* 1990; 99: 466-477.
- Stahelin BJ et al. "The balance of Bax and Bcl-2 regulates apoptosis in biliary epithelial cells". *J Hepatol* 1996, 26(suppl ) 1)67.
- Stayer L. "Biochimica". IV ed. italiana 1996; ZANICHELLI.
- Strazzabosco M et al. "Intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells". *J Clin Invest* 1991; 87:1503-1512.
- Takikawa et al. "The bile acid-activated phosphatidylinositol 3-Kinase pathway inhibits Fas Apoptosis upstream of bid in rodent hepatocytes". *Gastroenterology* 2001; 120: 1810-1817.
- Terada T et al. "Immunohistochemical and immunoelectron microscopic analyses of alpha-amylase isozymes in human intrahepatic biliary epithelium and hepatocytes. *J Histochem & Cytochem* 1992, 40: 1627-1635.
- Terada T et al. "Pancreatic enzymes in the epithelium of intraepatic large bile ducts and in hepatic bile in patients with extrahepatic bile duct obstruction". *J Clin Phatol* 1994; 47: 924-927.,
- Thorgeirsson SS, 1996. *The FASEB Journal* 10:1249
- Tietz P et al. "Somatostatin inhibits secretin-induced ductal choleresis in vivo and exocytosis by cholangiocytes". *Am. J. Physiol* 1995; 269:G110-G118.
- Vacanti JP et al. "Bile duct enlargement by infusion onL-proline: potential significance in biliary atresia". *J Pediar Surg* 1979; 14: 814-818.
- Wang X, Yang Y, Adamo ML. "Characterization of the rat insulin-like growth factor I gene promoters and identification of a minimal exon 2 promoter". *Endocrinol* 2003; 134: 1528-1536.
- Wilson JW et al. "Role of cholangioles in restoration of the liver of mose after dietary injury". *J Phatol Bacteriol* 1958; 76: 4

## PUBBLICAZIONI e PARTECIPAZIONI a CONGRESSI

### Abstract:

- “*Estrogens induce cholangiocyte proliferation through the activation of the adapter proteins Sch and Src*”. Alvaro D, Alpini G, Onori P, Franchitto A, Glaser S, Le Sage G, Gigliozzi A, Attili AF, Svegliati Baroni G, Drudi Metalli V, Mancino MG, Gaudio E. Journal of Hepatology 2002, Apr, Vol 36 Supplement No 1.
- “*The Interaction Between Insulin like growth factor 1 (IGF-1) and Estrogens modulates Cholangiocyte Proliferation*” Drudi Metalli V, Gigliozzi A, Mancino MG, Alpini G, Glaser S, Franchitto A, Onori P, Attili AF, Gaudio E and Alvaro D. Hepatology 2002 Oct Vol. 36, No. 4, Pt. 2 of 2.
- “*Insulin Like Growth Factor 1 (IGF-1) Stimulates the Proliferation of Rat Cholangiocytes and Exerts an Additive Effect with Estrogens*”. Drudi Metalli V, Gigliozzi A, Mancino MG, Franchitto A, Onori P, Attili AF, Gaudio E, and Alvaro D. Digestive and Liver Disease 2003 Feb (35) suppl. 1.
- “*The intrahepatic biliary epithelium is a target of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis*”. Domenico Alvaro, Veronica Drudi-Metalli, Gianfranco Alpini, Paolo Onori, Antonio Franchitto, Barbara barbaro, Shannon Glaser, Heather Francis, Alfredo Cantafora, Ida Blotta, Adolfo Francesco Attili and Eugenio Gaudio. Digestive and liver disease 2005 MARCH, suppl. 1

### Poster:

- “*Intracellular pathways involved in the estrogen mediated regulation of intrahepatic biliary epithelium functions*”. D. Alvaro, P. Onori, V. Drudi-Metalli, M.G. Mancino, A.F. Attili, and E. Gaudio. ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA, Vol. 89 1-3 2002.
- “*Insulin Like Growth Factor 1 (IGF-1) Stimulates the Proliferation of Rat Cholangiocytes and Exerts an Additive Effect with Estrogens*”. Drudi Metalli V, Gigliozzi A, Mancino MG, Franchitto A, Onori P, Attili AF, Gaudio E, and Alvaro D. Digestive and Liver Disease 2003 Feb (35) suppl. 1.
- “*Bile Salts Regulate Proliferation and Apoptosis of Liver Cells by Modulating the IGF1 System and Estrogen Receptors*”. Veronica DRUDI-METALLI\* V, BARBARO\* B, MANCINO\* MG, CARDINALE V\*, MANCINO\* A, TORRICE\* A, ATTILI\* AF and ALVARO D\*. Journal of hepatology (in press)

### Articoli:

- “*Intracellular pathways mediating estrogen induced cholangiocytes proliferation in the rat*”. Alvaro D, Onori P, Drudi-Metalli V, Svegliati-Baroni G, Folli F, Franchitto A, Alpini G, Attili AF, and Gaudio E. HEPATOLOGY, Vol. 36, N° 2 (297-304), August 2002.
- “*Nerve Growth Factor Modulates the Proliferative Capacity of the Intrahepatic Biliary Epithelium in Experimental Cholestasis*”. Alessandro Gigliozzi, Gianfranco Alpini, Gianluca Svegliati Baroni, Luca Marucci, Veronica Drudi-Metalli, Shannon S. Glaser, Heather Francis, Adolfo F. Attili, and Domenico Alvaro. GASTROENTEROLOGY 2004; 127: 1198-1209.
- “*The intrahepatic biliary epithelium is a target of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis*”. Domenico Alvaro, Veronica Drudi-Metalli, Gianfranco Alpini, Paolo Onori, Antonio Franchitto, Barbara barbaro, Shannon Glaser, Heather Francis, Alfredo Cantafora, Ida Blotta, Adolfo Francesco Attili and Eugenio Gaudio. Journal of hepatology 2005; 43: 875-883.

### Comunicazioni Orali:

“*Insulin Like growth Factor 1 (IGF1) and Estrogens cooperate in modulating the proliferation of rat cholangiocytes by acting at both Receptor and Post-receptor level*”. Domenico Alvaro, Veronica Drudi-Metalli, Barbara Barbaro, Antonio Augello, Vincenzo Cardinale, Roberto Tari, Maria Grazia Mancino, Adolfo Francesco Attili, University of Rome, Rome, Italy; Shannon Glaser, Jo Lynne Phinizy, Silvia Taffetani, Heather Francis, Scott & White Hospital, Temple, TX; Gianfranco Alpini, The Texas A&M University System HSC COM and Central Texas Veterans HCS, Temple, TX.

Congresso internazionale AASLD (Boston 2004)

“*The intrahepatic biliary epithelium is a target of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis*”.

Veronica Drudi-Metalli, Domenico Alvaro, Gianfranco Alpini, Paolo Onori, Antonio Franchitto, Barbara barbaro, Shannon Glaser, Heather Francis, Alfredo Cantafora, Ida Blotta, Adolfo Francesco Attili and Eugenio Gaudio.

Riunione annuale AISF (Marzo 2005, Roma, Aula magna la Sapienza)

Congresso Nazionale SIGE (Aprile 2005, Genova, Aula Auditorium)

Congresso Internazionale EASL (Maggio 2005, Parigi)