

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

Relazione di dottorato  
Anno Accademico 2003/2004

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

Responsabile scientifico  
Prof. Mario Pirisi

Dottorando  
Dr. Carlo Smirne

## **INTRODUZIONE**

Fin dalla scoperta dei virus dell'epatite A e B, alla fine del 1960 ed all'inizio del 1970 rispettivamente, fu chiaro che una larga parte di casi di epatiti, acute e croniche, non potesse comunque essere attribuita a nessuno di questi due agenti causali. I sospetti si concentrarono dunque sulla ricerca di un nuovo virus che potesse rendere conto di tutti quei casi denominati epatiti non-A e non-B, finché finalmente nel 1989 venne identificato e clonato il genoma di un nuovo agente virale, chiamato virus dell'epatite C (HCV) [1].

### **Biologia del virus dell'epatite C**

L'HCV è stato inserito nel genere degli *Hepacivirus*, appartenenti alla famiglia dei *Flavivirus*. Si tratta di una particella virale di circa 50 nm di diametro, costituita da un singolo filamento lineare di RNA a polarità positiva racchiuso in un nucleocapside (costituito dalla proteina *core*), circondato a sua volta da un pericapside, derivato dalle membrane dell'ospite, in cui sono inserite le glicoproteine virali di superficie E<sub>1</sub> ed E<sub>2</sub>. Il genoma del virus è costituito da circa 9500 nucleotidi, codificanti per un'unica poliproteina di 3000 aminoacidi; il genoma è costituito da due regioni non tradotte altamente conservate (UTRs), agli estremi terminali 5' e 3', che delimitano una unica "open reading frame" (ORF) codificante la poliproteina. Dopo la traduzione, la poliproteina è processata, inizialmente da enzimi di origine cellulare liberando le proteine strutturali *core*, E<sub>1</sub> ed E<sub>2</sub>; successivamente vengono prodotte le proteine non strutturali (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B grazie all'azione proteolitica dell' NS3 [2].

### **Storia naturale**

L'HCV ha nel mondo una distribuzione ubiquitaria, sebbene esistano marcate differenze in termini di prevalenza: si passa infatti dallo 0,1% di paesi come l'Islanda, al 18,1% dell'Egitto. Si stima che più di 170 milioni di persone siano oggi cronicamente infettate del virus; nel 2001, le malattie croniche del fegato sarebbero state responsabili di 1,400,000 morti, il 20% delle quali imputabile al virus dell'epatite C. Si può affermare in effetti che l'infezione da HCV sia allo stato attuale la principale causa di malattia cronica del fegato e della mortalità ad esse collegate.

La lunga durata di malattia fa sì che l'impatto massimo della infezione HCV sia atteso in realtà intorno all'anno 2010. Inoltre, le attuali modalità di trattamento dell'infezione HCV, ancorché sensibilmente migliorate, restano insufficientemente efficaci e di elevato costo [3].

La trasmissione del virus avviene per lo più per via ematogena, a causa dell'utilizzo di sostanze stupefacenti endovenose, o per trasfusioni di sangue infetto, anche se quest'ultima via di trasmissione ha subito un drammatico decremento grazie all'introduzione dello screening per i donatori a partire dal 1990; più rara è la trasmissione per via sessuale.

Nell'ultimo decennio, la storia naturale dell'infezione HCV è stata sufficientemente ben delineata. L'età in cui l'incidenza di infezione è più elevata è compresa tra i 20 e i 39 anni; non sembrano esservi differenze legate alla razza. L'infezione acuta HCV decorre in genere in modo asintomatico, ovvero con sintomi di lieve entità, come malessere, nausea e dolore in ipcondrio destro, e di breve durata; i casi di epatite C fulminante sono estremamente rari.

A fronte della modestia delle manifestazioni cliniche legate all'infezione acuta, si rileva una elevatissima probabilità di cronicizzazione, stimata avvenire in circa l'85% dei casi. La causa di questa elevata prevalenza di cronicizzazione non è del tutto chiara, anche se si pensa siano coinvolti sia fattori di origine virale, come la diversità genetica e la sua tendenza a mutare rapidamente, che gli consente di sfuggire ai meccanismi di risposta immune, sia fattori legati all'ospite [4, 5]. L'infezione cronica è, di solito, lentamente progressiva, ed in soggetti che l'abbiano conseguita tardivamente, può restare silente anche per tutta la vita; quasi tutti i pazienti restano HCV-RNA positivi, ed il 60-80% presenta un persistente aumento degli indici di funzionalità epatica. In generale la prognosi per questi pazienti è buona, con un'aspettativa di vita simile a quella della popolazione normale dopo 10 anni, anche se vi è una maggior probabilità che la causa di morte sia legata ad insufficienza epatica. Tuttavia, dopo 20 anni di infezione, la probabilità di sviluppare una cirrosi è stimata pari almeno al 20%, con ulteriore progressione verso il carcinoma epatocellulare (HCC) in una percentuale inferiore (1-3%) [6-8]. A partire da questo arco temporale, si realizza un

effetto misurabile sulla sopravvivenza dei soggetti infettati: nei casi di epatite non-A, non-B post-trasfusionale la mortalità a 18 anni è risultata pari al 3.3%, in confronto ad una mortalità dell'1.5% riscontrato in soggetti trasfusi che non avevano sviluppato epatite [9].

La velocità di progressione di malattia può però essere molto diversa da un soggetto all'altro, con un'amplissima variabilità dell'evoluzione cirrotica. In particolare questa risulta più probabile in pazienti anziani, con maggior durata di malattia, con lesioni istologiche più avanzate, con genotipo 1b, con aumento del contenuto di ferro epatico, di sesso maschile e che consumino una elevata quantità di alcol (>50 g/die) [10]; oltre naturalmente alle infezioni con HBV e HIV. Di tutti questi parametri, però, quello più indicativo sembra essere l'istologia, assieme alla durata di malattia, che li condiziona in realtà tutti.

### **Epatite C ed epatocarcinoma**

Un capitolo a parte merita, per le sue conseguenze e per gli scopi della nostra ricerca, la relazione tra HCV ed HCC. Questo, per la sua gravità, rappresenta forse la più temibile complicanza dell'infezione cronica da virus C e si sviluppa con frequenza variabile dall'1 al 4% dei soggetti che sviluppano cirrosi in seguito all'infezione, con picchi del 7% in Giappone. Questa frequenza è maggiore di quella riportata per cirrosi legate all'infezione da HBV o alcool correlate. D'altro canto il 90% di questi tumori si sviluppa in pazienti cirrotici. Il tempo medio che intercorre tra l'infezione e lo sviluppo di malattia è di circa trenta anni, cioè circa lo stesso tempo che occorre per sviluppare cirrosi. Inoltre tutti i fattori che predispongono alla cirrosi sono associati ad un maggior rischio di sviluppare l'HCC, anche se non è ancora chiaro il peso di questi fattori di rischio, essendo la cirrosi la via finale comune su cui tutti tali fattori vanno ad agire, venendo così a creare una sorta di circolo vizioso [11]. Infine, è stata notata una correlazione con il genotipo 1, ed in particolare l'HCV-1b; questo, oltre ad essere il più frequente nel mondo, è quello che più frequentemente si ritrova nei pazienti con HCC [12]. L'incidenza di questa neoplasia è andata aumentando negli Stati Uniti, in accordo con le previsioni, da 1,4 casi per 100,000 del 1976 ai 3,0 per 100,000 del periodo dal 1996 al 1998, rimanendo, comunque, probabilmente sottostimata del 20-30%, essendo stati considerati solo i casi istologicamente provati. In accordo con l'aumento d'incidenza, è stato anche registrato, nello stesso periodo, un aumento della mortalità per HCC, che è passata da 1,8 per 100,000 a 3,1 per 100,000, a dimostrazione della rapidità con cui questa neoplasia porta a morte dopo la diagnosi [13]. La sopravvivenza media è infatti di 7-8 mesi dalla diagnosi, in assenza di significativi miglioramenti negli ultimi 25 anni, con percentuali che non superano il 3% a 5 anni.

Non è purtroppo ancora chiaro il meccanismo attraverso cui l'HCV possa favorire l'epatocarcinogenesi. La dissezione dei meccanismi molecolari coinvolti sarebbe estremamente importante da un punto di vista clinico, perché consentirebbe di definire con chiarezza i soggetti a rischio di sviluppo di HCC, ed aprirebbe nuove prospettive per la profilassi e la terapia di tale malattia. Una ipotesi tra le più accreditate è che l'HCV possa esercitare un ruolo carcinogenetico indiretto, attraverso lo stabilirsi di uno stato infiammatorio cronico nel fegato.

Una possibilità alternativa è che l'infezione HCV possa favorire in modo diretto la trasformazione neoplastica degli epatociti, per esempio con interferenza di qualcuno dei prodotti genici del virus col metabolismo cellulare, dando luogo infine ad una trasformazione tumorale. Va rilevato a questo proposito che l'HCV non possiede un intermedio a DNA, in contrasto con quanto accade per l'infezione da virus B dell'epatite (HBV), che esita nell'integrazione del genoma del virus in quello dell'ospite. Proprio questo processo di integrazione genomica è ipotizzato essere implicato nella oncogenicità dell'HBV [14].

### **Proteina del core ed epatocarcinogenesi**

Un'ipotesi stimolante è che nel meccanismo di epatocarcinogenesi dell'infezione cronica HCV possa giocare un ruolo chiave la putativa proteina del core HCV, come suggerito da esperimenti sul topo transgenico. In effetti, recenti ricerche hanno suggerito che la proteina del core HCV, oltre ad essere una proteina strutturale implicata nel package dell'RNA virale, regola la trascrizione di geni cellulari e virali, è in grado di inibire, in certe condizioni sperimentali, l'apoptosi mediata da cisplatino e da c-myc, e in cooperazione con l'oncogene ras può trasformare fibroblasti primari di

embrione di ratto [15-17]. La proteina del core HCV sembrerebbe essere il più potente induttore di signaling intracellulare tra 7 diverse proteine virali derivate da HCV e HBV. In questo contesto è interessante notare come, secondo alcuni autori, la proteina del core HCV potrebbe avere un importante ruolo biologico nella promozione della crescita cellulare, reprimendo la trascrizione del fattore di trascrizione con azione di soppressore tumorale p53 [18]. Viveversa secondo altri potrebbe aumentare l'attività di transattivazione della p53. Un dato controverso è anche la possibile localizzazione nucleare della proteina del core nel nucleo, oltre che nel citoplasma, della cellula ospite. In effetti la sequenza contiene 3 segnale di localizzazione nucleare ai residui 38-43, 58-64 e 66-71 che richiamano quelli descritti per altre proteine nucleari. La localizzazione nucleare è stata osservata da taluni, mentre è decisamente negata da altri. Tuttavia proprio la localizzazione nucleare, essendo l'HCV un virus a replicazione citoplasmatica, potrebbe suggerire un ruolo della proteina non correlato con la replicazione virale, ma piuttosto un suo coinvolgimento nella regolazione di promotori di geni cellulari. In particolare è stato dimostrato che la presenza della proteina core nel citoplasma aumenta la quantità della proteina p21 (uno dei geni bersaglio della p53, in grado di indurre un arresto del ciclo cellulare in fase G1/S) attivando la p53. Contrariamente la forma nucleare riduce la quantità della p21 attraverso una via-p53 indipendente [19].

## **DEFINIZIONE ED OBIETTIVI DEL PROGETTO**

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

A questo fine, le prime fasi sperimentali saranno:

- clonaggio della proteina del core
- studio dell'espressione e della localizzazione della proteina del core in due diverse linee cellulari, una derivata da rene di scimmia (COS-7) e una da epatocarcinoma umano (HepG2)
- studio di eventuali differenze nell'espressione della proteina in funzione dello splicing cellulare

## **MATERIALI E METODI**

### **1. Isolamento del genoma virale**

Il genoma virale (RNA) del virus dell'epatite C (HCV) è stato estratto dal siero di 5 pazienti HCV positivi, scelti in base al genotipo del virus (tipo 1b) e alla carica virale (>1000 UI/ml). L'RNA è stato estratto utilizzando il QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Milano Italia). Gli acidi nucleici sono stati conservati a -70°C.

### **2. Amplificazione delle sequenze virali**

#### **2.1 Retrotrascrizione**

I campioni di RNA estratti sono stati inizialmente retrotrascritti in cDNA (copia in DNA); la retrotrascrizione è stata effettuata in presenza di 2 unità (UI) dell'enzima trascrittasi inversa ThermoScript RT (Invitrogen, S.Giuliano Milanese, Italia) utilizzando primer random..

#### **2.2 Reazione polimerasica a catena (PCR)**

I cDNA così ottenuti sono stati amplificati tramite due reazioni successive di reazione polimerasica a catena (nestedPCR), utilizzando per la seconda reazione due primers localizzati internamente al primo prodotto. Le sequenze oligonucleotidiche utilizzate sono di nostro disegno. Nella prima amplificazione sono stati utilizzati i primers senso *core203p* ed antisenso *core964m* (dove il numero indica il nucleotide da cui parte la sintesi del primer); il prodotto della reazione è stato quindi sottoposto a nested PCR, utilizzando i primers senso *core342p* e antisenso *core918m*. I primers sono stati sintetizzati in base alla sequenza del genoma completo del virus depositata presso la GeneBank (Numero di accesso NC\_004102), ed i primer interni sono stati opportunamente modificati per facilitare il successivo clonaggio del gene. In particolare sono stati inseriti due siti di restrizione Hind III nel *core342p* ed Eco RI nell'antisenso; inoltre nel primer antisenso è stato introdotto il codone di STOP in corrispondenza del codone 916-918 (sottolineato nella sequenza):

Senso: *core203p* 5'-TAA ACC CGC TCA ATG CCT GG-3';

senso: *core342p* 5'- CCC AAG CTT GCA CCA TGA GCA CGA ATC C -3';

antisense: core918m 5'-CGG AAT TCT TAG GCT GAA GCG GGC ACA GTC-3';  
antisense: core964m 5'-GGG CAA TCA TTG GTG ACA TGG TA-3'

Ogni campione di cDNA è stato amplificato e clonato in doppio.

### **2.3 Purificazione frammento di PCR**

Un'aliquota dei prodotti di amplificazione, è stata quindi visualizzata con elettroforesi su gel di agarosio all'1.5%, in presenza etidio bromuro (1µg/ml). Le bande dei campioni risultati positivi sono state tagliate dal gel, ed il DNA purificato utilizzando il kit Nucleospin Extract (Macherey-Nagel, Düren, Germany). L'eluito è stato conservato a -20°C.

## **3. Clonaggio nel plasmide pMOS blue**

### **3.1 Preparazione dei batteri Calcio competenti**

I vari passaggi di clonaggio sono stati eseguiti utilizzando ceppi batterici di Escherichia coli DH10b calcio competenti, aliquotati e congelati a -70°C.

### **3.2 Ligazione e trasformazione dei batteri**

I frammenti purificati sono stati inizialmente clonati tramite il Blunt-ended PCR cloning Kit (Amersham Bioscience, Milano, Italia), che come vettore utilizza il plasmide pMOS tagliato con l'enzima EcoR V e defosforilato; la ligazione è stata incubata a 22°C per 2 ore. Per la trasformazione, i batteri competenti sono stati sottoposti a heat-shock in presenza del prodotto della ligazione (incubazione a 42°C per 2 minuti e immediato raffreddamento su ghiaccio).

Il plasmide pMOS permette la selezione dei plasmidi che hanno incorporato l'inserito oltre alla selezione su ampicillina anche grazie all'utilizzo del XGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-galattoside), in quanto l'incorporazione interrompe il gene lacZ, che codifica per il frammento alfa della beta-galattosidasi, rendendo i batteri incapaci di utilizzare il galattosio, e quindi di scindere la molecola di XGal. Le colonie positive risulteranno quindi bianche, mentre quelle negative blu.

### **3.3 Minipreparazione di DNA batterico (miniprep)**

Singole colonie bianche sono state prelevate, e da esse sono state ottenute mini preparazioni di DNA batterico. Dopo l'estrazione 5 µl di DNA plasmidico sono stati digeriti per 30 min a 37°C con gli enzimi EcoR I e Hind III (NBI Fermentas, Hanover, MD, USA). Il prodotto della digestione è stato analizzato sul gel di agarosio allo 1.5% per verificare da quali preparazioni plasmidiche si potevano liberare il frammento delle dimensioni desiderate.

### **3.4 Sequenziamento**

Da ogni clonaggio è stata scelta una miniprep positiva, e 500 ng di DNA plasmidico sono stati inviati alla Primm srl (Milano, Italia) per il sequenziamento dell'inserito, utilizzando primer plasmide specifici e/o gene specifici.

### **3.5 Midi-preparazione di DNA plasmidico**

Dai batteri, che al sequenziamento hanno mostrato di contenere la sequenza corretta del gene, è stata ottenuta una Midi-preparazione di DNA plasmidico utilizzando il kit NucleoBond PC 100 (Macherey-Nagel, Düren Germania). Il plasmide così ottenuto, nominato p102, è stato conservato a -20°C.

## **4. Subclonaggio della sequenza del core nei plasmidi di espressione pDNR e pMT2**

Per l'espressione della proteina del core in cellule eucariote, il frammento di cDNA è stato subclonato in due plasmidi batterici ingegnerizzati, così che il cDNA fosse posto sotto il controllo di due promotori virali, in modo che questi fossero in grado di dirigerne la trascrizione con alta efficienza una volta introdotti in cellule di mammifero. A questo scopo sono stati utilizzati tre diversi vettori: il plasmide pDNR (BD Clontech, Milano, Italia), in cui è inserito il promotore early del citomegalovirus, ed i plasmidi pMT2 e pMT2HA, in cui è inserito il "major late promoter" dell'Adenovirus. Il plasmide pMT2HA è caratterizzato dalla presenza di una sequenza nucleotidica codificante 9 amminoacidi dell'emoagglutinina del virus influenzale (HA), a monte del Multiple Cloning Site. L'inserimento del frammento "in frame" con la sequenza permette di ottenere una proteina ricombinate, che porta l'HA (Flag) all'estremità N-terminale della proteina; in particolare la sequenza utilizzata è stata ricavata da un epitopo

dell'emoagglutina del virus influenzale (HA), ed è nota per non interferire con le funzioni di trasporto e localizzazione delle proteine ricombinanti.

#### **4.1 Digestione dei plasmidi**

Il plasmide pMT2 ed il plasmide pMT2-HA sono stati inizialmente sottoposti a taglio con l'enzima di restrizione Not I; successivamente si è provveduto a pareggiarne le estremità aggiungendo alla reazione l'enzima Klenow.

Dopo inattivazione dell'enzima, i plasmidi sono stati sottoposti a digestione con l'enzima EcoR I; contemporaneamente il plasmide p102 è stato sottoposto a digestione con l'enzima Hind III, e a successivo pareggiamento delle estremità, come precedentemente descritto. Il frammento contenente il *core* è quindi stato liberato tramite digestione con EcoR I.

Il plasmide pDNR ed il plasmide p102 sono stati sottoposti a digestione con gli enzimi EcoR I e Sal I.

#### **4.2 Ligazione e trasformazione dei batteri**

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

I batteri sono quindi stati fatti crescere su piastre in presenza di ampicillina. Dalle colonie cresciute sono state fatte alcune miniprep e sottoposte a digestione con gli opportuni enzimi di restrizione (vedi punto 3.3). Nel caso in cui il core sia stato inserito nel plasmide pMT2-HA le colonie positive sono state sequenziate per verificare l'inserimento "*in frame*" della sequenza.

## **RISULTATI RAGGIUNTI al I ANNO**

### **Amplificazione della sequenza del *core***

È stato possibile amplificare correttamente l'intera sequenza desiderata solamente da 2 dei 5 sieri utilizzati. Questo risultato era in parte previsto, vista l'elevata variabilità della sequenza genomica virale: infatti vi erano basse probabilità che i primers, sintetizzati sulla base di una delle sequenze depositate presso la Genbank, avessero un grado di omologia sufficiente da permettere l'ibridizzazione dei primers a tutti i cDNA estratti dai pazienti.

### **Clonaggio della sequenza *core***

I prodotti dell'amplificazione sono quindi stati clonati nel plasmide pMOS. Il DNA plasmidico è stato quindi sequenziato nella regione dell'inserimento con un primer specifico del plasmide (T7), ed uno specifico della sequenza del *core*.

L'analisi della sequenza dei cloni ottenuti ha evidenziato la presenza di numerose mutazioni di singoli nucleotidi rispetto alla sequenza di riferimento NC\_004102.

La porzione 5' si è rivelata la più conservata in accordo con i dati della letteratura. I risultati del sequenziamento ci hanno portato ad una ulteriore eliminazione. E' risultato infatti che in uno dei sieri era stata amplificata una sequenza in cui era presente una delezione di 4 nucleotidi (nt 891-894): tale delezione introduce un "frameshift" nella lettura e la proteina risulta troncata a questo livello. Pur essendo la delezione localizzata alla fine della sequenza, abbiamo ritenuto al di là degli scopi del presente lavoro l'analisi di eventuali mutazioni sulla proteina del *core*, e quindi gli esperimenti successivi sono stati condotti esclusivamente con i cloni ottenuti dal paziente C (preparazione plasmidica in pMOS denominata p102). Va sottolineato come la maggior parte di queste mutazioni si siano rivelate silenti, e la sequenza amminoacidica della proteina risulti altamente conservata. Solamente le mutazioni in posizione TGC 611-612-613 ATG, nucleotidi costituenti lo stesso codone, hanno portato ad una sostituzione amminoacidica C91M. La sequenza ha infine permesso di verificare il corretto inserimento del codone di stop in posizione 915.

Nel caso del clonaggio in pMT2-HA la sequenza del plasmide ottenuto ha permesso di verificare il mantenimento del “frame” tra la sequenza codificante per la HA-Flag e quella codificante per la proteina del *core*.

### **PROSPETTIVE FUTURE**

Per l'immediato futuro sono in corso i primi esperimenti di trasfezione in cellule COS7 ed HepG2. In una fase successiva ci proponiamo di esprimere la proteina in epatociti primari. Da esperimenti preliminari effettuati nel nostro laboratorio è stato verificato che questo sistema non è efficientemente trasfettabile con i comuni sistemi (calcio, destrano, diverse formulazioni lipidiche commerciali). Per tal ragione ci si è indirizzati sull'utilizzo di vettori ricombinanti adenovirali e ciò costituirà gran parte del mio lavoro di dottorato per i prossimi due anni.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-62.
2. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39(1):5-19.
3. Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 2004;24 Suppl 2:3-8.
4. Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 1995; 21:639-44.
5. Gonzalez-Peralta RP, Qian K, She JY. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1996; 49:242-7.
6. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004; 12:96-102.
7. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Epatite cronica. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, eds. *Harrison - Principi di Medicina Interna*. Vol. 2. Milano: McGraw-Hill, 2002.
8. Heintges T, Wands JR. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology* 1997; 26:521-6.
9. Seeff LB, Buskell-Bales Z, Wright EC. Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. The National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group. *N Engl J Med* 1992; 327:1906-11.
10. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003; 362:2095-100
11. El-Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2462-7.
12. Bruno S, Silini E, Crosignani A. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 1997; 25:754-8.
13. El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2001; 5:87-107.
14. Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. Regulated Processing of Hepatitis C Virus Core Protein Is Linked to Subcellular Localization . *J Virol* 1997; 71(1):657-62.
15. Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 2004;11:383-93.
16. Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C Virus Core from Two Different Genotypes Has an Oncogenic Potential but Is Not Sufficient for Transforming Primary Rat Embryo Fibroblasts in Cooperation with the *H-ras* Oncogene. *J Virol* 1998; 72(4):3060-65.
16. Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 21; 202(2):149-56.
17. McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000; 7(1):2-14.

18. Kao CF, Chen SY, Chen JY, Wu Lee YH. Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein. *Oncogene* 2004; 23(14):2472-83.
19. Yamanaka T, Kodama T, Doi T. Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 294(3):528-34.

## **PUBBLICAZIONI**

A Carbone, U Rodeck, F A Mauri, M Sozzi, F Gaspari, C Smirne, A Prati, A Addeo, A Novarino, A Robecchi, O Bertetto, G Emanuelli, G Bellone. Human pancreatic carcinoma cells secrete bioactive Interleukin-18 after treatment with 5-Fluorouracil: Implications for anti-tumor immune response. Clin Cancer Res, Submitted 2004.

P Toniutto, C Fabris, C Avellini, E Fumo, M Caldato, L Apollonio, E Rossi, R Minisini, C Smirne, M Pirisi. Excess body weight, timing of hepatitis C recurrence, and early fibrosis progression after liver transplantation. Liver Transpl, Submitted 2004.

M Pirisi, E Salvador, Z Bisoffi, C Smirne, C Gigli, R Minisini, G Fortina, G Bellomo, E Bartoli. Strongyloidiasis among elderly in-patients: prevalence and associated factors. Epidemiol Infect, Submitted 2004.

## **ABSTRACTS**

C Gigli, M Pirisi, Z Risoffi, Ferrante R, G Fortina, C Smirne, E Salvador. Prevalenza di infezione da Strongiloidiasi in pazienti anziani ospedalizzati: metodi a confronto. XXXIII Congresso nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Padova, 8-11 giugno 2004, Microbiologia Medica 2004: 19(2): 230.

C Smirne, R Minisini, R Rapetti, F Capelli, S Grazioli, E Scaglia, P Carnevale-Schianca, M Pirisi. Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D polymorphism in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). EASL Monothematic Conference: "Nonalcoholic Steatohepatitis: from cell biology to clinical practice". Lisbona, Portogallo 17-18 settembre 2004.

E Zavattaro, E Ceriani, R Minisini, C Smirne, R Tiberio, M Pirisi, G Leigheb. Evaluation of plasma interferon alpha concentration as a marker of disease severity in human psoriasis. European congress on Psoriasis 2004. Parigi, 21-24 ottobre 2004 (accepted).

P Toniutto, C Fabris, L Apollonio, E Fumo, M Caldato, C Smirne, R Minisini, M Pirisi. Excess weight gain after liver transplantation and early fibrosis progression of recurrent hepatitis C. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston USA, 29 ottobre- 2 novembre 2004 (accepted).

## **PARTECIPAZIONE A CONGRESSI 2003/2004**

EASL School of Hepatology Course 2. Complications of cirrhosis and liver cancer. Barcelona 11-12 giugno 2004.

EASL Monothematic Conference. The Role of Liver Biopsy in the Diagnosis and management of Chronic Liver Disease. Torino, 14-15 giugno 2004.

Terzo convegno sulla real time PCR, Università Statale di Milano, 24 giugno 2004.

EASL Monothematic Conference: "Nonalcoholic Steatohepatitis: from cell biology to clinical practice". Lisbon, Portugal 17-18 settembre.

## **SEMINARI SEGUITI 2003/2004**

Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes. 3 maggio 2004.

Biomedical discovery using microarrays: principles, prospects and problems. 14 Giugno 2004.

PI 3-kinase  $\gamma$  controls cardiac contractility and hypertrophy through kinase-dependent and independent functions. 29 giugno 2004.

Meccanismi patogenetici della Leucemia Linfatica Cronica. 30 giugno 2004.

From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions. 5 luglio 2004.

Ethanol metabolism and Toxicity in Pregnancy. 7 Luglio 2004.

Pitfalls of genetic studies in liver disease. 14 luglio 2004.