

RIASSUNTO TESI DI DOTTORATO

Candidato: Dott. CARLO SMIRNE

Titolo: clonaggio ed espressione della proteina core dell'HCV e messa a punta di un sistema di coltura epatocitaria

I meccanismi attraverso cui l'infezione da virus dell'epatite C (HCV) porta allo sviluppo di epatocarcinoma sono sconosciuti, anche se viene ipotizzato un ruolo carcinogenetico della proteina core dell'HCV. Per contribuire alla definizione di tali meccanismi, abbiamo studiato l'espressione e la localizzazione della proteina *core* in diverse linee cellulari, di derivazione renale (COS-7 e HEK-293) ed epatocitaria (HepG2 e Huh7).

In un primo tempo abbiamo clonato il solo frammento di proteina core e l'abbiamo posto sotto il controllo di due diversi promotori virali: quello del Citomegalovirus e quello dell'Adenovirus. I risultati hanno mostrato una inibizione della proteina sul primo di questi promotori, in tutte le linee cellulari.

In un secondo tempo abbiamo voluto osservare se vi fossero differenze nell'espressione della proteina in funzione dello splicing cellulare. A questo scopo, abbiamo clonato frammenti più lunghi della proteina, contenenti cioè la regione 5'-UTR e le sequenze E₁ ed E₂, e li abbiamo fatti esprimere nelle cellule delle linee COS-7 e HEK-293. I risultati ottenuti hanno documentato la presenza di una regione promuovente l'espressione proteica a livello della regione 5'-UTR, e hanno confermato la presenza di due diverse forme di proteina, di lunghezza diversa (p21 e p19).

Abbiamo successivamente voluto verificare la localizzazione (citoplasmatica o nucleare) della proteina in funzione del tipo cellulare. Alla immunofluorescenza indiretta, si è osservata, nelle COS-7 e nelle HEK-293, la sola localizzazione citoplasmatica della proteina, mentre nelle HepG2 e nelle Huh7 è stato possibile osservare anche una possibile localizzazione nucleare.

Per meglio definire il possibile ruolo della proteina core dell'HCV nello sviluppo di epatocarcinoma, il nostro prossimo obiettivo sarà quello di affiancare alle linee cellulari trasformate anche studi su sistemi cellulari il più possibile "normali", nel tentativo di sviluppare condizioni simili a quelle fisiologiche. Il nostro gruppo ha infatti recentemente sviluppato, in collaborazione con il Prof. Curcio dell'Università degli Studi di Udine, un sistema che consente la crescita *in vitro* di epatociti umani in colture a lungo termine, pur mantenendo caratteristiche di normalità. Infatti dal punto di vista morfologico si tratta di

cellule a morfologia tipicamente epatocitaria sia in microscopia tradizionale (con marcatura immunohistochimica per CAM-5.2, citocheratina 8 e CEA) che in microscopia elettronica. Gli elementi cellulari hanno inoltre dimostrato di avere funzioni differenziate (presenza dei trascritti di una serie di proteine di sintesi epatica quali albumina, eritropoietina, fattore IX della coagulazione, transferrina, ma non di α FP; presenza di albumina dosabile nei surnatanti). Tale sistema è stato poi caratterizzato in termini di integrità genomica, anche dopo lungo tempo in coltura.

Siamo stati inoltre in grado, modulando le concentrazioni dei fattori di crescita specifici, di mantenere le cellule in fase di crescita o di indurre la differenziazione. In terreno di differenziazione si verifica un blocco della moltiplicazione, e le cellule possono essere mantenute in questa condizione per un tempo prolungato (fino a un mese).

Al fine di verificarne lo splicing e la localizzazione della proteina core dell'HCV e di studiare gli effetti dell'espressione di tale proteina sulla trascrizione ed espressione di diverse proteine cellulari, abbiamo quindi intrapreso una serie di esperimenti di transfezione del sistema epatocitario suddetto.

In una fase preliminare abbiamo verificato che il sistema cellulare è di difficile transfezione con i classici metodi chimici e che risultati migliori si ottengono utilizzando come vettori adenovirus ricombinanti contenenti il core. Tuttavia, anche in questo caso l'efficienza di trasfezione si è rilevata inferiore all'atteso. Sono pertanto in corso esperimenti preliminari con vettori lentivirali (esperimenti in collaborazione con la Prof. Follenzi dell'Università degli studi del Piemonte Orientale), particelle ibride virali derivate da un lentivirus (HIV-1) e dal pericapside del vescicular stomatitis virus (VSV.G). Abbiamo al momento ottenuto il corretto inserimento della sequenza scelta (core e sequenza E₁, di 1091 pb) nel costrutto di trasferimento. Se si riusciranno ad ottenere le particelle virali complete, questa avranno la capacità di trasdurre stabilmente cellule quiescenti e totalmente differenziate, risultando quindi ideali per studiare l'espressione del core nel nostro sistema cellulare.

I nostri dati potrebbero aprire interessanti prospettive per quanto riguarda la dissezione dei meccanismi molecolari dell'epatocarcinogenesi indotta da HCV, in particolare per quanto correlato all'espressione ed al processing della proteina core.