

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XIX*

TESI:
**CLONAGGIO ED ESPRESSIONE DELLA PROTEINA CORE
DELL’HCV E MESSA A PUNTA DI UN SISTEMA DI CULTURA
EPATOCITARIA**

Candidato: dott. CARLO SMIRNE

Tutor: Prof. MARIO PIRISI

INDICE

INTRODUZIONE

Parte prima: il virus dell'epatite C

Epidemiologia dell' infezione da HCV	Pag. 3
Storia naturale dell' infezione da HCV	Pag. 4
Patogenesi del danno da HCV	Pag. 6
Epatite C ed epatocarcinoma	Pag. 8
Biologia del virus dell' epatite C	Pag. 11

Parte seconda: fegato e rigenerazione

Anatomia e fisiologia del fegato nell'adulto	Pag. 23
Modello di rigenerazione e citochine	Pag. 27
Colture epatocitarie	Pag. 29

Parte terza: cenni sui vettori lentivirali	Pag. 33
SCOPI DEL LAVORO	Pag. 35

MATERIALI E METODI

Espressione della proteina core	Pag. 37
Sviluppo e caratterizzazione di una linea epatocitaria normale	Pag. 44

RISULTATI

Espressione della proteina core	Pag. 59
Sviluppo e caratterizzazione di una linea epatocitaria normale	Pag. 71

PROSPETTIVE FUTURE	Pag. 77
---------------------------	---------

DISCUSSIONE	Pag. 78
--------------------	---------

BIBLIOGRAFIA	Pag. 85
---------------------	---------

INTRODUZIONE

PARTE PRIMA: IL VIRUS DELL'EPATITE C

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].

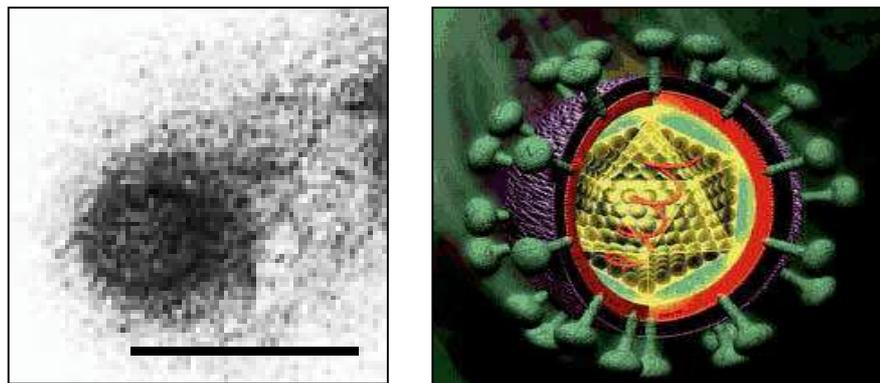


Figura 1: Immagine al microscopio elettronico e ricostruzione tridimensionale del virione. La barra nella prima immagine indica 100 nm.

L'HCV è stato quindi 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 di superficie E₁ ed E₂ [2-4].

EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HCV

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 [4]. 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 [5]. 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.

Anche se il Centro per il Controllo delle Malattie (CDC) del Governo U.S.A. ha stimato che il numero di nuovi casi di epatite acuta da virus C negli Stati Uniti sia diminuito dai circa 230,000 del 1980 ai circa attuali 36,000 casi per anno, 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 [6]. Il costo annuale associato all'epatite C negli Stati Uniti, nel 1997, è stato stimato essere di 5,46 bilioni di dollari; simile al costo annuale dell'asma [7].

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. La via di trasmissione più efficace è quella parenterale; in particolare, l'utilizzo di droghe endovenose costituisce sicuramente il maggior fattore di rischio al giorno d'oggi [8]. Infatti, più del 60% delle nuove infezioni sembrerebbe legata all'uso di sostanze stupefacenti, con una percentuale di sieroprevalenza pari al 64,7% nei soggetti che ne facciano uso per un periodo di un anno. Questi tassi sono chiaramente maggiori rispetto a quanto riscontrato per virus dell'epatite B (HBV) (49,8) e virus dell'immunodeficienza umana (HIV) (13,9) [9].

Le trasfusioni di sangue ed emoderivati erano in passato il principale fattore di rischio per l'infezione, con percentuali di pazienti infetti stimate fino al 10%; questo rischio si è pressoché azzerato a partire dal 1990, arrivando ad essere di circa 1:100,000 [10]. Nel 1999 è poi stato introdotto un nuovo metodo di screening, basato sulla rilevazione degli acidi nucleici, che si stima possa abbassare ulteriormente il rischio nei prossimi anni a valori compresi tra 1: 500,000 e 1:1,000,000 [11], naturalmente aumentando in modo considerevole il costo dello screening.

Decisamente di minore importanza sono le infezioni legate all'esercizio di professioni sanitarie, ed in particolare in funzione della puntura accidentale con aghi infetti. Non sono riportati casi legati al contatto con le mucose o cute non integra, anche se, proprio a Novara, è stato riportato un caso di infezione per uno spruzzo di sangue in congiuntiva [12].

L'efficienza della trasmissione per via sessuale appare scarsa, e si verifica soprattutto in soggetti con partners multipli e negli omosessuali; il rischio di trasmissione al partner è uguale in questi due gruppi [13]. Il rischio è invece più elevato nei casi di infezione da HIV.

STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE DA HCV

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 [14, 15]. Tra questi è stata presa in considerazione la presenza di specifici alleli HLA (DRB1 e DQB1), associati a una forma di infezione più lieve [16]; la capacità di sviluppare una forte e prolungata risposta T CD4+ nel sangue periferico, che porta all'eliminazione spontanea del virus, e che è invece assente o ridotta nei pazienti che sviluppano poi infezione cronica [17]. In realtà vi sono diverse ipotesi che riguardano la capacità del virus di modulare la risposta immune dell'ospite a proprio favore; ad esempio l'infezione delle cellule dendritiche comporterebbe una riduzione della risposta CD4+, mediata dall'inibizione della produzione di IL2; o il blocco della maturazione, differenziazione e proliferazione delle cellule T da parte del virus. Appare quindi chiaro come il virus disponga di plurimi meccanismi che gli permettano di sfuggire la risposta immunitaria e gli consentano di cronicizzare all'interno dell'organismo, impedendo, tra l'altro, anche nei casi di completa guarigione, lo sviluppo di una memoria immunitaria [18].

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%) (Fig.2) [18-20]. 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 [21].

I sintomi legati all'infezione cronica sono poco specifici e non sempre ascrivibili direttamente all'epatite stessa, essendo rappresentati in primo luogo da astenia, nausea, anoressia, mialgie, artralgie, perdita di peso e debolezza; in ogni caso

difficilmente divengono invalidanti, anche se possono ridurre la qualità di vita. Sintomi più specifici, ma presenti in un piccolo numero di pazienti, sono invece il dolore addominale, prurito ed urine scure. In ogni caso tutti questi non riflettono necessariamente l'attività di malattia [22, 23].

Manifestazioni extraepatiche contribuiscono al quadro clinico in una frazione dei pazienti infettati, e sono rappresentate soprattutto dalla crioglobulinemia mista essenziale con possibile evoluzione linfomatosa, una sialoadenite secca ricordante la sindrome di Sjögren [24, 25], il lichen planus e la porfiria cutanea tarda. Da non sottovalutare sono anche i disordini psichiatrici, come ansia e depressione [26].

La velocità di progressione di malattia può però essere molto diversa da un soggetto all'altro, con un'ampissima 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) [5]; 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.

Infatti, i pazienti che hanno una necrosi e infiammazione lievi e scarso grado di fibrosi presentano una progressione alla cirrosi scarsa e una prognosi eccellente; quelli che invece abbiano un'attività infiammatoria moderata o grave o fibrosi più marcata, hanno una probabilità di sviluppare una cirrosi che è molto più elevata. La progressione di malattia risulta inoltre accelerata nei pazienti che abbiano anche altre patologie, come l'epatite B, epatopatie da alcol, emocromatosi o deficit di α_1 -antitripsina [19].

PATOGENESI DEL DANNO DA HCV

Da un punto di vista anatomico-patologico, il virus provoca un modesto infiltrato infiammatorio linfocitario negli spazi periportal, un notevole aumento dell'attivazione delle cellule di rivestimento dei sinusoidi, steatosi, occasionalmente lesioni delle cellule epiteliali biliari senza interruzione della membrana basale, necrosi focale e

lesioni degenerative lobulari. Di queste lesioni, tuttavia, l'unica che possa essere ascritta ad un diretto effetto citopatico del virus è la steatosi, ovvero l'accumulo di lipidi all'interno dell'epatocita; tutte le altre appaiono verosimilmente legate alla risposta immunitaria locale. In realtà, l'unico genotipo responsabile di questo in modo diretto è l'HCV-3, mentre negli altri genotipi sembra che siano coinvolti soprattutto fattori metabolici esogeni [19].

Non è ben chiaro il meccanismo con cui il virus produca questi effetti; è stato ipotizzato un ruolo della proteina del *core*, che si è visto regolare l'accumulo di lipidi *in vitro*, ma il meccanismo con cui questo possa avvenire *in vivo* resta ancora da spiegare [27].

La gravità delle lesioni, quindi, è legata alla risposta immunitaria locale, che può essere amplificata dall'accumulo di linfociti T richiamati dall'espressione di molecole d'adesione e di chemochine. L'infiltrato linfocitario è costituito sia da linfociti T CD4+, localizzati prevalentemente negli spazi periportali (soprattutto dai Th1 che producono IFN- γ), sia da linfociti CD8+, localizzati negli spazi periportali e nei lobuli. Alcuni studi hanno infatti dimostrato che le lesioni possono essere causate dalla produzione di citochine Th1; anche la risposta citotossica sembra giocare un ruolo importante nell'uccidere sia le cellule infettate sia le cellule circostanti.

L'immunità indotta dal virus C appare comunque insufficiente nel proteggere dalle reinfezioni, anche se non se ne conosce la ragione. Sebbene vi sia un gran numero di variabili genetiche che potrebbero influenzare i meccanismi di "escape" immunitario del virus e la sua capacità di persistenza nell'ospite, è noto che le proteine virali influenzano direttamente la risposta immunitaria dell'ospite, modulandola. In particolare il virus si replica sia nel midollo osseo, sia nei monociti circolanti nel sangue periferico, ma nella maggior parte degli uomini la risposta immune sembra incapace di eliminare l'infezione. Un ruolo importante in questo evento sembra giocato dai leucociti circolanti; questi infatti sembra abbiano una capacità ridotta di secernere citochine di tipo 1 (IL-2 e IFN- γ). Pazienti con malattia cronica e viremia persistente hanno un numero ridotto di monociti secernenti questo pattern citochinico, rispetto a pazienti con infezione autolimitantesi [28]. Questo suggerisce che l'infezione cronica possa derivare da una parziale incapacità a

montare una risposta di tipo 1. Una soppressione di IL-12 e dell' NO (Ossido Nitrico) è stata osservata nei macrofagi e cellule dendritiche esprimenti il *core*; l'espressione del *core* inibisce inoltre la proliferazione delle cellule T e la produzione di IFN- γ *in vitro* [29].

Appurato il ruolo della risposta immune, restano ancora da chiarire i meccanismi con cui questa esplica il danno [18].

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. Ad esempio l'abuso di alcol va ad incrementare notevolmente il rischio, favorendo l'evoluzione verso la cirrosi; in realtà alcuni studi hanno mostrato un lieve aumento di rischio anche in soggetti HCV negativi che consumassero più di 60 g/die di alcol, e che questo rischio aumentava di due volte in caso di associazione con l'HCV [30].

Un'associazione interessante, inoltre, è stata trovata anche con il diabete mellito e l'obesità. Il primo, infatti provoca una steatoepatite che può evolvere in cirrosi nel 5% dei casi ed induce un aumento del fattore insulino-simile, che è potenzialmente carcinogenetico. L'obesità, che poi accompagna frequentemente il diabete, si è vista aumentare il rischio per statosi e fibrosi epatica in soggetti HCV positivi [31, 32]. L'aumento di rischio legato al diabete si è visto però essere significativo solo in

presenza di fattori di rischio maggiori, come l'HCV, l'HBV o la cirrosi alcol correlata [33].

Infine, è stata notata una correlazione con il genotipo 1, ed in particolare l'1b; questo, oltre ad essere il più frequente nel mondo, è quello che più frequentemente si ritrova nei pazienti con HCC, anche se la veridicità di questa correlazione come fattore di rischio indipendente dall'età avanzata non è del tutto chiara. Infatti tutti i genotipi sono stati ritrovati nei pazienti con HCC, se pur in misura minore, e questo ha portato a pensare che l'associazione vista in passato fosse più legata ad una maggiore diffusione di questo genotipo negli anni addietro, che ad un ruolo effettivo delle quasispecie nel determinare un maggior rischio di progressione da cirrosi ad HCC [34].

Ancora da dimostrare, invece è l'associazione inversa tra HCC HCV-correlato e terapia antivirale con interferone. Studi giapponesi, condotti in questo senso, tendono a sottolineare una riduzione significativa d'incidenza tumorale nei gruppi trattati, rispetto ai non trattati, pari al 93% [35]. Studi condotti in Europa, invece, paiono meno ottimisti nel quantificare la riduzione del rischio in seguito a terapia, e, come ovvio, questa sembra essere maggiore nei pazienti che abbiano una risposta sostenuta, piuttosto che nei non responders [36].

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 [37]. 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. Questo aumento d'incidenza negli Stati Uniti è stato spiegato con un aumento della sopravvivenza dei pazienti con cirrosi, e ad un miglioramento nella gestione delle complicanze ad essa correlate, aumentando così le possibilità che questi manifestino un HCC sintomatico, oltre che ad un miglioramento delle tecniche

diagnostiche e di screening. Anche in Europa ed Asia si è assistito ad un incremento dell'incidenza di queste patologie; in particolare in Giappone si è assistito negli ultimi 40 anni ad un triplicarsi degli HCC HCV correlati. Le differenze rispetto agli Stati Uniti sono soprattutto in relazione al picco di età in cui vi è la maggior prevalenza di infezione, che è di 70 anni per il Giappone, ove per altro l'HCC in assenza di infezione è piuttosto frequente, e di 40-49 anni per gli Stati Uniti. In Europa, ed in particolare in Italia, l'epidemiologia dell'HCC è più simile a quella americana. Da noi, infatti, la maggior parte delle infezioni sono state acquisite tra gli anni '50 e '80, a causa dell'utilizzo delle droghe endovenose, di trasfusioni non controllate e della mancanza di protezione nelle pratiche mediche. L'incidenza di HCC è quindi passata da 3,3 per 100,000 del 1970 a 9,2 per 100,000 nel 1994, per poi decrescere a 6,0 per 100,000 nel 1998. Inoltre l'Italia, rispetto agli Stati Uniti, ha una più alta prevalenza di infezione e una più alta incidenza di HCC, con un picco di acquisizione d'infezione più precoce di una decina d'anni, facendo supporre che nei prossimi 10-15 anni gli Stati Uniti vedranno raddoppiare l'incidenza di HCC, seguita poi da una riduzione, come già avvenuto nel nostro paese [38].

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.

A differenza dell'HBV, l'HCV non si integra nel genoma dell'ospite e quindi non va ad interagire direttamente col DNA. Si ritiene che qualcuno dei prodotti genici del virus possa andare ad interferire col metabolismo cellulare, dando luogo infine ad una trasformazione tumorale. Ad esempio, alcuni studi hanno dimostrato come la proteina del *core* possa entrare nel nucleo e proteggere le cellule dai meccanismi apoptotici; anche la proteina NS3 e la proteina NS5 sembrano in qualche modo poter essere coinvolte nella trasformazione delle cellule. Si tratta comunque di un processo "multistep", associato a modificazioni nell'espressione genica dell'ospite, che si riflettono su sviluppo e progressione tumorale.

BIOLOGIA DEL VIRUS DELL'EPATITE C

Il genoma virale

Il genoma del virus è costituito da circa 9500 nucleotidi, codificanti per un'unica poliproteina di 3000 amminoacidi (aa); la sequenza è costituita da due regioni non tradotte altamente conservate (UTRs), agli estremi terminali 5' e 3', che delimitano una "open reading frame" (ORF) codificante la poliproteina. Questa è poi processata, dopo la traslazione, da enzimi di origine sia virale che dell'ospite, nelle proteine strutturali E₁, E₂ e *core* e nelle proteine non strutturali (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. Le proteine strutturali sono localizzate all'estremità N-terminale, regione relativamente ben conservata, mentre le NS sono localizzate nella restante porzione di poliproteina, caratterizzata da una elevata variabilità (Fig.2). Lo studio della regione più conservata ha consentito di classificare il virus in sei differenti genotipi (che differiscono tra loro per il 31-34 % circa della sequenza nucleotidica e per il 30% circa di quella amminoacidica) e in più di 50 sottotipi, di cui i più frequenti risultano essere 1a, 1b, 2a e 2b [18, 39]. La loro distribuzione geografica non risulta omogenea: in particolare i genotipi 1 e 2 sono maggiormente rappresen-

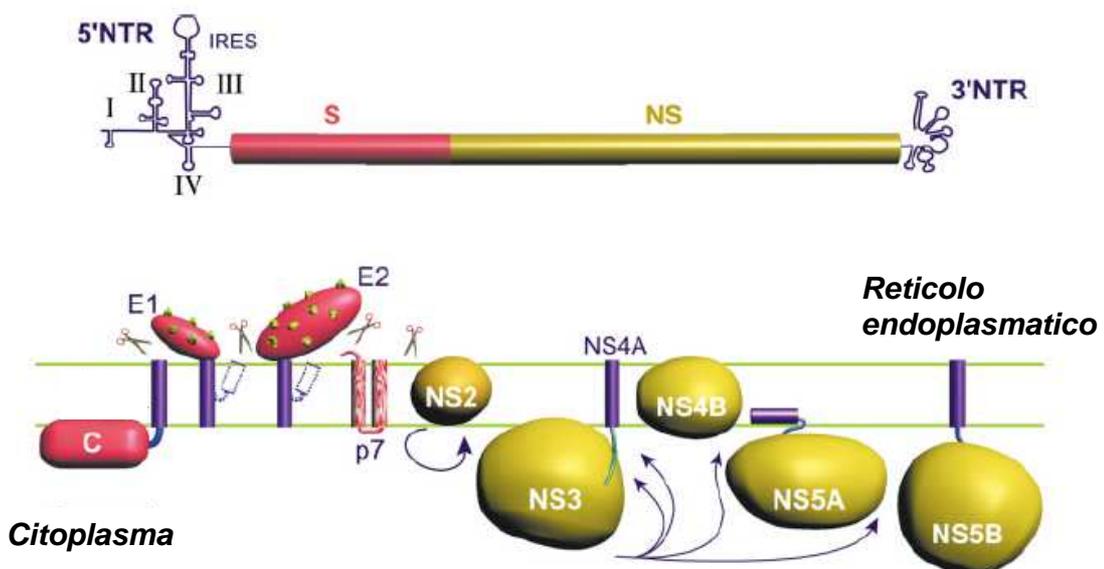


Fig. 2. Organizzazione del genoma dell'HCV (in alto) e processazione della poliproteina (in basso). Tratto da F. Penin et al. J. Hepatology 2004 39: 5-19.

tati in Europa e negli Stati Uniti; il 3 in Estremo Oriente; il 4 in Medio Oriente il 5 in Sud Africa ed il 6 ad Hong Kong. Vi è, inoltre, una differenza nella risposta alla terapia e nella progressione di malattia, infatti i soggetti infettati dal genotipo 1 sembrerebbero rispondere meno alla terapia, oltre ad avere una più rapida progressione di malattia verso un'epatopatia cronica [40].

La regione 5'-UTR

Questa regione, che è costituita da 341 nucleotidi ed è una delle più conservate di tutto il genoma dell' HCV, risultando fondamentale per la sua replicazione, si trova adiacente alla regione codificante per la proteina *core* del virus. Al suo interno, sono infatti contenuti siti di ingresso ribosomiale, detti sequenze IRES, che legandosi alla subunità ribosomiale 40s e al fattore eucariotico di inizio traslazione (eIF3), creano un complesso che dirige la traslazione, legandosi al codone iniziale AUG. Si è visto, infatti, che le sequenze IRES inducono un significativo cambiamento conformazionale nella subunità 40s, dimostrando di essere attivi manipolatori dell' interazione RNA-RNA. Si è inoltre notata una diversa efficienza nel dirigere la traslazione a seconda del genotipo virale e quindi della diversa sequenza nucleotidica di questa regione [41, 42].

La regione 3'-UTR

Questa regione si trova dopo lo stop codon e contiene, in direzione 5'-3', una regione di circa 40 nucleotidi, variabile a seconda dei diversi genotipi, un tratto polipirimidinico ed infine un tratto di 98 nucleotidi, altamente conservato tra i diversi genotipi, che costituisce la parte finale del genoma. Le interazioni specifiche di questo tratto, in particolare della regione conservata, con le proteine cellulari dell'ospite, suggeriscono che esso sia implicato nella replicazione virale e, probabilmente, anche nella sua traslazione, risultando cruciale per l'infezione. Non sembra invece essere importante a questo fine la regione variabile posta subito dopo lo stop codon.

Le proteine virali

Le proteine funzionali dell'HCV derivano da una poliproteina che va incontro a clivaggio co e post trascrizionale, ad opera di proteasi cellulari e virali; queste

sono caratterizzate da un dominio idrofobico all'estremo C-terminale, di fondamentale importanza per l'interazione con le membrane cellulari ed il successivo clivaggio da parte delle peptidasi localizzate nel lume del reticolo endoplasmatico (RE). In particolare, il clivaggio alla giunzione delle proteine NS2 e NS3 è di tipo autoproteolitico, ed avviene ad opera di una proteasi codificata dalla stessa proteina NS2 e dall'estremo N-terminale della proteina NS3, mentre la processazione delle altre proteine non strutturali è mediata da distinte serino proteasi codificate dal virus stesso nella regione N-terminale di NS3.

La regione del core

Durante la traslazione della poliproteina dell'HCV, il polipeptide nascente è posto nel RE per consentire la traslocazione del dominio E₁ attraverso questo, ad opera di una peptidasi cellulare. Questo processo porta alla formazione di una forma immatura della proteina *core*, costituita da 191 aa detta *p21*. Il frammento così ottenuto va quindi incontro a una seconda processazione, in un punto non ben identificato, posto tra gli amminoacidi in posizione 174 e 191 dando origine a una proteina più corta detta *p19*. Il secondo prodotto è quello che si ritrova in maggior quantità nelle cellule e nel siero dei pazienti, facendo ipotizzare che si tratti della forma matura della proteina, ovvero quella che andrà a costituire il capsido virale [43].

Vi è poi una terza forma del *core*, detta *p16*, la cui produzione non richiede la presenza di membrane. Questa sembra essere la forma predominante in assenza della regione E₁, ma la sua funzione non è nota. Tutta la regione del *core* è altamente conservata, mostrando differenze di pochi amminoacidi da un genotipo all'altro [44].

I primi 120 amminoacidi dell'estremo N-terminale della proteina *core*, codificano per un dominio idrofobico, che si suppone contenga alcuni segnali per una traslocazione a livello nucleare della proteina, ed elementi per legare il DNA, anche se non vi sono dati clinici che dimostrino la presenza della proteina *core*

nei nuclei degli epatociti infettati [3]. La maggior parte della proteina *core*, infatti, si ritrova nel citoplasma, a livello del RE e delle goccioline lipidiche.

In particolare, i primi 75 amminoacidi all'estremo N-terminale sono caratterizzati dall'attività di legame con l'RNA con un'elevata omologia di sequenza tra i vari genotipi, suggerendo così un'importante funzione biologica di questa regione. In vitro, infatti, questa regione ha mostrato interazioni con le proteine cellulari e con altri virus, regolando alcune funzioni cellulari, come la transattivazione e la soppressione, facendo pensare ad un suo contributo nella patogenesi.

La porzione C-terminale della proteina, invece, prevalentemente idrofobica, consente l'assunzione di una struttura ad alfa-elica ed è responsabile dell'associazione della proteina *core* con le membrane del RE e con le goccioline lipidiche [45].

Poco si sa sull'assemblaggio del nucleocapside virale, anche se recentemente è stato visto che i primi 75 aa sono sufficienti per legare l'RNA e generare particelle nucleocapside-simili (NLP) in E.coli [46] e in lievito nonostante le dimensioni delle NLP sono irregolari e più grandi dei virioni isolati dai pazienti infetti [47]; inoltre, l'interazione della proteina *core* con le membrane cellulari e/o con le glicoproteine del pericapside, sembrerebbe necessaria per una corretta morfogenesi virale. Altre funzioni della proteina *core* potrebbero riguardare la modulazione della trascrizione genica, la proliferazione e la morte cellulare e i meccanismi di segnalazione cellulare; potrebbe inoltre interferire con il metabolismo lipidico e sopprimere la risposta immunitaria dell'ospite [48]

Le glicoproteine E₁ e E₂

Le glicoproteine E₁ ed E₂ costituiscono le proteine virali del pericapside. Entrambe sono proteine transmembrana, con un dominio extracellulare N-terminale di 160 (E₁) e 334 (E₂) aa, rispettivamente, ed un breve dominio C-terminale, transmembrana, di 30 aa. Sono ritenute fondamentali in diverse fasi del ciclo replicativo virale; vi sono infatti forti evidenze che siano essenziali per l'ingresso del virus nella cellula ospite, attraverso il legame con un recettore

cellulare e l'induzione della fusione con la membrana cellulare. Inoltre, come in altri *Flavivirus*, si pensa che giochino un ruolo fondamentale nell'assemblamento delle particelle virali [49, 50]. Queste diverse capacità sono rese possibili dall'assunzione di diverse conformazioni spaziali in diverse fasi del ciclo cellulare.

Le proteine non strutturali

NS2. La proteina NS2 è clivata dalla poliproteina da una proteasi cellulare, al suo estremo N-terminale, e da una virale, codificata, come già si è detto, dalla maggior parte della stessa regione NS2 e da una parte di NS3. La proteasi virale, zinco dipendente, media un clivaggio autoproteolitico parzialmente dipendente dalla presenza di membrane microsomiali, suggerendo il coinvolgimento di cofattori cellulari in questo evento [51]. La proteina transmembrana ha un profilo idrofobico, con l'estremo C-terminale localizzato nel lume del RE e quello C-terminale nel citoplasma. Non è ancora noto il ruolo specifico di NS2 nella replicazione virale.

NS3. La proteina NS3 codifica attività per serino proteasi, NTPasi, e RNA elicasi. In particolare è stata studiata l'attività serino proteasica, che è fondamentale per la processazione della poliproteina dell'HCV.

Il terzo N-terminale della proteina (in particolare i primi 181aa) codifica per due funzioni indipendenti, in due momenti diversi della processazione: il clivaggio del sito NS2/3, e, in secondo luogo, il clivaggio della restante parte di poliproteina non codificante nelle diverse proteine non strutturali, nei siti NS3/4a, NS4a/4b, NS4b/5a e NS5a/5b. L'analisi di questa porzione ha dimostrato la presenza di 3 residui altamente conservati (His-1083, Asp-1107, Ser-1165), che rappresentano la triade catalitica della famiglia delle serino proteasi; la sostituzione di uno di questi siti comporta la perdita della capacità di processazione della proteina. Inoltre, ogni singolo sito di clivaggio contiene residui conservati sia all'interno dei diversi genotipi, sia tra gli stessi siti [52, 53].

I 22 aa all'estremo N-terminale formano inoltre un complesso stabile con la proteina NS4a, che funge da cofattore nell'attività di NS3 [54].

Il residuo C-terminale di 465 aa, invece, è portatore delle attività NTPasica ed elicastica [55]; queste funzioni sono meno ben caratterizzate dell'attività serino proteasica.

Nella funzione di elicasi è in grado di svolgere sia i doppi filamenti di RNA-RNA, che i doppi frammenti ibridi RNA-DNA utilizzando come substrato energetico dNTP (desossiribonucleotide trifosfato) [56]. È stato visto come l'introduzione di mutazioni in alcuni residui all'interno delle sequenze più conservate comprometta fortemente le funzioni enzimatiche della proteina [57].

NS4. La regione NS4 codifica per due diverse proteine, NS4A e NS4B. La prima è una proteina di 54 aa, con all'estremo N-terminale una regione idrofobica, e , all'estremo C-terminale, una regione idrofila. Come già detto questa proteina funge da cofattore per l'attività proteasica di NS3, attivando quest' ultima; la regione responsabile di questa attività è stata mappata al centro della proteina stessa, in una regione idrofobica, compresa tra gli aa 21 e 34 [58]. Una mutazione all'interno di questa regione è sufficiente a destabilizzare il legame con NS3, diminuendo l'efficienza del processo di replicazione dell'RNA. NS4A, inoltre, forma un complesso con la poliproteina NS4B/NS5A, in cui risulta sempre essere essenziale il dominio idrofobico centrale; questa interazione potrebbe spiegare l'utilizzo di NS4A come cofattore nel clivaggio da parte di NS3 a livello di questo sito.

La funzione della proteina NS4B, è invece sconosciuta. E' una proteina altamente idrofobica, totalmente di membrana necessaria per la fosforilazione di NS5A, insieme a NS4A e NS3 [59].

NS5. La regione NS5 è anch'essa processata in due proteine: NS5A e NS5B.

La funzione primaria di NS5A, fosfoproteina associata alla membrana, è sconosciuta, anche se da studi di comparazione con altri virus, si pensa che giochi un ruolo nella replicazione dell' RNA virale, oltre a modulare,

probabilmente, la risposta alla terapia con interferone α [60]. Altre supposte funzioni di questa proteina includerebbero l'attivazione trascrizionale, un coinvolgimento nella regolazione della crescita cellulare e delle vie di segnalazione cellulare [61]. La proteina NS5B, formante la porzione C-terminale della poliproteina dell'HCV, contiene un motivo GDD (Glicina-Acido Aspartico-Acido Aspartico), comune ad altre RNA polimerasi RNA dipendenti (RdRps), e sembra essere una fosfoproteina associata alle membrane. In particolare quattro motivi di amminoacidi si sono dimostrati essenziali per l'attività polimerasica [62]. Questa proteina, infatti, riconosce specifiche sequenze agli estremi 3' dei filamenti di HCV RNAs positivi e negativi, per l'inizio della sintesi di RNA, costituendo la vera e propria RdRps del virus; in particolare, sembra che la replicazione del genoma dell'HCV comporti la sintesi di un filamento negativo di RNA, iniziata dal legame tra la polimerasi NS5B (o il complesso replicativo) e l'estremo 3' del genoma virale [63].

La morfologia del virione

Il genoma dell'HCV è stato sequenziato molto prima di quanto fosse descritta la particella virale, la cui identificazione da sangue periferico risultava difficoltosa a causa della bassa carica virale circolante, ed alle problematiche incontrate nella coltivazione *in vitro*. Le prime supposizioni riguardo alla morfologia del virione si basavano sulle caratteristiche fisico biochimiche: in base alla sua sensibilità all'inattivazione con cloroformio, era stata ipotizzata la presenza di un pericapside [64]; mentre grazie alle sue capacità di resistenza ai processi di filtrazione, si era stimato che le sue dimensioni fossero tra i 30 e i 60 nm [65]. Il virus fu poi identificato solo grazie alla immuno-microscopia elettronica, che mostrò una particella sferica di circa 50 nm di diametro, che reagiva agli anticorpi specifici contro l'HCV [66].

La replicazione virale

La replicazione del virus avviene nel citoplasma, utilizzando il RE come sito primario di replicazione genomica e di assemblamento virale. Il legame e l'internalizzazione del virione nell'epatocita si suppone avvengano attraverso un'endocitosi recettore mediata, grazie a recettori specifici per le proteine del pericapside virale, in particolare recenti lavori hanno dimostrato l'importanza del CD81 come corecettore essenziale per la penetrazione del virus [67, 68]. Una volta internalizzato e privato del pericapside, il filamento di RNA a polarità positiva, che costituisce il genoma dell'HCV, si lega ai ribosomi e viene tradotto nel RE, nella poliproteina virale [69]. La duplicazione dell'RNA virale avviene nei complessi di replicazione citoplasmatici, associati alle membrane perinucleari, grazie alla sintesi di un filamento di RNA intermedio a polarità negativa, ad opera di una RNA-polimerasi-RNA-dipendente. Questo filamento a polarità negativa serve, quindi, da stampo per la sintesi di nuove molecole di RNA a polarità positiva, identiche al genoma virale. L'HCV RNA di nuova sintesi interagisce quindi con la proteina *core* per formare il nucleocapside, mentre il pericapside si forma attraverso il passaggio all'interno del RE [70]. I virioni così formatosi seguono poi le normali vie secretorie dell'ospite, con la fusione delle vescicole contenenti i virioni, attraverso la membrana plasmatica ed il rilascio delle particelle mature nello spazio extracellulare [4, 71].

Caratteristiche della proteina *core*

Come già accennato in precedenza la proteina *core* dell'HCV sembra essere una proteina con funzioni pleiotropiche, in particolare oltre ad avere un ruolo fondamentale nella fase replicativa del virus, si è dimostrata essenziale nell'influenzare le capacità del virus di interferire con le funzioni della cellula ospite. In particolare diversi studi riportano la sua capacità di modulare l'espressione genica di diversi fattori cellulari.

Numerosi studi hanno dimostrato che la proteina del *core* ha una localizzazione citoplasmatica, in particolare a livello della superficie citoplasmatica del RE, ove

è presente nella forma *p21*, associata alle membrane stesse, e una a livello della superficie delle goccioline lipidiche. Queste contengono esteri di colesterolo e trigliceridi e forniscono, nel fegato, il substrato per la formazione delle LDL. La funzione della proteina *core* sulla loro superficie non è nota, ma si pensa che possa essere rilevante al fine della patogenesi (ad esempio per la statosi) o della replicazione virale. *In vitro* ed in topi transgenici è stata osservata l'espressione di una forma della proteina *core*, detta *p16*, anche a livello nucleare; la sua funzione non è ancora nota, così come non è ancora noto se la sua espressione a questo livello avvenga anche in epatociti umani [72].

Le interazioni e le funzioni di questa proteina sono dunque molteplici e verranno ora considerate più in dettaglio.

Componente strutturale del virus. La funzione primaria della proteina è sicuramente la formazione del capsido virale, anche se si conosce pochissimo riguardo a questo processo.

Interazioni con le altre proteine del core. Proprio per la sua importanza nella formazione del capsido virale, probabilmente, il *core* interagisce con le altre glicoproteine del pericapsido, E_1 ed E_2 ; anche se una vera associazione alla co-precipitazione è stata rilevata in un solo studio [73].

Interazioni con l'RNA. Alcuni studi hanno dimostrato la capacità dell'RNA sintetizzato *in vitro* di legare la proteina, anche se non con un legame specifico per l'HCV-RNA; infatti la proteina contiene un alto numero di residui basici che probabilmente interagiscono con lo scheletro di zuccheri fosforilati dell'RNA. Più recentemente è stato dimostrato che il *core* ha proprietà di forte chaperone per gli acidi nucleici, determinando un riarrangiamento nella regione 3' UTR con conseguente dimerizzazione dell'acido nucleico [74]. È stato inoltre dimostrato il coinvolgimento della regione codificante per il *core* nel modulare la traslazione dei siti IRES, localizzati nella regione 5'-UTR. Sembra infatti che, più che la proteina stessa, sia l'RNA per essa codificante ad essere importante per l'efficienza delle sequenze IRES [75, 76].

Interazione con le proteine cellulari. Come ricordato le proteine cellulari con cui il *core* va ad interagire sono molte, e nella maggior parte degli studi è coinvolta la forma *p21*.

Diversi gruppi hanno riportato una interazione tra la proteina del *core* ed i membri della famiglia dei recettori per i fattori di necrosi tumorale (TNFR), in particolare con il recettore per la linfofosina β [77], il TNF-R1 [78]. Il legame del *core* con i recettori di questa famiglia, potrebbe avere una funzione immunomodulatoria, andando ad inibire l'apoptosi da essi mediata [79, 80].

Il *core* lega inoltre la ribonucleoproteina k (hRNP K), un fattore di trascrizione che modula l'espressione di geni coinvolti nella crescita cellulare, inibendo le funzioni da questo mediate [81]. Vi sono inoltre interazioni con una RNA elicasi [82], anche se il significato non ne è ancora stato compreso, e con proteine coinvolte nella via di segnalazione chinasi, che regolano la crescita epatocitaria [83].

Tutte queste interazioni suggeriscono che il *core* contribuisca ad alterare i normali meccanismi di interazione cellulare, anche se la rilevanza biologica di questi eventi non è ancora chiara.

Funzioni della proteina *core*

I numerosi studi sulle caratteristiche bio-fisiologiche della proteina *core* hanno portato all'accumulo di una grossa mole di dati in letteratura, riportanti risultati discordanti. Questo è sicuramente legato al fatto che tutte le proprietà della proteina *core* sono sempre state studiate in sistemi cellulari, *in vitro*, che non supportano la replicazione virale ed utilizzando sistemi che comportano un'elevata espressione della proteina.

Nella capitolo seguente analizzeremo quindi lo stato attuale delle conoscenze riguardo le funzioni del *core*, tenendo conto del fatto che, a tutt'oggi, uno studio di queste *in vivo* non è possibile.

Ruolo nell'apoptosi. Come si sa l'apoptosi è un evento chiave nella difesa dell'organismo contro le infezioni virali; alcuni virus a loro volta hanno sviluppato sistemi per bloccare la cascata apoptotica e continuare indisturbati la loro propagazione nelle cellule, e a mantenere uno stato d'infezione cronica. Il

meccanismo preciso con cui l'HCV faccia questo non è conosciuto, ma il fatto che la proteina *core* abbia dimostrato di avere un ruolo nella regolazione genica ha portato a numerose indagini in questo senso. Gli studi fin qui condotti, come già ricordato, hanno dato risultati contrastanti: secondo alcuni avrebbe un ruolo nell'inibire l'apoptosi mediata dal cisplatino e da *c-myc* in alcune linee cellulari derivate da cellule tumorali umorali [84]; secondo altri avrebbe un ruolo pro-apoptotico attivando l'espressione di *c-myc* [85]. Interessante è anche l'effetto sul TNF, che in sinergia con l'IFN- γ , ha un'attività antivirale, inducendo l'apoptosi. Questo processo è inibito dalla proteina del *core*. Anche in questo caso, però vi sono studi con risultati discordanti [86]. In un recente studio pubblicato da Ruggeri et al. [87], gli autori hanno dimostrato che la proteina del *core* promuove la proliferazione cellulare e aumenta la fase S del ciclo cellulare in una linea cellulare di epatoblastoma umano non sincronizzata (HepG2), stabilmente trasfettata per questa proteina. Questo effetto viene ottenuto mediante la stabilizzazione di *c-myc*, portando così ad una minor suscettibilità di questa proteina alla degradazione proteolitica.

È inoltre riportata un'interazione con il sistema del Fas recettore-Fas ligando, che è coinvolto sia nella risposta citotossica, sia nella "downregulation" della risposta immunitaria. Il Fas è una proteina di membrana che fa parte della famiglia dei recettori del TNF, ed è un potente induttore dell'apoptosi attraverso il legame con il proprio ligando. Diversi studi hanno dimostrato che l'espressione temporanea della proteina del *core*, da sola od in associazione con altre proteine dell'HCV inibisce l'apoptosi mediata dal Fas nelle cellule HepG2 ed in linee di carcinoma mammario umano (MCF7) [88, 89]. Inoltre, in numerose linee cellulari il *core* promuove l'attivazione di NF- κ B e quindi la sua capacità di inibire l'apoptosi; studi di mutagenesi la rimozione di alcune sequenze all'estremo C-terminale o l'aggiunta di altre all'estremo N-terminale del *core* diminuisce la sua capacità di inibire l'apoptosi e di attivare NF- κ B [90]. A sostegno di questa ipotesi negli epatociti di pazienti con epatite cronica C, sono stati ritrovati elevati livelli della proteina NF- κ B. Inoltre queste cellule si mostravano meno responsive all'azione del TNF- α [79].

Regolazione della crescita cellulare. Spesso i virus oncogeni esplicano la loro funzione andando ad influenzare i geni cellulari; in particolare la proteina *p53* è

spesso bersaglio della loro azione. Questo fatto è di particolare interesse in quanto più della metà dei tumori umani è associata a mutazioni di questa proteina. Anche in questo caso, però, vi sono risultati contrastanti sull'effetto del *core* sulla *p53*. Un recente lavoro pubblicato su *Oncogene* mostra come queste due proteine interagiscano tra loro sia *in vitro* che *in vivo* e come bassi livelli del *core* promuovano l'attivazione di *p53*, mentre alti livelli la inibiscano [91]. L'interazione tra le due avviene tramite la formazione di un complesso specifico attraverso il legame tra gli ultimi 50 aa del frammento N-terminale del *core* e gli ultimi 75 aa del frammento C-terminale di *p53*; questo complesso viene ritrovato nella regione perinucleare e in strutture granulari nucleari. Oltre a questa modulazione tramite un'interazione fisica gli autori propongono altri due meccanismi di regolazione, da un lato un'influenza del *core* sul livello di trascrizione della *p53* e dall'altro una sua influenza sulle modificazioni post-trascrizionali (acetilazioni, fosforilazioni) della proteina stessa.

Oltre agli effetti su *p53*, la sovraespressione del *core* porta ad un'attivazione del sistema di trascrizione RNA polimerasi dipendente, con un aumento dell'efficienza nella proliferazione cellulare che sta anche alla base del processo di trasformazione tumorale [92].

Si è inoltre visto che il *core* promuove, negli epatociti umani primari, lo sviluppo di un fenotipo immortalizzato, che espone le cellule al rischio di eventi trasformanti e per un lasso di tempo maggiore [93]. In modelli animali transgenici [94] la presenza della proteina *core* porta allo sviluppo di steatosi epatica, che sembra essere, in questi animali, il primo passo verso lo sviluppo di HCC. La steatosi rappresenta anche la prima lesione istopatologica che si sviluppa nei pazienti HCV positivi, una parte dei quali sviluppano in seguito HCC. Inoltre, livelli simili a quelli dei topi transgenici della proteina *core* sono stati ritrovati nei fegati di pazienti con epatite cronica C [95].

PARTE SECONDA: FEGATO E RIGENERAZIONE

ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL FEGATO NELL'ADULTO

Il fegato nell'adulto costituisce approssimativamente il 2.5% del peso corporeo; è il 5% al momento della nascita. L'organizzazione del parenchima e del sistema vascolare sono tali da formare una sorta di filtro interposto tra il distretto intestinale ed il resto dell'organismo, costituendo in tal modo il centro del metabolismo di tutti i nutrienti assorbiti nel tubo gastroenterico (aminoacidi, carboidrati, lipidi, vitamine e tossici). Morfologicamente, l'epatocita si presenta come una cellula poliedrica, con un diametro che va dai 13 ai 30 μm . Le diverse strutture presenti a livello di membrana di superficie consentono di identificare tre diversi poli o "dominii", quello vascolare, quello basolaterale (caratterizzato dall'abbondante presenza di microvilli) e quello biliare. Il citoplasma contiene granuli di glicogeno che giungono ad occupare sino alla metà del volume cellulare. E' da segnalare, inoltre, l'abbondante numero e la disposizione dei mitocondri, localizzati in stretta connessione con il reticolo endoplasmatico rugoso, che occupa circa il 7% dello spazio intracellulare. Reticolo endoplasmatico liscio ed apparato di Golgi occupano invece all'incirca il 12% del volume cellulare.

Le principali funzioni epatiche sono quelle di uptake, immagazzinamento, metabolismo, e dismissione nel sangue o nella bile dei nutrienti trasportati dal circolo portale. A queste si aggiunge l'attività di trasformazione di tossici di origine xenobiotica, farmaci e metaboliti endogeni costituisce parte rilevante delle funzioni epatiche. Questi processi coinvolgono tutti i distretti cellulari, verificandosi sia nel citosol, che nel reticolo endoplasmatico che all'interno del nucleo. I sistemi enzimatici maggiormente coinvolti in tali reazioni sono quello delle monoossigenasi, che utilizza l'ossigeno atmosferico per la trasformazione di substrati esogeni ed endogeni, consentendone la successiva metabolizzazione mediante processi quali glicuronazione e sulfatazione, e quello della glutatione-perossidasi o reduttasi, che richiede glutatione (GSH) come substrato e costituisce la principale via metabolica "non ossidativa". Entrambe le vie hanno

la precisa funzione di convertire sostanze liposolubili in idrosolubili, in grado cioè di essere escrete ed eliminate con la bile o le urine.

Come precedentemente accennato, la membrana di superficie degli epatociti presenta diverse caratteristiche strutturali a seconda dell'ambiente con cui essa si trova ad interagire. Si riconoscono infatti tre poli o domini; quello basale, a contatto con il flusso ematico portale; quello biliare, attraverso il quale si verificano la secrezione ed il trasporto della bile; e quello basolaterale. Tale organizzazione consente di:

- ottimizzare le interazioni tra substrati e recettori, che avvengono in una struttura specializzata, lo spazio del Disse;
- compartimentalizzare e mantenere strettamente separate dal circolo sostanze, quali la bilirubina e gli acidi biliari, dotati di azione solvente.

Per minimizzare tale azione solvente, gli epatociti presentano ad ogni lato del canalicolo biliare una serie di giunzioni intercellulari costituite da una triade (giunzione serrata, giunzione intermedia e desmosomi) che assicura l'adesione tra le cellule, la distensibilità del canalicolo e, tramite la giunzione serrata o *zonula occludens*, la sua assoluta impermeabilità alla bile. Macroscopicamente l'architettura del fegato è stata descritta come un'insieme di lobuli, parallelepipedi a base esagonale, con al centro la vena epatica ed in periferia, in ciascuno degli angoli dell'esagono considerato, gli spazi portali costituiti dalla classica triade; ramo dell'arteria epatica, ramo della vena porta ed infine via biliare di piccolo calibro, circondati dall'estroflessione della capsula del Glisson e da scarso tessuto connettivo. Il fegato può altresì essere considerato come costituito da unità funzionali o acini [96], incentrati sulle triadi portali con una suddivisione degli epatociti circostanti in zone, numerate progressivamente da 1 a 3 via via che ci si allontana dallo spazio portale per avvicinarsi alle centrolobulari.

Benché la funzione, la struttura e la morfologia stessa degli epatociti dipendano dalla specifica posizione occupata nell'ambito dell'organizzazione lobulare del parenchima, ogni epatocita possiede piene potenzialità funzionali; la differenziazione delle cellule sarebbe pertanto il prodotto di modificazioni

indotte dalla microcircolazione epatica. Gli epatociti migrano lentamente dalla zona 1, sede nella quale si verifica la divisione cellulare, alla zona 3: tale lento spostamento richiede l'intera vita dell'epatocita che corrisponde a circa 1/3 della vita dell'intero organismo.

La restante popolazione cellulare presente nel fegato è rappresentata dalle cellule biliari, dalle cellule endoteliali, dalle cellule di Kupffer e dalle cellule di Ito. Come precedentemente ricordato la bile viene secreta dagli epatociti nello spazio canalicolare; i canalicoli biliari si continuano nei duttuli, detti colangioli o spazi di Hering, presenti a livello degli spazi portalì. Questi affluiscono nei dotti biliari interlobulari (30-40 μm di diametro), che rappresentano i primi canali biliari ad essere accompagnati nel decorso da diramazioni dell'arteria epatica e della vena porta. I dotti interlobulari a loro volta confluiscono a formare i dotti biliari settali fino al punto di emergenza dei dotti epatici principali del lobo destro e sinistro del fegato. Le cellule che formano i canali di Hering si presentano fusiformi, strettamente unite tra loro da complessi giunzionali e disposte in stretta associazione con gli epatociti circostanti. Tutte le strutture biliari, da questo livello in poi, sono dotate di una lamina basale. I dotti interlobulari presentano un epitelio monostratificato cuboidale o colonnare che presenta microvilli sulla superficie luminale. Le cellule presentano un apparato di Golgi molto sviluppato e numerose vescicole intracitoplasmatiche, che si ipotizza trasportino sostanze sia in direzione del lume che verso la superficie basale, a contatto con il sangue e la linfa. Le cellule endoteliali formano la parete continua del lume sinusoidale; presentano finestre, del diametro di 0.1 μm , che consentono lo scambio dei fluidi e filtrano le particelle in grado di essere scambiate, nello spazio di Disse, con gli epatociti. Le cellule di Ito, anche chiamate cellule stellate per la loro classica morfologia, sono localizzate nello spazio di Disse: fungono da deposito di grasso, vitamina A e retinoidi ed assumono un aspetto simile a fibroblasti quando vuote. In caso di danno epatocitario migrano verso la zona 3 dove si trasformano in miofibroblasti e secernono collagene tipo I, III, e IV e laminina. Le cellule di Kupffer sono macrofagi ad elevata mobilità che derivano dai monociti del sangue e sono

dotati di scarsa capacità replicativa. Sono adese alle cellule endoteliali e fagocitano detriti cellulari, particelle esogene, cellule tumorali, batteri parassiti e virus. Si attivano in occasione di infezioni generalizzate e traumi; fagocitano endotossine ed in risposta secernono una serie di fattori tra cui il tumor necrosis factor (TNF), le interleuchine e la collagenasi.

Funzionalmente il fegato costituisce la centrale metabolica dell'organismo benché esistano solo poche vie metaboliche che si possono considerare specifiche degli epatociti. Tra queste si segnalano: 1) il ciclo dell'urea; 2) vie regolatrici del metabolismo lipidico; 3) vie di sintesi degli acidi biliari e di catabolismo della bilirubina.

Vi sono alcune funzioni del fegato che, presenti durante la vita fetale, vengono perse al momento della nascita ma possono riapparire nel corso della vita adulta; una di queste è la funzione emopoietica. La produzione di emazie nel midollo osseo è regolata infatti da un fattore di crescita, l'eritropoietina, che nell'adulto viene prevalentemente sintetizzata a livello renale. Nel feto invece il sito principale di produzione dell'eritropoietina è il fegato. In situazioni peculiari, la produzione epatica di eritropoietina può riprendere, anche se di solito non è vicariante rispetto a quella renale [97, 98]. Mediante un modello sperimentale che utilizzava ratti resi anefrici è stato dimostrato come il netto incremento dei valori plasmatici di eritropoietina, riscontrato dopo epatectomia parziale, fosse da attribuire alla sintesi epatica di tale molecola. Lo stesso fenomeno è stato osservato anche in conseguenza di un danno epatico chimicamente indotto (tetracloruro di carbonio). La rigenerazione epatica e le condizioni di crescita cellulare incontrollata, quali l'epatocarcinoma, sono entrambe associate al riscontro di aumentati valori plasmatici di eritropoietina. Studi condotti in vitro su linee epatocellulari tumorali, quali le Hep-G2, o su epatociti fetali, entrambe in condizione di attiva replica, hanno dimostrato come la produzione di Mrna e proteina attiva siano regolati dalle concentrazioni di ossigeno. A conferma di ciò, il nostro gruppo ha dimostrato in un recente lavoro come in corso di chemioembolizzazione epatica si verifici un significativo incremento delle concentrazioni plasmatiche di eritropoietina [99]. L'aumentato rilascio di tale

molecola non sarebbe da considerare un mero fenomeno paraneoplastico ma una risposta epatocitaria all'ipossia indotta nel fegato.

Anche la produzione di alfa-fetoproteina (AFP) è caratteristica della vita fetale e neonatale: la concentrazione ematica di tale molecola decresce nelle prime ore dopo la nascita e raggiunge le concentrazioni proprie del soggetto adulto entro il primo anno di età. La funzione precisa di tale proteina onco-fetale è tuttora incerta: tuttavia nella vita adulta, essa si associa a condizioni di rapida crescita epatocellulare, quali la rigenerazione dopo epatectomia ed il carcinoma primitivo del fegato. Il 45% degli epatocarcinomi di piccole dimensioni presentano valori plasmatici di alfa-fetoproteina superiori ai 400 ng/ml.

Tra le funzioni epatiche di rilevante interesse clinico vi è quella emostatica. Il fegato infatti ha un ruolo primario nella sintesi di fattori della coagulazione e di proteine regolatrici: esso svolge tuttavia un ruolo chiave anche nell'inattivazione di numerosi fattori coinvolti nella cascata coagulativa e fibrinolitica. Il fattore II, V, VII, VIII, IX, e molecole dotate di azione inibente quali la proteina C, S e l'antitrombina III (ATIII), sono tutti sintetizzati a livello epatico. Ciò rende ragione della complessa serie di disturbi coagulativi, sia in senso emorragico che protrombotico, che caratterizzano il quadro dell'insufficienza epatica.

Va infine menzionato il ruolo che il fegato svolge, attraverso la sintesi dell'albumina, nel mantenimento del volume plasmatico efficace. Tale proteina è infatti responsabile della maggior parte del potere oncotico esercitato, in condizioni di normalità, dal plasma nei confronti degli spazi interstiziali. Essa risulta pertanto cruciale nel mantenimento di un'adeguata condizione di espansione del volume plasmatico, di una efficace perfusione renale e di un corretto riassorbimento di elettroliti a livello dei tubuli renali.

MODELLO DI RIGENERAZIONE E CITOCHINE

Sin dall'antichità è stata riconosciuta al fegato la peculiarità di essere un organo in grado di rigenerare il proprio parenchima dopo un danno, come testimoniato dal mito greco di Prometeo, il gigante che donò il fuoco al genere umano. Come punizione per quest'atto Zeus lo condannò infatti a aver divorato ogni giorno,

da un'aquila, il proprio fegato, che tuttavia si rigenerava nel corso di ogni notte fornendo all'aquila eterno nutrimento ed a Prometeo eterno supplizio. La straordinaria capacità del fegato a rigenerare ha fatto ipotizzare l'esistenza di una cellula progenitrice (stem cell), sebbene tuttora sostenuta da alcuni autori [100], non ha tuttavia trovato chiare verifiche sperimentali. Recentemente, i meccanismi che presiedono e controllano la rigenerazione epatica sono stati estesamente indagati e parzialmente chiariti grazie allo sviluppo di modelli sperimentali animali. Tra questi l'induzione di un' insufficienza epatica acuta mediante epatectomia parziale (PHx, 70% del parenchima) ha fornito le maggiori informazioni circa gli eventi e la cascata di reazioni che precedono e stimolano la rigenerazione.

La rigenerazione ha sempre inizio nella zona 1 o regione periportale e procede verso la zona 2 o centrolobulare in 36-48 ore. La restante popolazione cellulare epatica (fibroblasti, cellule endoteliali etc.) inizia la sintesi di DNA solo a distanza di circa 24 ore dall'inizio della replicazione epatocitaria, a suggerire un ruolo diretto degli epatociti nel pilotare, tramite la produzione di fattori di crescita, la proliferazione degli altri tipi cellulari. Gli eventi molecolari più precoci dopo PHx interessano la membrana cellulare che, dopo soli 5 minuti, presenta un'incremento del numero di recettori per l'urokinasi ed un incremento dell'attività di tale enzima. Nei primi 30 minuti dopo l'intervento si verifica inoltre l'espressione di numerosi geni chiamati „immediate early genes” quali la proteina legante insulin-like growth factors I (IGF1-BP), il signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), lo active nuclear factor kappa B (NF-Kb), enhanced binding protein- α e β (Cebp α e Cebp β), hepatic associated transcription factors come hepatic nuclear factor 1, 4 e 3 (HNF1, HNF4, HNF3), tutti implicati nel meccanismo della replicazione. L'espressione di „markers fetali” quali α FP ed isoenzimi fetali di aldolasi e piruvato-kinasi riappare in corso di rigenerazione, per annullarsi nuovamente ad una settimana circa dalla resezione. Citochine, fattori di crescita, ormoni svolgono anch'essi un ruolo chiave fin dalle prime ore del post intervento; hepatocyte growth factor (HGF), (TNF), interleuchina-6 (IL6), epidermal growth factor (EGF) e tumor growth

factor a (TGFa), insulina e norepinefrina sono solo alcuni dei fattori che regolano, con successione cronologica precisa, la proliferazione e la differenziazione cellulare.

COLTURE EPATOCITARIE

Notizie storiche

La storia della coltura cellulare ebbe inizio nei primi anni del XX secolo, quando Ross Harrison dimostrò che fibre nervose di embrione di rana, cresciute in linfa coagulata, sono in grado di generare delle propaggini cellulari, suggerendo con tale lavoro nuove ipotesi sull'origine e la natura dell'assone. Le considerazioni che guidarono la scelta di tale sistema sperimentale furono la dimostrata possibilità di mantenere vitali, a temperatura ambiente, i tessuti di animali a sangue freddo e la cognizione che la rigenerazione dei tessuti è un evento più frequente nei vertebrati inferiori. Nel 1913 per la prima volta A. Carrel fu in grado di coltivare cellule di tessuto connettivo e dimostrò che cellule isolate da cuore di embrione di pollo possono svilupparsi per lungo tempo in coltura, mantenendo la propria contrattilità. Precedentemente, era stata dimostrata la possibilità di congelare cellule di mammifero in azoto liquido preservandole vitali per lungo tempo: questa tecnologia si dimostrò di particolare importanza nel 1940 quando Earle e collaboratori svilupparono la prima linea cellulare mantenuta in crescita continua. Bisognava tuttavia attendere sino al 1952 per vedere realizzata, da G. Gey e collaboratori, la prima linea cellulare umana, denominata "cellule HeLa", originata da carcinoma della cervice uterina. Fu a partire dai primi anni '70 che si verificarono i maggiori progressi nel campo della coltura cellulare, con l'identificazione delle condizioni necessarie per la coltura di diversi tipi di tessuti; vennero così elaborati terreni chimicamente definiti, specifici per la crescita dei diversi tipi cellulari. Gordon Sato e collaboratori analizzarono, in una serie di pubblicazioni, le necessità dei diversi tipi di cellule per quanto concerne fattori di crescita, glicoproteine ad alto peso molecolare ed

ormoni: la composizione del terreno „supplementato“ che Bottenstein e Sato svilupparono per la coltura delle cellule nervose costituisce a tutt'oggi la base dei terreni „serum-free“ utilizzati per la coltura della maggior parte dei tipi cellulari. Nel corso dell'ultimo decennio la coltura tissutale è divenuta, oltre che un campo di ricerca in continua espansione, una tecnologia ormai di uso comune in diverse branche della biologia e della biotecnologia.

Modelli in vitro attualmente disponibili

Nell'ultimo decennio vi è stato un notevole incremento del numero delle pubblicazioni inerenti lo sviluppo di sistemi di coltura epatocitari. Numerosi sono infatti i vantaggi che tale sistema sperimentale è in grado di offrire, almeno da un punto di vista teorico: in primo luogo il risparmio del sacrificio di animali di laboratorio, elemento di attualità e dibattuto sia in ambito scientifico che, più in generale, nell'opinione pubblica. Anche se si superassero le considerazioni etiche, il ricorso alla sola sperimentazione animale comunque non annullerebbe i rischi derivanti dalle differenze metaboliche presenti nelle diverse specie: i ratti, per esempio, sono un modello inattendibile per quanto concerne il metabolismo di fase I nell'uomo. Ciò comporta, ad esempio, che solo dopo l'introduzione di un farmaco nell'uso clinico è possibile avere piena conoscenza sulla sua reale epatotossicità. Essendo il metabolismo dei farmaci una delle principali funzioni del fegato, un attendibile sistema sperimentale *in vitro* consentirebbe di verificare la tossicità di molecole di nuova sintesi.

Il modello sperimentale ideale sarebbe quello che ricrei perfettamente l'organizzazione tridimensionale del parenchima epatico, preservi la totalità delle funzioni metaboliche, consenta la raccolta e l'analisi della bile, e mantenga le cellule polarizzate e vitali per lungo tempo. Per tale motivo in passato si è tentato il ricorso a sistemi sperimentali quali il fegato isolato perfuso e, più recentemente, alle sezioni tissutali. Il primo modello presenta il vantaggio di essere assimilabile alla situazione presente in vivo; la struttura tridimensionale è preservata, la struttura biliare è presente e strutturalmente integra, è possibile la raccolta di bile. Le limitazioni che tale modello presenta sono legate alla

difficoltà nel reperimento di organi umani da destinare a tale utilizzo, nella difficoltà di messa appunto del sistema stesso, nella brevità del mantenimento dell'integrità funzionale e nell'impossibilità di studiare più composti nello stesso sistema sperimentale. Le sezioni tessutali prevedono la preservazione di una struttura lobulare, ma, pur richiedendo modeste quantità di tessuto umano (l'equivalente di un frustolo da biopsia epatica percutanea), hanno una sopravvivenza limitata (meno di dieci ore) e non consentono lo studio e l'analisi della bile.

I modelli sperimentali alternativi rispetto a quelli sopra elencati hanno tutti la caratteristica di presentare le cellule in monostrato, con la perdita quindi delle interazioni presenti in vivo nella struttura tridimensionale. Un vantaggio offerto da queste colture è tuttavia la loro estrema semplicità: si tratta abitualmente di modelli costituiti da un unico tipo di cellula, funzionalmente integra, vitale ma posizionata al di fuori dell'organismo. Questo implica la possibilità di indagare le funzioni cellulari più fini, le diverse interazioni molecolari ed attività enzimatiche estraniandole da un contesto generale nel quale alcune informazioni potrebbero essere mascherate o minimizzate dalla presenza di inibitori oppure dall'effetto del metabolismo sistemico. Essendo il sistema così semplice, esso risulta inoltre facilmente modulabile, il che consente di creare condizioni di coltura adattabili alle necessità della sperimentazione.

Il modello in vitro oggi più largamente utilizzato è rappresentato dalla coltura primaria di epatociti [101]. Con tale termine si usano indicare colture di cellule originate direttamente dall'organismo, che non sono andate necessariamente incontro a replicazione in vitro. Le colture primarie offrono il vantaggio della semplicità di preparazione e dalla possibilità di mantenere, fino a circa 72 ore dal loro isolamento, caratteristiche di polarizzazione e differenziazione. Il loro principale svantaggio consiste però proprio nel limitato arco di tempo nel quale la sperimentazione può essere condotta in condizioni di omogeneità del sistema sperimentale .

Nonostante la nota capacità rigenerativa del fegato, solo nel 1981 si giunse allo sviluppo della prima linea cellulare umana, le Hep-G2, ottenute da fegato

neoplastico: la disponibilità di tale linea portò ad un notevole sviluppo degli studi inerenti gran parte delle funzioni epatocitarie [102]. Tuttavia più le ricerche progredivano, più diveniva evidente che le Hep-G2, in quanto cellule neoplastiche, si distaccavano dalla normalità, risultando prive di alcune fondamentali funzioni presenti in vivo e di alcuni aspetti di differenziazione indispensabili per l'interazione con molecole o virus. Pertanto la necessità di un sistema colturale "normale" divenne sempre più urgente e si tentò di rimediare alla difficoltà di indurre la replicazione di epatociti posti in coltura primaria inserendo stimoli mitogeni nel sistema di coltura o all'interno delle cellule stesse. Utilizzando metodiche quali la cocoltura con cellule epiteliali di ratto [103] ed il ricorso alla transfezione con oncogeni virali o con geni di origine virale (Simian virus 40 large tumor antigen gene) [104], fu possibile ottenere la crescita e "l'immortalizzazione" di tali cellule in coltura, senza tuttavia consentire il mantenimento, in vitro, di tutti gli aspetti di differenziazione. Negli ultimi anni, infine, è stato pubblicato il primo lavoro relativo allo sviluppo di una coltura epatocellulare umana normale [105]: tali epatociti venivano descritti come in grado di mantenere, dopo più di un anno di coltura continua, la morfologia e le funzioni proprie degli epatociti differenziati. Tuttavia, a rigore, le cellule non potevano essere definite normali, in quanto l'esame del cariotipo aveva rivelato numerose anomalie quali poliploidia e delezioni significative nella struttura cromosomica [106, 107]. I nuovi sviluppi nel campo della coltura cellulare si intrecciano sempre più strettamente ai progressi nel campo tecnologico [108-113]: sono state infatti recentemente messe a punto tecnologie, mediate dall'esperienza aerospaziale americana, che consentono di ricreare condizioni di gravità ed interazione cellule-matrice extracellulare tali da consentire la crescita tridimensionale in vitro. Questa nuova metodica, che utilizza bioreattori microgravitari, annulla l'effetto che la gravità esercita sulle cellule al momento del piastramento. Le cellule in sospensione vengono poste, insieme ai componenti della matrice, in un cilindro connesso ad un sistema di ossigenazione ed a contatto con il terreno di crescita. La rotazione applicata sul cilindro è tale da annullare gli effetti dati dalla viscosità sulla velocità di flusso,

rendendo la soluzione un tutt'uno che ruota a velocità costante, mantenendo interazioni costanti con le cellule o la matrice circostante. In tal modo è possibile ricostruire all'interno di tali bioreattori delle strutture tridimensionali che si mantengono vitali per lungo tempo in coltura. Pur essendo impossibile ricreare le struttura biliare e vascolare, questa tecnica di coltura consentirebbe di ottenere un'organizzazione tridimensionale del parenchima con probabile piena espressione e compartimentalizzazione delle diverse funzioni secretorie [114, 115].

PARTE TERZA: CENNI SUI VETTORI LENTIVIRALI

Una tecnologia innovativa per trasferire proteine di interesse in cellule bersaglio è costituito dai vettori lentivirali, messi a punto dalla Prof. A. Follenzi, del Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale [116].

Si tratta di particelle ibride virali derivate da un lentivirus (HIV-1) e dal pericapside di un virus differente (molto spesso VSV.G, *vescicular stomatitis virus*) [117-119]. Questi vettori possono permettere inoltre studi di espressione in modelli animali. I vettori lentivirali sono in grado di trasdurre stabilmente sia cellule quiescenti che totalmente differenziate. In particolare sono stati ottenuti elevati livelli di bio-sicurezza con la produzione dei vettori lentivirali di ultima generazione, che sono auto-inattivanti (poiché sono dotati di un alto livello di segregazione delle sequenze del virus, sono privi dei geni responsabili della patogenicità e sono mancanti della regione del genoma contenente il promotore e l'enhancer virali).

I vettori lentivirali vengono prodotti nelle cellule HEK-293 con il metodo del calcio-fosfato, mediante co-trasfezione del costrutto di trasferimento e dei tre costrutti "packaging" che sono il costrutto che contiene le proteine strutturali e gli enzimi integrasi e trascrittasi inversa, il costrutto Rev codificante per la proteina Rev ed il costrutto per il pericapside codificante per la proteina VSV.G.

Le particelle di vettore, contenute nel mezzo di coltura, sono poi concentrate tramite ultracentrifugazione e poi utilizzate per la trasduzione delle cellule bersaglio.

Sinteticamente, la costruzione del plasmide lentivirale prevede la digestione con opportuni enzimi di restrizione della sequenza di interesse e del costrutto di trasferimento; in seguito viene eseguita una reazione ligasica. Per verificare che la ligasi sia riuscita, il plasmide lentivirale/inserto viene digerito con adeguati enzimi di restrizione, una volta determinata l'identità del plasmide è necessaria una trasfezione transiente in cellule HEK-293 per verificare la sintesi della proteina; la sintesi proteica viene saggiata tramite immunoprecipitazione e Western Blot. Una volta verificata l'espressione della proteina di interesse si producono le particelle virali le quali saranno utilizzate per trasdurre la cellule bersaglio.

SCOPI DEL LAVORO

In sintesi, gli scopi di questo progetto di dottorato sono stati fondamentalmente due:

1) caratterizzazione delle diverse modalità di espressione della proteina core dell'HCV in linee cellulari immortalizzate

Come detto nella parte introduttiva, la proteina del *core* interferisce con numerose funzioni cellulari e con l'espressione di molteplici geni, ma le ripercussioni di queste interazioni sulla storia naturale dell'infezione non sono del tutto chiarite. Inoltre il tipo di interazioni e le proteine cellulari coinvolte non sono accettate in maniera univoca. In particolare, vista la correlazione tra infezione da HCV ed HCC, sono a tutt'oggi in atto numerosi studi in ambito internazionale atti a chiarire i meccanismi con cui il virus porta allo sviluppo di neoplasia. Fino ad oggi, l'ipotesi più accreditata prevede un meccanismo carcinogenetico indiretto, attraverso lo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico. Una possibile alternativa, però, è che l'infezione da virus C possa favorire in modo diretto la trasformazione neoplastica, in particolare grazie alla proteina del core traslocata nel nucleo, come suggerito da alcuni studi su topi transgenici.

Le fasi sono state:

- clonaggio della proteina del core;
- studio dell'espressione e della localizzazione cellulare della proteina del core in diverse linee cellulari: COS-7 (derivata da rene di scimmia), HEK-293 (derivata da rene umano), Hep-G2 e Huh7 (derivate da epatomi umani);
- studio di eventuali differenze nell'espressione della proteina in funzione dello splicing cellulare

2) Sviluppo e caratterizzazione di una sistema epatocitario normale

Per meglio definire il possibile ruolo della proteina core nello sviluppo di epatocarcinoma (obiettivo finale degli studi che abbiamo in corso), abbiamo quindi provato a mettere a punto di un sistema di epatociti normali in coltura,

nel tentativo di sviluppare condizioni il più possibile simili a quelle fisiologiche; tale sistema, se si rivelerà funzionale, sarà successivamente trasfettato mediante vettori virali ricombinanti contenenti il core.

In sintesi gli obiettivi che ci siamo proposti sono:

- definizione delle condizioni di coltura che possono consentire lo sviluppo di un sistema epatocellulare, in grado di mantenere le caratteristiche morfologiche e funzionali proprie degli epatociti differenziati;
- caratterizzazione di tale sistema in termini di integrità genomica e di modulazione della crescita in specifiche condizioni sperimentali.

MATERIALI E METODI

ESPRESSIONE DELLA PROTEINA CORE

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';
antisenso: core918m 5'-CGG **AAT TCT**TAG GCT GAA GCG GGC ACA GTC-3';
antisenso: 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'eluato 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 Mini-preparazione 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'inserto, 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'emoagglutina 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 pDNR ed il plasmide p102 sono stati sottoposti a digestione con gli enzimi EcoR I e Sal I.

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.

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 5 μ l 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 per verificare il mantenimento del "frame" tra la sequenza codificante per la HA-Flag e quella codificante per la proteina del core.

5. Subclonaggio della sequenza del *core* e di E1.

La sequenza codificante per le proteine del core e dell'envelope è stata ottenuta tramite digestione del plasmide pBRT703'X, gentilmente fornito dal Prof. Suzuki Tesuro (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo Giappone). Il plasmide di 13938 pb contiene l'intero genoma del virus HCV 1b, clone NIHJ1 (GeneBank: D_89815), inserito in corrispondenza del sito Hind III del plasmide pBR322. Il cDNA virale è di 9548 pb; la poliproteina è codificata a partire dal sito di taglio Stu I.

Il plasmide è stato sottoposto a digestione con gli enzimi Stu I ed Xho I. Dal pattern di restrizione dei frammenti prodotti è stata recuperata la banda di 2003 bp, contenente il core, E1 e parte di E2; il DNA ottenuto dal frammento è stato in parte subclonato nel plasmide pDNR precedentemente digerito con gli enzimi Sma I e Xho I, ed in parte ulteriormente digerito con l'enzima Bam HI (ottendendo un frammento di 1059 pb) ed in seguito subclonato nel plasmide pDNR precedentemente digerito con gli enzimi Sma I e Bam HI.

6. Espressione in cellule eucariote

6.1 *Linee cellulari*

Per gli esperimenti di espressione transiente sono state scelte dapprima la linea cellulare COS-7 (ATCC CRL-1651), originata da cellule di rene di scimmia, trasformata con il virus SV-40 e la linea HepG2 (ATCC HB-8065), originata da un epatoma di origine umana. Gli esperimenti sono stati poi proseguiti sulle linee cellulari HEK-293, originata da cellule embrionali umane di rene, e Huh7, derivata da epatoma umano.

Tutte le linee sono state coltivate terreno di coltura DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium) addizionato di glutamina, penicillina, streptomina e siero bovino fetale. Le Huh7 sono state addizionate anche di aminoacidi non essenziali. Per la propagazione delle cellule, i monostrati cellulari sono stati disaggregati tramite digestione con una soluzione di tripsina per 5-10 min e quindi divise in nuove fiasche. Le linee cellulari sono state incubate a 37° C in presenza del 5% di CO₂.

6.2 Trasfezione

Cellule COS-7 e HepG2 sono state inoculate ad una concentrazione di 6×10^4 cellule per pozzetto in appositi sistemi a 4 pozzetti a fondo di vetro (chamber-slides), o di 3×10^5 cellule per pozzetto in piastre a 6 pozzetti, in modo da ottenere il 60-80 % di confluenza a 24 ore.

Per ogni campione, nella chamber-slide, 1 μg di DNA è stato diluito in 50 μl di DMEM. Separatamente, per ogni campione, 2 μl di Transfectin Reagent (Biorad) sono stati diluiti in ulteriori 50 μl di DMEM; le due soluzioni sono state quindi miscelate. I complessi DNA-Transfectin sono stati quindi aggiunti direttamente alle cellule, e dopo una gentile agitazione, queste ultime sono state incubate a 37° C per ulteriori 48 ore, prima della verifica dell'espressione della proteina. A 16-18 ore dalla trasfezione si controllava lo stato delle cellule, ed in caso fosse presente un effetto tossico si procedeva alla rimozione del mezzo di coltura contenente il DNA, ed all'aggiunta di terreno di crescita fresco.

7. Immunofluorescenza indiretta

7.1 Fissaggio e permeabilizzazione delle cellule

Per l'immunofluorescenza indiretta, dopo 48-72 ore, le cellule cresciute in chamber-slides e trasfettate sono state fissate con paraformaldeide al 2% per 15 min. Dopo lavaggio, sono state permeabilizzate con saponina per 15 min. Allo scadere, i siti immunoreattivi aspecifici sono stati saturati con siero albumina.

7.2 Immunoreazione

Le cellule sono state incubate un'ora a 37° C in camera umida con gli anticorpi specifici. Si è utilizzato un anticorpo core specifico MA1-080 (10 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$; Affinity BioReagents) o l'anticorpo monoclonale contro l'HA (1:50; Roche) per l'identificazione della proteina ricombinante. L'immunoreazione è stata rivelata tramite IgG anti-topo coniugate con FITC (isotiocianato di fluoresceina), con incubazione di un'ora a 37°C. Infine, i vetrini sono stati osservati con microscopio Olympus a fluorescenza e fotografati con camera digitale.

8. Western-blot

8.1 *Lisi cellulare*

Per la preparazione dei lisati, dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate su ghiaccio con la soluzione di lisi. Le cellule sono state poi distrutte facendole passare 8-10 volte attraverso un ago di 0,6 mm di diametro; la sospensione è quindi stata centrifugata a 3.500 rpm per allontanare i nuclei ed il surnatante utilizzato per l'analisi elettroforetica.

8.2 *Elettroforesi delle proteine*

Come gel di separazione è stato scelto un gel di poliacrilamide (PAA) al 15%; il gel d'impacchettamento è stato di PAA 4 %. A polimerizzazione avvenuta, i campioni sono stati diluiti 1:1 con la miscela di lisi secondo Laemmli, incubati a 95°C per 10 min, e quindi caricati su gel. L'elettroforesi è stata effettuata per un'ora a 140 V nel tampone di migrazione di Laemmli 1x.

8.3 *Trasferimento delle proteine*

Al termine dell'elettroforesi le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa. La membrana ed il gel sono stati pre-incubati nel tampone di trasferimento per 5 minuti, ed il trasferimento è stato effettuato per 60 minuti a 100 V nel tampone di trasferimento.

8.4 *Immunoreazione*

Al termine del trasferimento la membrana è stata colorata con Rosso Ponceau. La membrana è stata poi incubata in latte magro al 3% durante la notte, per saturare i siti aspecifici. Successivamente si è proceduto all'incubazione con gli anticorpi specifici diluiti in latte magro al 3% per un'ora, a temperatura ambiente in agitazione (anti-core 1 µg/ml o anti-HA 1:1000). Al termine dell'incubazione la membrana è stata lavata e, quindi, incubata con gli anticorpi anti-topo coniugati con perossidasi (1:1000, DakoCytomation). La reazione è stata protratta a temperatura ambiente per un'ora. La reazione è stata infine visualizzata in luminescenza utilizzando l'ECLTM Western blotting detection reagent (Amersham Bioscience) ed esposta su lastra autoradiografica per 3-30 min.

SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI UNA LINEA EPATOCITARIA NORMALE

In parallelo ai suddetti esperimenti sulla localizzazione del core in linee cellulari trasformate, intendiamo cimentare anche un sistema epatocitario umano normale, per valutare quali siano gli effetti diretti della proteina core su queste cellule. Un simile sistema cellulare è stato messo a punto dal gruppo del Prof. Francesco Curcio (Cattedra di Patologia Molecolare, Università degli Studi di Udine) in collaborazione con il nostro laboratorio.

1. Terreno di coltura

Il mezzo di coltura utilizzato per stimolare la crescita epatocitaria è stato denominato HCM (Hepatocyte Culture Medium) ed è costituito da un terreno base (Ham F12, Coon's modifications, GIBCO), commercialmente disponibile, nella cui composizione sono presenti tutti gli aminoacidi, sali minerali (calcio, rame, ferro, potassio, magnesio, zinco), vitamine, composti organici ed inorganici di diversa natura . A tale terreno-base vengono aggiunti alcuni elettroliti (sali di calcio, magnesio, bicarbonato di sodio e glucosio) ed alcuni componenti specifici per la crescita di epatociti, tra cui:

- Siero bovino fetale (Gibco, N.Y., USA)
- Insulina (Elanco, Indianapolis, Indiana), Transferrina (Sigma), Idrocortisone (Sigma), Glicil-Istidil-Lisina (Sigma) e Somatostatina (Sigma), un gruppo di sostanze denominato 5H
- Estratti di ipotalamo ed ipofisi (tessuti forniti dalla Pel Freez Biologicals, Rogers, Arkansas) preparati come descritto in precedenza ()
- Triiodotironina (Sigma)
- Rosso fenolo (Sigma)
- Streptomina (Gibco)
- Penicillina (Gibco)
- L-ornitina (1-2.5 Diaminopentanoic acid) (Sigma)

2. Terreno di differenziamento

Un diverso tipo di terreno è stato messo a punto al fine di ottenere la sopravvivenza a lungo termine delle cellule in coltura ma nel contempo un arresto della crescita cellulare. Il risultato atteso dal suo utilizzo era una maggiore differenziazione cellulare, con aumento dell'espressione di recettori di superficie, attivazione di vie metaboliche mantenute silenziose nel corso della replicazione, aumento delle granulazioni di glicogeno intracitoplasmatiche e quindi maggiore disponibilità di substrati per reazioni enzimatiche di ogni ordine.

Le modificazioni introdotte in tale terreno erano da un lato la sua semplificazione, ottenuta rimuovendo gli estratti di ipotalamo ed ipofisi ed il siero bovino e riducendo le concentrazioni ormonali, e dall'altro la modificazione delle concentrazioni di ioni, soprattutto Calcio e Magnesio, e di glucosio. Tale medium modificato è stato denominato HCM MOD.

3. Soluzioni utilizzate nelle diverse fasi della coltura

MOSH. Il MOSH o "Calcium and Magnesium free Hank's balance salt solution" rappresenta una soluzione tamponata estesamente utilizzata in tutte le operazioni che richiedano il risciacquo delle cellule o il loro mantenimento, per brevi periodi, fuori dell'incubatore senza medium.

CTC. Tale soluzione è stata utilizzata per il passaggio cellulare, ovvero per staccare le cellule adese alla superficie della piastra, minimizzando gli eventuali danni alla membrana citoplasmatica. La composizione base di tale soluzione è data da tripsina e collagenasi la cui azione tossica viene ridotta dall'aggiunta di siero di pollo. La composizione di un litro della soluzione è la seguente:

Hank's V stock solution. Tale soluzione costituisce fondamentalmente un sistema tampone atto a ricreare, in vitro, le caratteristiche elettrolitiche proprie dei fluidi biologici. Si tratta di uno dei costituenti base di un gran numero di soluzioni utilizzate nella coltura cellulare. La composizione, per ottenere una soluzione 20x, è la seguente:

Al fine di garantirne la sterilità, al momento della preparazione tutte le soluzioni su indicate, compresi i terreni, sono state fatte passare attraverso un filtro di diametro di 0.2 μ .

4. Allestimento della coltura primaria

Un frammento di tessuto epatico del peso approssimativo di 5 g, è stato ottenuto chirurgicamente da un paziente maschio di 61 anni, affetto da carcinoma del colon (stadio II secondo Dukes) nel corso di un intervento di resezione eseguito presso l'Istituto di Clinica Chirurgica dell'Università di Udine. Il paziente aveva fornito il proprio consenso informato per l'esecuzione della biopsia ed il suo successivo utilizzo per lo sviluppo di una coltura primaria. Il tessuto, è stato sospeso in MOSH, e quindi, dopo rimozione della capsula e dei frammenti vascolari di maggiori dimensioni, è stato frazionato meccanicamente prima di dare inizio alla sua digestione enzimatica con CTC, proseguita per due ore. Al termine, dopo una centrifugazione a 1000 rpm, condotta per 5 minuti, il sopranatante è stato aspirato ed eliminato, mentre il pellet cellulare è stato risospeso in terreno fresco e insemato in 6 piastre per coltura primaria. Circa 8 ml di terreno fresco HCM sono stati aggiunti in ciascuna delle piastre: il primo cambio è stato eseguito dopo circa una settimana dal piastramento.

Condizioni di coltura: le piastre sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C e con il 5% di CO₂. Il terreno (HCM) è stato cambiato due volte alla settimana, aggiungendo ad ogni cambio 8 ml di soluzione fresca.

5. Colture secondarie

Colonie cellulari epiteliali di aspetto poligonale sono state demarcate e successivamente isolate mediante uso di cilindri per clonaggio ("cloning cylinders"). Cilindri costituiti da materiale plastico sono stati sigillati alla base con grasso di silicone ed infine fatti aderire alla superficie della piastra, nelle zone precedentemente marcate. Il CTC è stato aggiunto fino al massimo volume consentito dal cilindro, e le piastre sono infine state riposizionate all'interno dell'incubatore per circa 30 minuti, fino cioè al completo distacco del monostrato cellulare. Infine la soluzione è stata aspirata ed il contenuto posizionato in piastre del diametro di 60 mm, cui erano stati precedentemente aggiunti 4 ml di terreno fresco.

Quando invece la crescita delle cellule all'interno delle piastre, primarie e secondarie, era giunta a confluenza, il passaggio è stato eseguito secondo un

diverso protocollo. Il terreno veniva infatti aspirato e si procedeva ad un lavaggio della superficie cellulare con MOSH (8 ml circa). Dopo un minuto circa si procedeva all'aspirazione del MOSH e 2.5 ml di CTC (per piastre del diametro di 100 mm) venivano posizionati e lasciati agire per circa 1 ora in incubatore a 37 °C. La centrifugazione e la risospensione delle cellule sono state eseguite secondo quanto precedentemente descritto: il rapporto di ripiastramento è stato abitualmente di 1:4.

6. Curva di crescita

L'analisi dei parametri di crescita della nostra coltura è stata eseguita tramite la costruzione di "curve di crescita" dopo circa 10 generazioni cellulari. Per ognuno dei tempi considerati sono state preparati campioni cellulari in triplicato: il passaggio e la successiva conta cellulare sono stati eseguiti ogni due giorni. Sulla base dei grafici ottenuti sono stati desunti i parametri di crescita della popolazione mediante il calcolo del numero di duplicazione della popolazione (PDL). Il PDL indica il numero di generazioni compiute dalla popolazione, nell'intervallo di tempo considerato.

Nella fase di crescita logaritmica della curva, si considera un tratto approssimabile ad una retta; riferendosi ai valori corrispondenti ai giorni estremi del tratto considerato si può applicare la formula $N_f/N_i=2^x$, dove N_f è il numero finale di cellule, N_i è il numero iniziale, x è il PDL.

Il tempo di duplicazione delle cellule in esame è il tempo necessario perché la popolazione cellulare raddoppi il numero dei suoi elementi ovvero perché una cellula origini due cellule figlie. Questo viene desunto considerando un intervallo di tempo, nella fase di crescita logaritmica, nel quale le cellule raddoppiano il loro numero e solitamente viene espresso in ore.

7. Analisi della sintesi proteica

In piastre di 100 mm di diametro, contenenti cellule cresciute a confluenza, il terreno è stato aspirato e, dopo un lavaggio eseguito con MOSH, sono stati piastrati 8 ml di terreno di differenziamento (HCM MOD). Dopo 24, il terreno così "condizionato" in quanto rimasto a contatto con le cellule, è stato raccolto ed utilizzato per il dosaggio delle proteine totali utilizzando un metodo

spettrofotometrico, solitamente applicato nel dosaggio delle proteine urinarie (Enzycolor, Proteine urinarie, Metodo Spettrofotometrico-POLI Diagnostici, Jersey City, USA). Il principio della reazione è il seguente: le proteine presenti nel campione reagiscono con il Rosso di Pirogallolo e con Molibdato in mezzo acido, formando, in modo proporzionale alla loro concentrazione, un complesso colorato che viene misurato spettrofotometricamente; la lettura viene eseguita a 600 nm.

8. Studio dell'mRNA

Dopo 10 e 20 generazioni cellulari, per giungere ad una ulteriore caratterizzazione cellulare, si è proceduto alla ricerca del mRNA codificante per proteine di specifica sintesi epatica. In dettaglio, si è ricercata la presenza di mRNA per albumina, alfa-fetoproteina, ferritina, transferrina, fattore IX della coagulazione. L'analisi è stata eseguita su un campione cellulare pari a 1×10^6 ; le cellule erano cresciute fino a confluenza al momento del passaggio ed erano state mantenute costantemente in terreno di crescita.

Per l'esecuzione dell'amplificazione di mRNA mediante la tecnica della reazione a catena delle polimerasi (PCR) sono necessari due passaggi preliminari quali l'estrazione genomica del total mRNA, eseguita con kit commerciali (Total quick RNA, Talent, Trieste, Italy) ed una retrotrascrizione, in quanto la PCR si può applicare solo su DNA.

Estrazione genomica. Il processo di estrazione consta di quattro distinti passaggi nei quali si ottiene, mediante l'aggiunta al campione di soluzioni di diversa composizione, dapprima la lisi cellulare, con precipitazione del materiale genomico sotto forma di complessi con il detergente, e successivamente la purificazione del mRNA dai detriti proteici e di DNA, mediante due distinti lavaggi con soluzioni contenenti cloroformio ed etanolo, nell'ordine. L'uso di provette di raccolta in cui viene ad accumularsi, mediante centrifugazione, il filtrato, facilita questi passaggi consentendo l'eliminazione ad ogni fase, del materiale indesiderato. Più in dettaglio, la procedura seguita prevedeva:

- aggiunta ad ogni campione di 700 μ l "Soluzione di lisi", contenente guanidinio isotiocianato, in una colonna di centrifugazione

- incubazione per 10 minuti a 4°C
- centrifugazione a 10,000 rpm per 15 secondi
- eliminazione del filtrato ed aggiunta di 700 µl di "Soluzione di lavaggio"
- centrifugazione a 10,000 rpm per 1 minuto
- eliminazione del filtrato ed aggiunta di 500 µl di Etanolo al 70%
- centrifugazione a 10,000 rpm per 1 minuto
- inserimento della provetta di raccolta in una Eppendorf ed aggiunta di 100 µl di acqua "RNAsi free".
- agitazione per pochi secondi ed incubazione a 37°C per 5 minuti al fine di risospendere l'RNA raccolto

Tutte le operazioni sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare tipo P2.

Retrotrascrizione. La sintesi di DNA complementare è stata ottenuta partendo da 4 µl di estratto. Il primo passaggio consiste nel diluire 4 µl di estratto in 25.5 µl di acqua sterile. Tale miscela viene incubata per 10' a 65°C e posta immediatamente in ghiaccio al termine. Contemporaneamente viene preparata la mix di reazione come segue:

- | | |
|---|-------|
| • Tampone 5X | 10 µl |
| • DTT 0.1 M | 5 µl |
| • Pd(N)6 (100 ng/µl, Pharmacia, Uppsala, Sweden) | 1 µl |
| • dNTP (1 mM, Pharmacia, Uppsala, Sweden) | 1 µl |
| • RT 10 UI (Transcriptasi inversa del virus della mieloblastosi murina) | 1 µl |
| • RNAsin 10 U.I. (Boehringer Mannheim, Germany) | 1 µl |

Ad ogni campione vengono quindi aggiunti 20.5 µl della mix di cui sopra e la retrotrascrizione viene effettuata per 1 ora a 37°C.

Amplificazione. Come precedentemente ricordato, la tecnica di amplificazione è stata applicata per la ricerca di mRNA codificante alcune proteine di specifica sintesi epatica. A tal scopo, la sequenza dei primers specifici è stata ricavata dalla consultazione elettronica della "Gene Bank" mentre la loro sintesi è stata ottenuta mediante utilizzo di un sintetizzatore di oligonucleotidi (Nucleotide Syntetizer Mod 320, Applied Biosystem USA). I primers così ottenuti risultano ad una concentrazione pari a circa 500 ng/µl e vengono quindi diluiti in acqua

ultrapura fino ad ottenere una concentrazione finale pari a 100 ng/μl. Infine, in un volume finale pari a 100 μl sono state eseguite le diverse amplificazioni utilizzando le specifiche coppie di primers. La composizione della miscela di reazione risultava la seguente:

- Campione estratto 3 μl
- dNTP 5 mM 1 μl
- Primer senso 100 ng/μl 1 μl
- Primer antisenso 100 ng/ μl 1 μl
- Tampone 10 X 10 μl
- Magnesio 1 μl
- Acqua deionizzata 83.5 μl

- Taq Polymerase. 5 U.I.(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 0.5 μl

La provetta "eppendorf" viene quindi ricoperta da 100 μl di olio minerale (Sigma Chemicals, St. Louis, USA) al fine da evitare l'evaporazione della mix nel corso del processo di amplificazione. Questo prevede infatti la ripetizione, per 30 volte, di un ciclo così costituito:

- Fase di denaturazione 1 minuto a 94°C
- Fase di accoppiamento 1 minuto a 55 °C
- Fase di estensione 1 minuto a 72°C

Qualora sia prevista l'esecuzione di una "Nested PCR" ovvero di una seconda amplificazione in cui i primers vengono codificati in modo da allinearsi a sequenze localizzate all'interno del frammento oligonucleotidico ottenuto con la prima amplificazione, il secondo round di PCR viene effettuato, alle stesse temperature, sempre per 30 cicli, partendo da 3 μl del primo amplificato.

Le sequenze dei primers utilizzati sono le seguenti:

Albumina

EX S: 5' -TGA AAT GGC TGA CTG CTG TG-3'* nt 401-421

EX AS: 5' -CAT CCC GAA GTT CAT CGA G-3' nt 709-689

IN AS: 5' -GCA GCT TTA TCA GCA GCT TG-3' nt 674-655

IN S: 5' -TGA AAT GGC TGA CTG CTG TG-3'* nt 401-421

L'amplificato atteso è di 273 bp

*Emi nested.

Fattore IX della coagulazione

EX S: 5' –TGG AAT GGT AAA GTT GAT GC-3' nt 731-750
EX AS: 5' –CTC CTT GAC ATG AAT CTC TAC-3' nt 1231-1209
IN AS: 5' –GCC CAC TGT GTT GAA ACT G-3' nt 797-815
IN S: 5' –GCC AGC ACA GAA CAT GTT G-3' nt 1197-1177

L'amplificato atteso è di 406 bp

Transferrina

EX S: 5'–CAG TGT CGG AGC ATG AGC CC-3' nt 116-136
EX AS: 5'–GTG GCT CAG GTA CAC AG-3' nt 514-495
IN AS: 5'–GCG TCA TTC CAT CCG ATG G-3' nt 169-188
IN S: 5'–CCA GCG GAC CTG CCT AGA C-3' nt 467-448

L'amplificato atteso è di 298 bp

Eritropoietina

EX S: 5'–CCT CTG GGC CTC CCA GTC-3' nt 55-72
EX AS: 5'–CCC CTG TGT ACA GCT TCA-3' nt 553-536
IN AS: 5'–GAC AGG TAC ATC TTG GAG GC-3' nt 115-134
IN S: 5'–GTG AGT GTT CGG AGT GGA GC-3' nt 479-460

L'amplificato atteso è di 363 bp

Alfafetoproteina

EX S: 5'–TGC GCA AGA ACT TTG CCA TG-3' nt 7527-7546
EX AS: 5'–CTG TTT AGA TTT GGA GAT AG-3' nt 14467-14447
IN AS: 5'–GGA GAA GTA CGG ACA TTC AG-3' nt 7559-7579
IN S: 5'–TCT GCA TGA ATT ATA CAT TG-3' nt 14425-14405

L'amplificato atteso è di 625 bp

Fibronectina

S: 5'–GCC ATT GAT GCA CCA T-3'
AS: 5'–TGT CTT TTT CCT TCC A-3'

L'amplificato atteso è di 250 bp

Elettroforesi. L'identificazione degli amplificati è stata condotta mediante corsa elettroforetica dei campioni in gel d'Agarosio al 1.5% in tampone TBE e

dopo colorazione con Etidio Bromuro. Quale tracciante dei pesi molecolari è stato utilizzato 1 µl di "1 Kb DNA Ladder" (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

9. Ibridizzazione in situ dell'albumina

Per dimostrare il mantenimento della produzione di albumina da parte della nostra linea cellulare rendendola così riconoscibile in caso di xenotrapianto, riboprobe di cDNA corrispondenti ad una sequenza codificante l'albumina umana, dell'estensione pari a 2Kb (ATCC, Rockville, Maryland, USA), sono stati utilizzati per sintetizzare un trascritto SP6. Le cellule sono state fatte crescere fino a confluenza in capsule di Petri di 100 mm di diametro e sono state successivamente passate come precedentemente descritto. Il pellet ottenuto è stato sottoposto a centrifugazione (1000 rpm per 5 minuti) e successivamente fissato per 5 minuti prima di venire lavato per un minuto con ciascuna delle seguenti soluzioni: 0.2 N HCl, PBS e 0.3% Triton 100 X. Successivamente, una fase di digestione con Proteinasi K 100 µg/ml proseguita per due minuti a 37°C ha consentito di denaturare la membrana consentendo l'ingresso dei probe all'interno della cellula. Dopo un lavaggio per 30 minuti con il tampone di pre-ibridizzazione (2xSSC/formamide al 50%), l'ibridizzazione con il probe per l'albumina è stata eseguita a 42°C per 12 ore. Sono stati quindi eseguiti ripetuti lavaggi usando la soluzione 2xSSC a temperatura ambiente per 30 minuti, poi 0.1x SSC a 50°C per ulteriori 30 minuti. Infine anticorpi anti fosfatasi alcalina coniugata con anti-digossigenina diluiti 1:2000 sono stati applicati alla preparazione per un'ora e rimossi mediante lavaggio con tampone Tris. I probe sono stati visualizzati mediante l'uso del substrato Nitro-Blu-Tetrazolium/Bromo-Cloro-Indolyl-Fosfato (NTP/BCIP). I vetrini sono quindi stati risciacquati in acqua, colorati e montati in Glycergel.

10. Caratterizzazione morfologica

Colorazione con Ematossilina-Eosina. La prima valutazione morfologica delle cellule è stata effettuata mediante colorazione con Ematossilina ed Eosina. A tal fine, le cellule sono state fatte crescere sino a confluenza e successivamente mantenute in coltura, per circa 2 settimane, in terreno di

differenziamento. Al termine di tale periodo, sono state staccate dalla piastra secondo la tecnica del passaggio (cfr; colture secondarie) ed infine risospese in soluzione fisiologica (PBS: NaCl 0.15 M, Tampone fosfato monobasico e bibasico di sodio 10 mM; pH 7.2-7.4). Si è proceduto quindi ai due successivi passaggi, ovvero:

- citocentrifugazione (posizionamento delle sospensioni cellulari in specifiche cellette che vengono successivamente montate su rotori di centrifuga: per effetto della forza centrifuga -1400 rpm per 10 minuti a 25°C- le cellule vengono ad attaccarsi sul vetrino portaoggetto, sul quale viene poi eseguita la colorazione. I vetrini vengono fissati e lasciati asciugare nel corso della notte. Il mattino seguente si procede quindi alla colorazione)

- colorazione. Richiede una serie di passaggi quali fissazione e ripetuti lavaggi fino alla colorazione propriamente detta. Nell'ordine:

- Fissazione in alcool etilico a 95° per 10 minuti
- Lavaggio in acqua corrente
- Colorazione con Ematossilina di Mayer per 10 minuti
- Lavaggio in acqua per 10 minuti, fino a viraggio del colorante
- Lavaggio veloce in acqua distillata
- Passaggio in alcool etilico a 70° per 1 minuto
- Colorazione con Eosina alcoolica per 3 minuti
- Disidratazione progressiva in quattro fasi:
 - Passaggio in alcool etilico a 80°
 - Passaggio in alcool etilico a 95°
 - Passaggio in alcool etilico a 100°
 - Passaggio in Xilolo
- Montaggio del vetrino coprioggetto in balsamo

Analisi immunoistochimica. Al fine di caratterizzare ulteriormente la nostra popolazione cellulare, dopo dieci generazioni abbiamo eseguito un'indagine immunoistochimica con anticorpi specifici rivolti contro citocheratine ed integrine abitualmente presenti sulla superficie epatocitaria. Le cellule sono state cresciute in diverse condizioni:

- piastrate in capsule di Petri
- cresciute in "chamber slides" (Nalgene Nunc International, Naperville, USA) ovvero cellette in materiale plastico montate su vetrini portaoggetto.

L'uso delle due condizioni di coltura è stato dettato dalla ricerca della diversa espressione e localizzazione delle integrine nelle cellule fissate ed analizzate mentre a confluenza, con mantenimento cioè degli aspetti dettati dal contatto cellula-cellula, oppure dopo passaggio, condizione nella quale le cellule risultano isolate e non interagenti tra loro.

In entrambi i casi le cellule sono state mantenute in terreno di crescita fino al raggiungimento della confluenza, mentre successivamente sono state mantenute, per circa due settimane, in terreno di differenziamento.

I passaggi successivi hanno presentato alcune differenze a seconda del sistema di coltura utilizzato:

- le cellule cresciute in capsule di Petri sono state passate, raccolte e citocentrifugate secondo la stessa metodica utilizzata per la colorazione con Ematossilina ed Eosina
- le cellule cresciute in chamber slides sono state sottoposte a lavaggio delicato con MOSH e si è proceduto alla analisi direttamente sul vetrino portaoggetto

E' stato quindi applicato il sistema anticorpo I, anticorpo II, avidina piu' enzima, substrato dell'enzima. I vetrini sono stati sottoposti ai seguenti passaggi:

- lavaggio con tampone fisiologico (PBS)
- fissazione in acetone a 4°C per 8 minuti
- incubazione in "siero normale non immune"(siero cioè dell'animale dal quale è stato prodotto l'anticorpo secondario in esame) per 20 minuti
- eliminazione, mediante assorbimento, dell'eccesso di siero
- incubazione con l'anticorpo primario per 1 ora
- lavaggio accurato; 5 minuti per due volte
- incubazione con l'anticorpo secondario, biotinilato per 30 minuti
- lavaggio di 5 minuti, ripetuto due volte
- incubazione con soluzione di Avidina legata alla Perossidasi, per 30 minuti

- lavaggio di 5 minuti, per due volte
- incubazione con il substrato cromogeno della perossidasi (Diaminobenzidina) per 10 minuti
- creazione di un leggero contrasto usando ematossilina di Mayer, per 2-3 minuti

Tale indagine è stata eseguita con i seguenti anticorpi:

- anti CAM 5.2: Anticorpo primario (monoclonale) di topo (Becton Dickinson, Plymouth, England): Anticorpo secondario di cavallo (Vector, Burlingame, USA)
- anti CK 8: Anticorpo primario (monoclonale) di topo (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany): Anticorpo secondario di coniglio (Dako, Glostrup, Denmark)
- anti CEA: Anticorpo primario (policlonale) di coniglio (Dako): Anticorpo secondario di maiale (Dako)

11. Microscopia elettronica

Le cellule sono state cresciute sino a confluenza in piastre del diametro di 100 mm e mantenute in terreno di crescita sino al momento dell'analisi. E' stata quindi eseguita la fissazione a 4°C per 15 minuti con Glutaraldeide al 2.5% in un tampone sodio-fosfato (Glauert AM). Successivamente, le cellule sono state staccate meccanicamente dalla piastra, tramite utilizzo di una piccola spatola sterile ("scraper"). Ottenuto un pellet, la fissazione era stata proseguita, con la soluzione di cui sopra, per ulteriori due ore alla temperatura di 4°C. Dal pellet sono state ottenute infine sezioni di spessore inferiore ad 1 μm che sono state ulteriormente fissate per due ore a 4°C (Hayat) con una soluzione all'1% di Osmio tetraossido (Polysciences Inc., Warrington, PA). Le cellule sono quindi state colorate con 2% uranyl acetato, disidratate in una serie graduale di lavaggi con etanolo, lavate, infiltrate ed imbibite in una resina plastica (Spurr). Dopo tali passaggi dai blocchetti sono state ottenute delle sezioni ultrasottili (50-70 nm) ed era stato eseguito un'ulteriore colorazione con piombo citrato. Le sezioni sono quindi state analizzate con un microscopio modello M902 della ditta Zeiss.

12. Studio dei cromosomi

Definito il mantenimento delle caratteristiche morfologiche e di sintesi proprie degli epatociti, abbiamo valutato la "normalità" della nostra coltura continua sottoponendo le cellule ad analisi del cariotipo.

Le cellule sono state piastrate a bassa concentrazione, in numero di 5000 per vetrino coprioggetto: per ovviare alla sofferenza ed al rallentamento replicativo abitualmente osservati in colture a "bassa densità cellulare", 5 vetrini coprioggetto sono stati posti in capsule di Petri del diametro di 100 mm. Dopo aver eseguito il passaggio delle cellule secondo la procedura precedentemente descritta (vedi colture secondarie), un ml di sospensione cellulare è stato piastrato su ogni vetrino: solo dopo due ore, ad adesione cellulare avvenuta, sono stati aggiunti 8 ml di terreno di crescita. Le cellule sono state quindi mantenute in incubatore, ed il numero di mitosi cellulari è stato monitorato: dopo due giorni di crescita le cellule sono state inviate al Laboratorio di Genetica, dove l'analisi è stata eseguita.

E' stata utilizzata la metodica abitualmente utilizzata per l'analisi delle cellule del liquido amniotico.

Procedura. Il primo passaggio di tale metodica è finalizzato a bloccare in metafase i cromosomi delle cellule in divisione: ciò è reso possibile dall'azione di depolimerizzazione attuata dalla Demecolcine ("Colcemid Solution", 10 g/ml, Gibco, N.Y., USA) sui microtubuli. In ciascuna delle capsule di Petri preparate come precedentemente descritto sono stati posizionati 5 ml di Demecolcine. Le piastre sono quindi state poste in termostato per 5 ore.

Si procede quindi all'allestimento dei preparati trattandoli con le seguenti soluzioni:

- soluzione ipotonica (KCl 0.073 M)
- prefissativo (2 volumi Soluzione Ipotonica, 3 volumi di fissativo)
- fissativo (1 volume di Acido Acetico, 3 volumi di di Metanolo)

Il protocollo prevede le seguenti operazioni:

- si rimuove il terreno di coltura

- si aggiungono nella piastra 10 ml di soluzione ipotonica, mantenendola per 9 minuti al fine di provocare il rigonfiamento delle cellule e la dispersione dei cromosomi
- si aggiungono 10 ml di prefissativo per bloccare l'azione della soluzione ipotonica.
- si rimuovono la soluzione ipotonica ed il prefissativo e si aggiungono 10 ml di fissativo, mantenendolo per 5 minuti.

I vetrini portaoggetto vengono quindi prelevati dalle piastre e montati su vetrini portaoggetto con "Eukitt" (O. Kindler) per essere poi posti in una stufa dove vengono lasciati, a 40°C, per una notte. Si procede quindi alla colorazione con Giemsa al 5% ed all'osservazione al microscopio. Le metafasi vengono ricercate a 100 ingrandimenti e le migliori vengono fotografate a 1000 ingrandimenti. Di ogni campione vengono fotografate 6 mitosi e di ognuna di esse si misurano le coordinate per mezzo di una scala annessa al tavolino traslatore del microscopio, per poterli ritrovare e rifotografare in fluorescenza dopo colorazione con "Mostarda di Quinacrina". Per realizzare questa colorazione bisogna prima procedere alla decolorazione secondo i seguenti passaggi:

- immersione dei vetrini in fissativo, due volte per 5 minuti
- immersione in alcool etilico al 50% per 5 minuti
- immersione in acqua distillata, due volte per 5 minuti

I vetrini vengono quindi sottoposti a colorazione con "Mostarda di Quinacrina" per circa 30 minuti trascorsi i quali si procede al loro risciacquo sotto acqua corrente: vengono quindi montati i coprioggetto.

Le sei metafasi precedentemente fotografate vengono rifotografate in fluorescenza. Le metafasi si considerano ottimali quando i cromosomi sono ben separati, senza sovrapposizioni e con bandeggio evidente. Dalle fotografie delle metafasi scelte si procede al ritaglio dei cromosomi, al loro riordino ed alla numerazione per ricostruire il cariotipo cellulare.

13. Espressione della proteina del core

Esperimenti preliminari effettuati dal nostro gruppo in collaborazione con quello del prof Curcio avevano dimostrato che questo sistema non è efficientemente

trasfettabile con i comuni sistemi (calcio, destrano, diverse formulazioni lipidiche commerciali).

Per tal ragione ci si è indirizzati sulla produzione di vettori ricombinanti adenovirali, nel cui genoma sono stati deleti due geni essenziali per la completa replicazione virale (E1 ed E3). La prima fase prevede il clonaggio della sequenze virali nel plasmide shuttle pDNR, la fase successiva prevede la ricombinazione CRE-loxP diretta tra il plasmide shuttle ed il BAC (Bacterial Artificial chromosome) contenente il genoma dell'Adenovirus (deleto dei geni E1-E3) e la successiva elettroporazione in E.coli. L'ultima fase prevede la trasfezione delle cellule HEK-293 e la successiva produzione degli adenovirus ricombinanti, che saranno in grado di infettare le cellule bersaglio di interesse (in questo caso il sistema epatocitario normale) inducendo espressione della proteina core, pur senza potere eseguire un completo ciclo replicativo.

E' in fase di messa a punto in sistema di trasduzione della proteina del core molto più efficiente, basato sui vettori lentivirali (vedi introduzione per maggiori dettagli).

RISULTATI

ESPRESSIONE DELLA PROTEINA CORE

1. 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 Genebank, avessero un grado di omologia sufficiente da permettere l'ibridizzazione dei primers a tutti i cDNA estratti dai pazienti. In Figura 3 è possibile vedere il risultato dell'amplificazione di alcuni campioni.

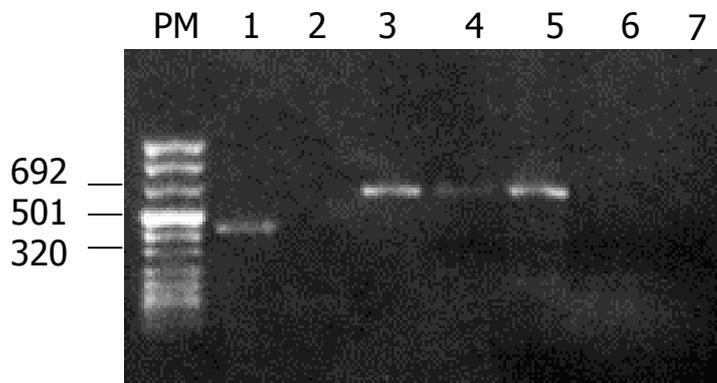


Figura 3: Elettroforesi dell'amplificazione del *core* dai sieri A (lanes 1 e 2), B (lanes 3 e 4), C (lanes 5 e 6); nella lane 7 è stato caricato il controllo negativo. Si può notare come il siero A abbia dato origine ad un amplificato di dimensioni minori dell'atteso, mentre il siero C è stato amplificato in una sola delle due reazioni.

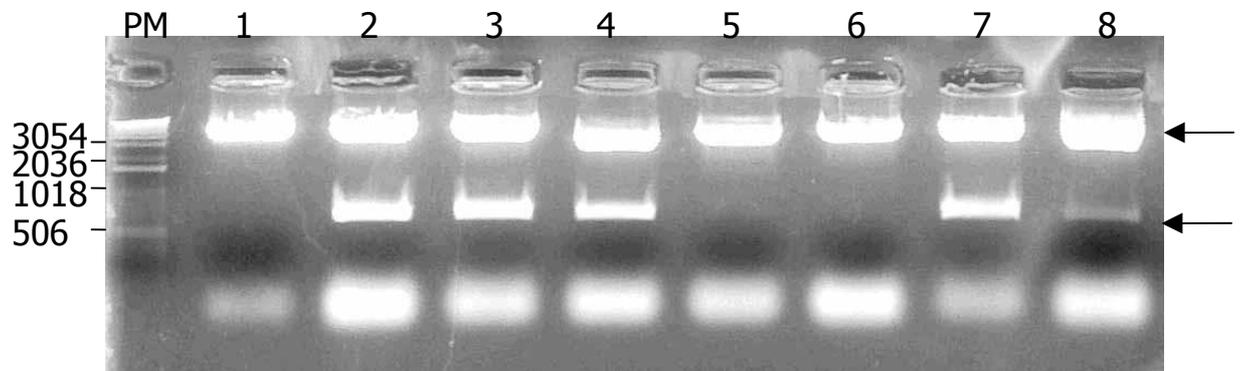
2. Clonaggio della sequenza *core*

I prodotti dell'amplificazione sono quindi stati clonati nel plasmide pMOS. La Figura 4 è un esempio della digestione enzimatica delle minipreparazioni del DNA batterico per l'identificazione delle colonie positive. 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 Figura 5 riporta il risultato di una reazione di sequenza.

Figura 4: Corsa elettroforetica delle miniprep digerite con gli enzimi HindIII/EcoRI. Nella prima corsia i pesi molecolari, di seguito le miniprep da 1 a 8. Le due frecce indicano rispettivamente la banda di 2887 kbp del plasmide e quella di 576 bp del frammento del *core* presente nelle colonie 2, 3, 4, 7 e 8.



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 stato 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*.

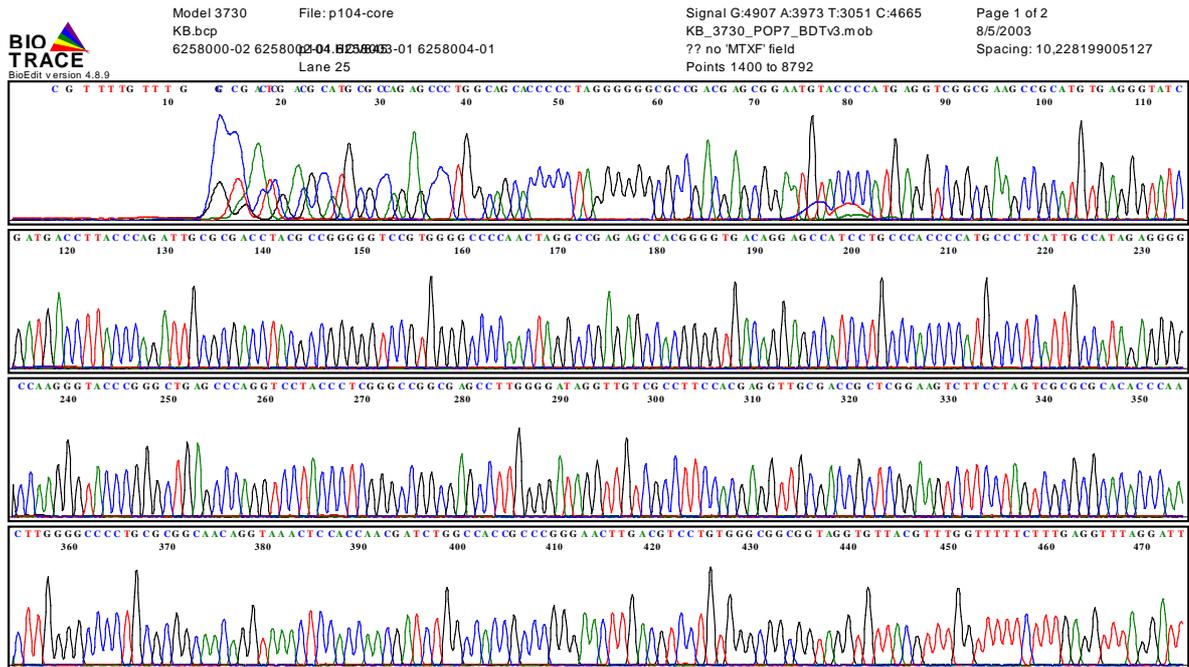


Figura 5: Esempio di sequenziamento. In particolare l' elettroferogramma si riferisce al sequenziamento del plasmide pMOS contenente la sequenza del *core*. La sequenza è stata ottenuta utilizzando il primer specifico *core*856.

3. Studio dell'espressione cellulare della proteina core in cellule COS-7

3.1 Subclonaggio della sequenza del core nei plasmidi di espressione pDNR e pMT2

La sequenza del core (plasmide p102) è stata subclonata in plasmidi per l'espressione in cellule di mammifero ed i nuovi plasmidi sono stati nominati:

- p103: core in pDNR,
- p105: core in pMT2-HA
- p110: core in pCDNA3.1+

- p114: core in pMT2.

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*.

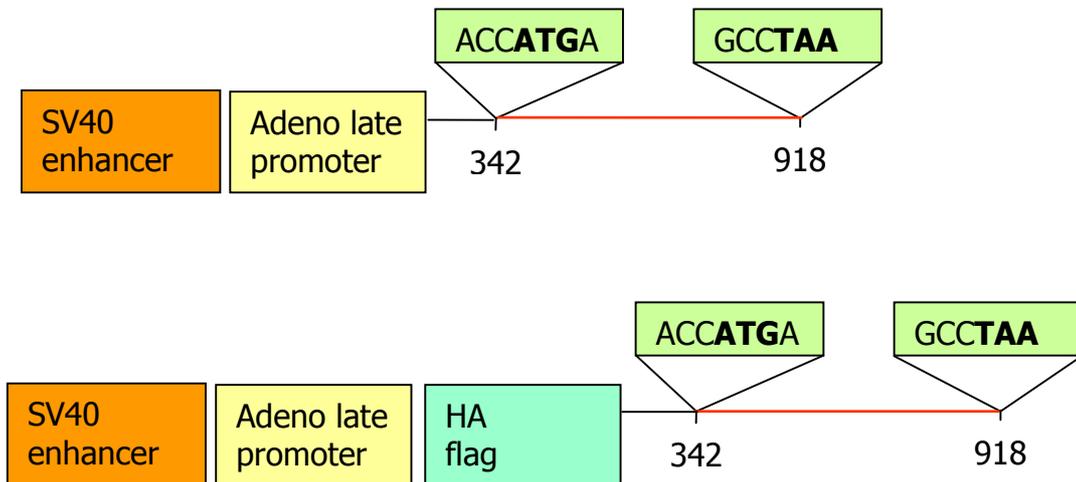


Figura 6: plasmide core in pMT2 (alto) e in pMT2-HA (basso)

3.2 Espressione della proteina core nelle cellule COS-7

Per l'espressione della proteina sono stati inizialmente eseguiti esperimenti con utilizzo della linea cellulare COS-7. Gli esperimenti di trasfezione iniziali sono stati eseguiti utilizzando il plasmide pDNR (p103), in cui la sequenza è posta sotto il controllo del promotore virale del Citomegalovirus. L'espressione della proteina del core è quindi stata verificata tramite immunofluorescenza e Western Blot, utilizzando anticorpi monoclonali contro la proteina stessa; l'efficienza di trasfezione ottenuta in queste condizioni si è rivelata molto bassa. Il pattern dimostrato di espressione proteica era esclusivamente citoplasmatico. Al fine di verificare la causa di tale bassa efficienza, abbiamo subclonato la sequenza nel plasmide pMT2HA (p105), per ottenere una proteina ricombinante. In questo modo è stato possibile usare gli anticorpi contro la flag, e verificare la specificità e la sensibilità degli anticorpi anti-core. L'utilizzo di questo plasmide ci ha inoltre permesso di porre la nostra sequenza sotto il controllo di un diverso promotore; infatti nella serie dei plasmidi pMT2 le

sequenze inserite sono controllate dal promotore dell'Adenovirus (enhancer SV40 virus). Si è così potuto valutare, tramite immunofluorescenza con anticorpi contro la flag, che l'efficienza di trasfezione era notevolmente maggiore; tuttavia, anche in questo caso la proteina veniva espressa esclusivamente a livello del citoplasma, con un pattern che faceva pensare ad una localizzazione a livello di reticolo endoplasmatico (Figura 7). L'esperimento è stato ripetuto più volte a diversi tempi dopo la trasfezione (24 ore, 48 ore e 72 ore) ma non si è mai potuta osservare una localizzazione nucleare, come invece riportato da Altri in letteratura. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti utilizzando l'anticorpo antiflag e l'anticorpo specifico per la proteina del core. L'espressione della proteina con o senza flag non ha messo in evidenza alcuna eventuale interferenza della flag nella localizzazione della proteina stessa.

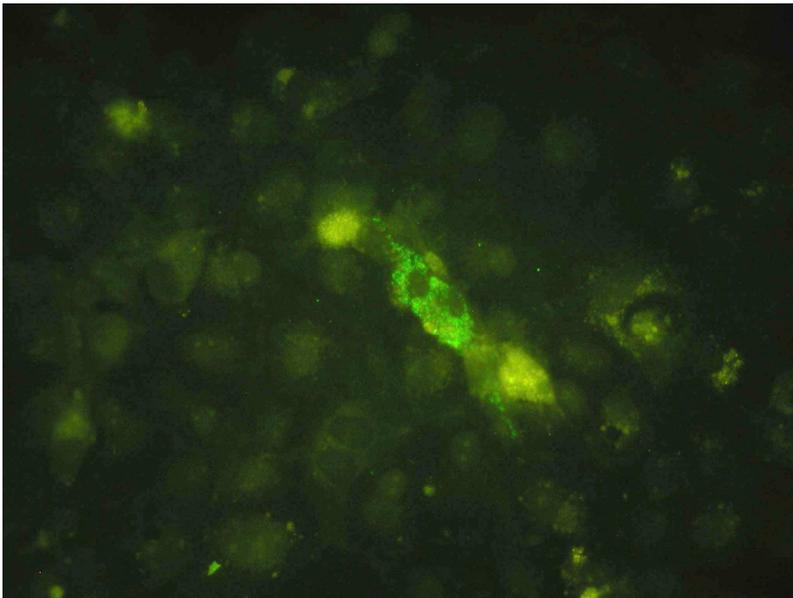


Figura 7: Determinazione dell'espressione della proteina del *core* in cellule COS-7 trasfettate con il plasmide p103 tramite immunofluorescenza, utilizzando anticorpi anticore. La foto ha un ingrandimento di 200 \times , il campo riprende una delle rare cellule positive.

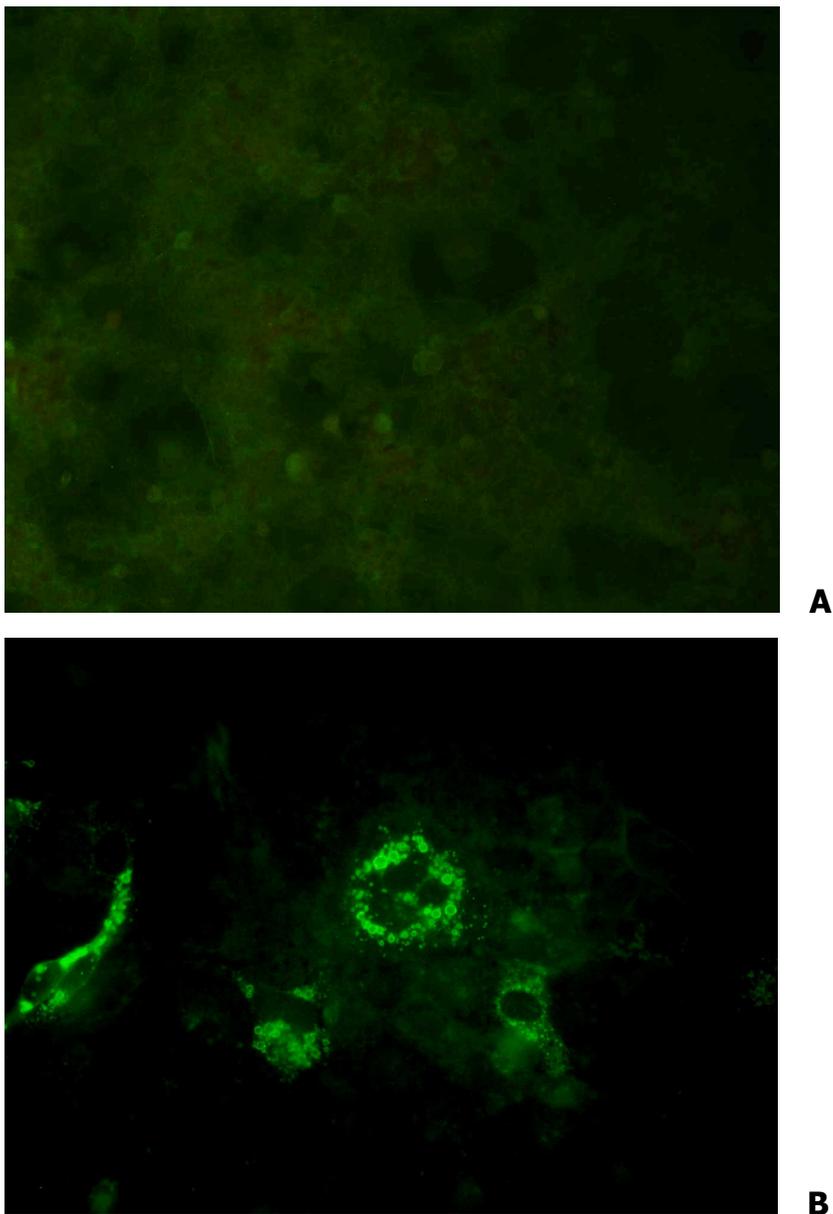


Figura 8: Determinazione dell'espressione della proteina del *core* in cellule COS-7 tramite immunofluorescenza. Pannello **a**: cellula trasfettate con il plasmide pMT2-HA vuoto; pannello **b**: cellule trasfettate con il plasmide p105. Le foto hanno un ingrandimento di 200 \times .

4. Studio dello splicing della proteina del core nelle cellule COS-7

4.1 Subclonaggio della sequenza del core e di E1 nel plasmide di espressione pDNR

Onde studiare non solo la localizzazione della proteina, ma anche il suo eventuale splicing, abbiamo iniziato il subclonaggio della regione della sequenza

virale che comprende una parte della regione non tradotta al 5' (5'UTR) (nt 279-341), il core (nt 342-914), la proteina dell'envelope E1 (915-1490) e buona parte della E2 (1491-2282 la cui sequenza completa arriva fino al nt 2579 compreso). A tal fine, abbiamo utilizzato la regione ottenuta sottoponendo a digestione con opportuni enzimi il plasmide pBRT703'X (rinominato p108) contenente il cDNA dell'intera sequenza codificante per il virus HCV tipo 1d (isolato NIHJ1, Gene Bank D_89815). I frammenti sono stati successivamente introdotti nel plasmide pDNR e così nominati:

- p112 di 2003 pb (nt 279-2282) dopo taglio con Stu I e Xho I
- p113 di 1059 pb (nt 279-1338) dopo taglio con Stu I, Xho I e Bam HI.

4.2 Espressione della sequenza del core e di E1 nelle cellule COS-7

La trasfezione di questo plasmide in cellule comporta la sintesi di una poliproteina, e la produzione della proteina del core è dipendente dallo splicing cellulare. Come è stato possibile osservare in Western Blot, la trasfezione del plasmide p112 in COS-7 ha effettivamente indotto la produzione della proteina del core, seppure in quantità minore rispetto alle cellule trasfettate con il plasmide p114 (Figura 9).

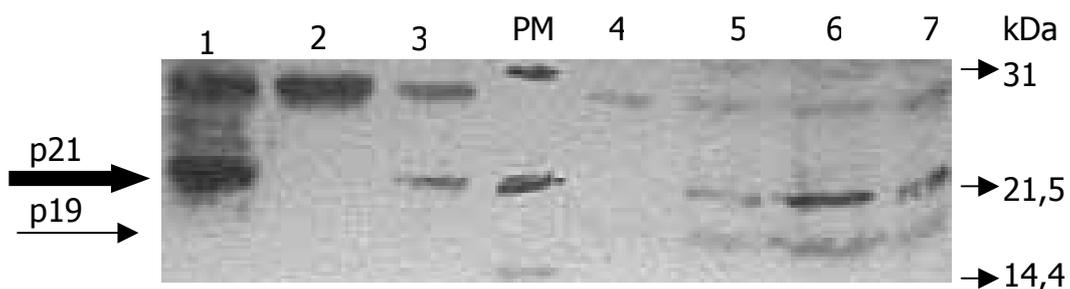


Figura 9: Western Blot di lisati totali ottenuti da COS-7 48 ore dopo la trasfezione; l'immunoblot è stato realizzato utilizzando l'anticorpo monoclonale contro la proteina del *core*. Lane 1: p114, lane 2: COS-7; lane 3: p105; lane 4: p103; lane 5: p112; lane 6,7: p113 (due diversi cloni)

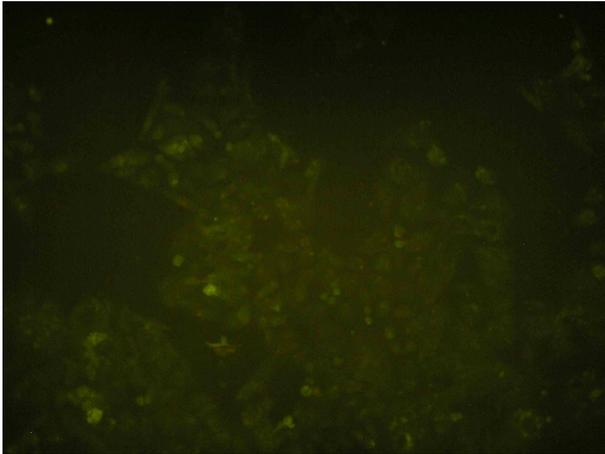
Va comunque segnalato come il clonaggio di una sequenza di cDNA, che comprende parte della regione non trascritta prima dell'ATG, abbia portato ad un aumento sensibile della quantità di proteina espressa (o meglio, della percentuale di cellule trasfettate in grado di esprimere la proteina stessa). Va inoltre segnalato come nelle cellule trasfettate con i plasmidi p112 e p113 sia osservabile un prodotto di peso molecolare inferiore (di circa 19 kD), riconosciuto dall'anticorpo monoclonale core-specifico. Nonostante la presenza della forma più corta della proteina nel Western Blot, gli esperimenti in immunofluorescenza non hanno evidenziato alcuna variazione nella localizzazione cellulare della proteina. E' possibile che il livello di espressione proteica non sia stato sufficiente ad evidenziare la porzione con localizzazione nucleare.

5. Studio dello splicing della proteina del core nelle cellule HepG2

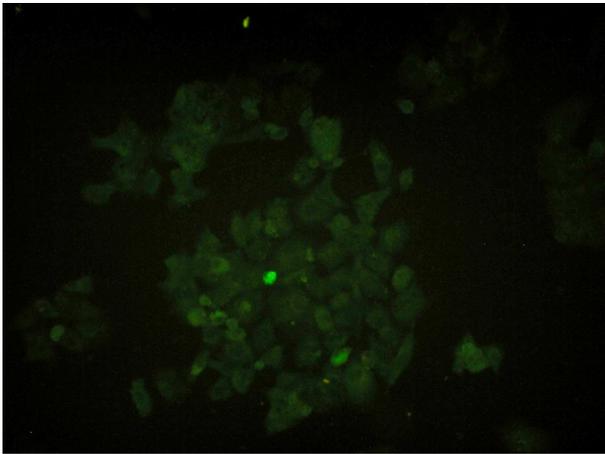
Al fine di verificare se ci fosse un possibile contributo da parte del tipo cellulare, riguardo l'atteso splicing e localizzazione della proteina, abbiamo ripetuto gli esperimenti utilizzando una linea cellulare umana derivata da HCC (HepG2).

La trasfezione della proteina del core in queste cellule ha confermato la differenza di espressione già avuta nelle cellule COS-7 in relazione al promotore utilizzato. L'espressione del core quando è posto sotto il controllo del promotore dell'Adenovirus (p105) risulta infatti essere decisamente maggiore rispetto a quella ottenibile sotto il controllo del promotore del Citomegalovirus (p103) (Figura 10).

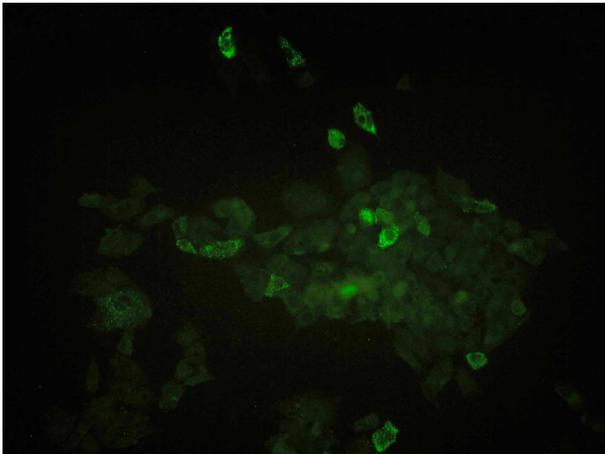
Diversa è invece la situazione per quanto riguarda la localizzazione cellulare. Mentre nelle COS-7 l'immunofluorescenza aveva dimostrato una localizzazione esclusivamente citoplasmatica della proteina del core, nelle HepG2 si è evidenziata una localizzazione nucleare. La traslocazione della proteina al nucleo non appare un fenomeno uniforme, ma bensì limitato a quelle cellule in cui si osserva una fluorescenza citoplasmatica più forte (Figura 11).



A

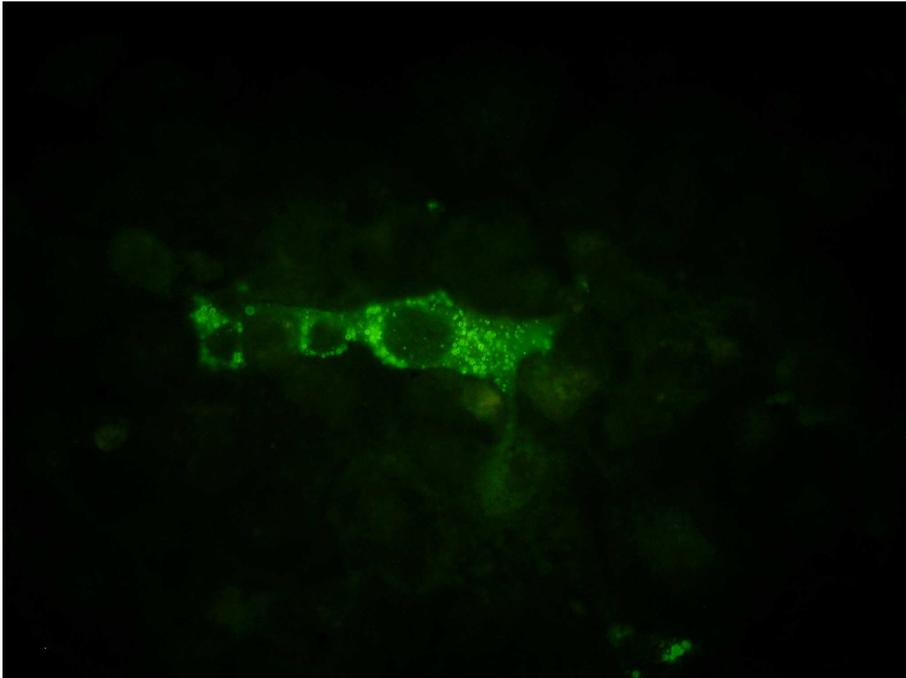


B

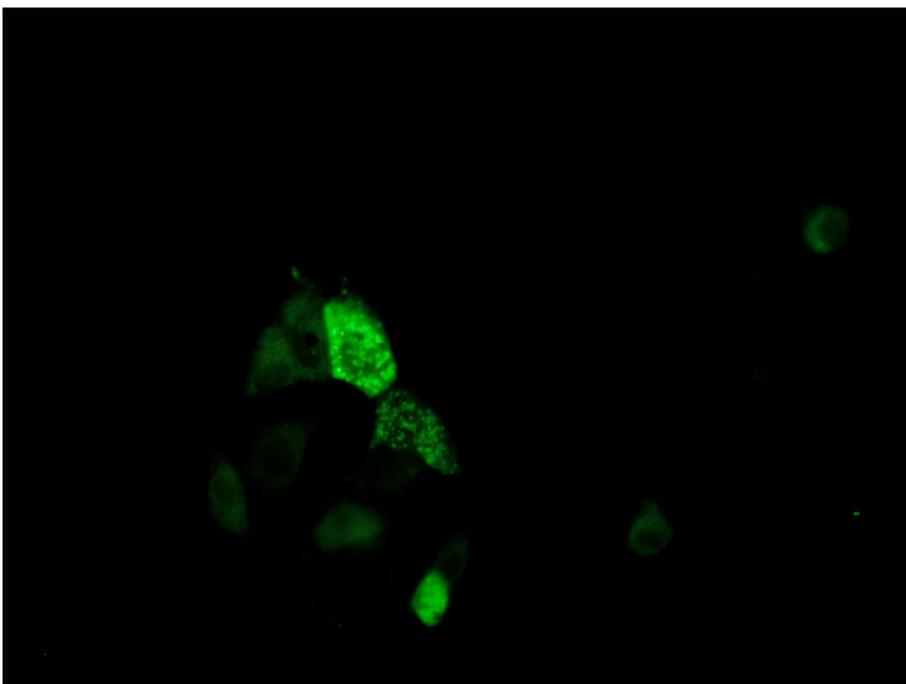


C

Figura 10: Espressione della proteina *core* in cellule HepG2, determinata con immunofluorescenza. Pannello **a**: cellule trasfettate col plasmide pMT2-HA vuoto. Pannello **b**: cellule trasfettate col plasmide p103. Pannello **c**: cellule trasfettate col plasmide p114. Ingrandimenti 200x.



A



B

Figura 11: Determinazione con immunofluorescenza dell'espressione della proteina *core*. **Pannello c:** espressione in cellule COS-7, trasfettate col plasmide p112. Ingrandimento 400x. **Pannello d:** espressione in cellule HepG2 trasfettate col plasmide p112. Ingrandimento 400x.

6. Studio dell'espressione della proteina del core nelle cellule Huh7 e HEK-293

Gli esperimenti, sia tramite immunofluorescenza che Western-blotting, non hanno fornito risultati definitivi per una supposta scarsa efficienza di trasfezione dei plasmidi fin qui utilizzati (p110 e p112). Sembra comunque associata una duplice positività di espressione (citoplasmatica e nucleare) a livello delle cellule di derivazione epatocitaria (Huh7), mentre sembrerebbe confermata una localizzazione solo citoplasmatica a livello delle cellule di rene (HEK-293).

7. Produzione di vettori ricombinanti virali

7.1 vettori adenovirali ricombinanti

La prima fase che prevedeva il clonaggio della sequenze virali nel plasmide shuttle pDNR, è stata completata con successo.

E' stata anche effettuata la ricombinazione CRE-loxP diretta tra il plasmide shuttle ed il BAC contenente il genoma dell'Adenovirus ricombinante. Non si è invece ancora riusciti ad effettuare efficientemente la successiva elettroporazione in E.coli, nonostante i batteri preparati dimostrino una competenza di 10^9 cfu/microg DNA quando elettroporati con un plasmide di controllo. Non è ancora chiaro se il problema sia a livello della ricombinazione o della elettroporazione.

Vista la bassa efficienza del sistema, si è deciso di passare al punto 4.2 (vedi)

7.2 vettori lentivirali

Disponiamo al momento solo di alcuni dati preliminari.

In una prima fase è stata subclonata la sequenza del core e di E1 nel plasmide di espressione PCDNA3.1-, ottenendo un nuovo plasmide denominato p120; dopo taglio con EcoRI e BAMHI si è ottenuto un frammento di 1091 pb (Figura 12A).

Successivamente si è inserito il frammento core-E1 nel vettore lentivirale p14, mediante una reazione ligasica. E' stata poi effettuata una digestione di controllo per verificare il corretto inserimento in frame dell'inserito: dopo digestione del plasmide con BamHI (taglio in posizione 5140) e XhoI (taglio in

posizione 4599) si sono ottenuti due frammenti, rispettivamente di 7420bp e 541bp (Figura 12B).

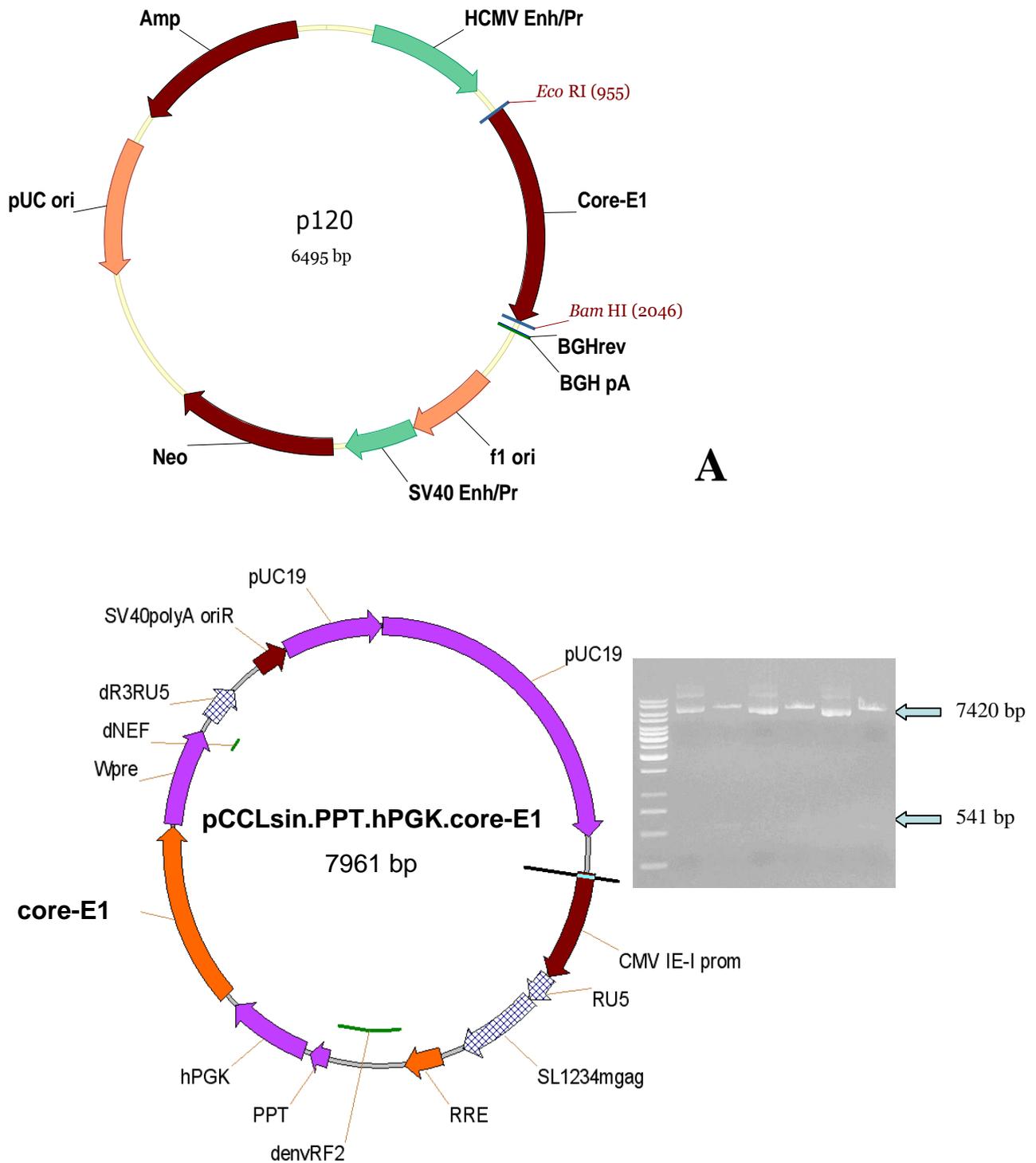


Figura 12: A) mappa del plasmide p120; **B)** mappa dell'inserimento della sequenza core-E1 nel costrutto di trasferimento; nel riquadro di destra digestione di controllo.

SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI UNA LINEA EPATOCITARIA NORMALE

1. Colture primarie

La sospensione cellulare e dei piccoli frammenti tissutali residuati dopo la digestione enzimatica, sono stati distribuiti in piastre del diametro di 100 mm: a circa 24 ore dal piastramento è stato possibile osservare l'adesione delle prime cellule al substrato. I primi segni di crescita sono stati osservati nel corso della seconda settimana, dapprima a partire dai piccoli frammenti tissutali: piccole propaggini sono divenute visibili ai bordi dei frammenti seguiti dalla comparsa di piccoli gruppi cellulari disposti a corona intorno ad il nucleo tissutale. Con circa una settimana di latenza, le divisioni e la crescita sono state osservate anche a partire dalle cellule isolate. In entrambi i casi le sedi delle mitosi cellulari sono state demarcate sul fondo della piastra in modo da poter seguire giorno per giorno l'espansione della popolazione cellulare. La confluenza è stata raggiunta, per divisioni successive, circa 4 settimane dopo l'approntamento della colture primarie, rendendo quindi necessario il ricorso al passaggio per consentire l'ulteriore espansione della popolazione cellulare. La tecnica del passaggio è stata inizialmente applicata su popolazioni cellulari selezionate, demarcate ed isolate mediante l'uso di cilindri di clonazione: in tal caso pertanto le cellule sono state passate prima del raggiungimento della confluenza.

2. Colture secondarie

Le colture secondarie e le successive sono partite con una distribuzione uniforme delle cellule nelle nuove piastre: la maggior parte delle cellule piastrate ha aderito al nuovo substrato ed ha iniziato la replicazione.

Per tutto il periodo di osservazione si è evidenziato un andamento costante: la confluenza veniva raggiunta in una decina di giorni circa ed ogni piastra a confluenza presentava un numero di cellule pari a circa 2 milioni.

3. Differenziamento cellulare

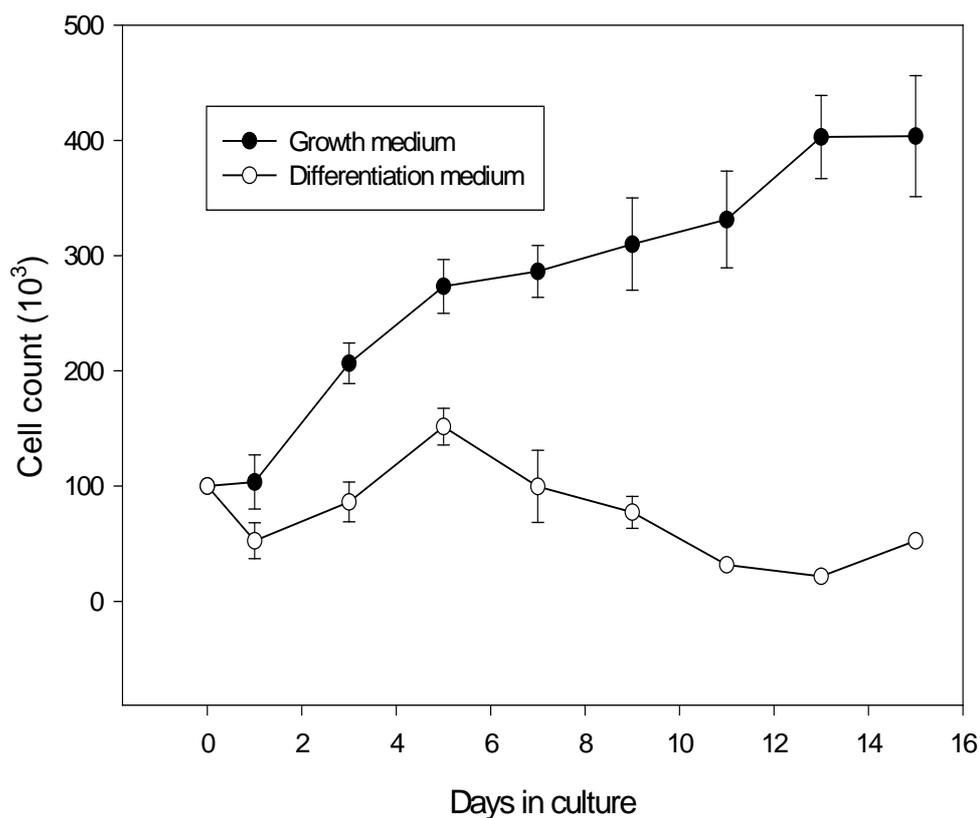
Le cellule sottoposte al terreno di differenziamento, in tutti gli stadi di crescita in piastra considerati, hanno mostrato un blocco della moltiplicazione, mantenendo costante il loro numero e potendo essere mantenute in questa condizione per tempo prolungato, con tempo massimo accertato un mese.

4. Curva di crescita e parametri relativi

La replicazione delle cellule è risultata costante dal momento dell'approntamento della primaria: il numero delle generazioni è risultato elevato ed i parametri di crescita sono risultati paragonabili a quelli delle prime fasi di coltura. I risultati riportati nella Figura 13 forniscono un esempio della costruzione di una curva di crescita relativo alle cellule esaminate alla 20° generazione. Si può notare:

- un calo del numero cellulare il giorno successivo al piastramento (non tutte le cellule si attaccano al substrato)
- una fase di crescita logaritmica (tra il I ed il V giorno)
- una fase di plateau (tra il V e l'XI giorno)

Figura 13: Curva di crescita.



Per quanto concerne il tempo di duplicazione relativo alla curva sopra indicata, si è considerato il raddoppiamento del numero cellulare dal valore di 400.000 a quello di 800.000 ottenendo un valore del tempo di duplicazione in circa 47 ore. Il calcolo del P.D.L. in tale intervallo di tempo è risultato pari a 1.93.

5. Dosaggio delle proteine totali

La Figura 14 riporta i risultati del dosaggio dell'albumina compiuto su diverse popolazioni cellulari, derivate dal selezionamento con cilindri di popolazioni demarcate e dal passaggio delle piastre primarie. Come controllo negativo è stato utilizzato del terreno di differenziamento non condizionato.

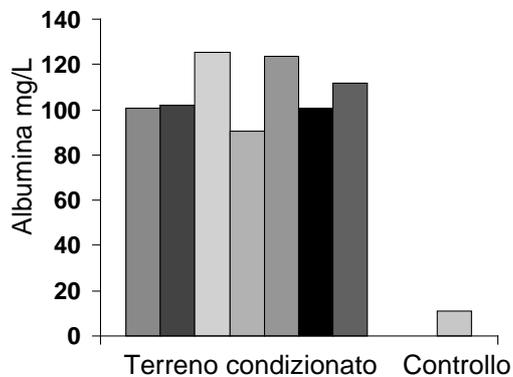


Figura 14: Concentrazione di albumina in campioni di terreno condizionato. Le barre a sinistra mostrano le diverse concentrazioni di albumina misurate, su 7 diverse piastre di Petri, con cellule portate a confluenza. Sulla sinistra la barra relativa al controllo negativo (terreno non condizionato).

6. Analisi dell'mRNA

Le cellule esaminate provenivano dalla VIII generazione cellulare. La Figura 15 mostra i tracciati elettroforetici con le bande relative ai mRNA delle proteine da noi ricercate.

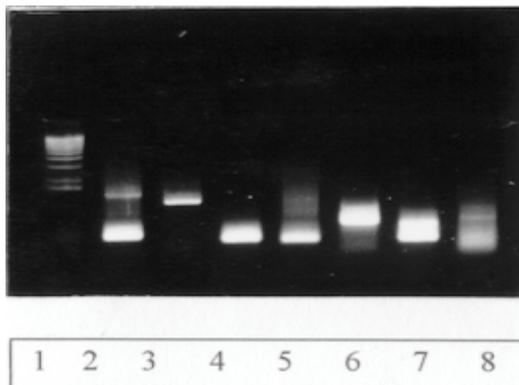


Figura 15. Espressione dell'mRNA.

Corsia: 1 tracciante dei pesi molecolari
 2 eritropoietina 363 bp
 3 fattore IX della coagulazione 406 bp
 4 transferrina 298 bp
 5 fibronectina 250 bp
 6 GAPDH
 7 albumina 273 bp
 8 alfa fetoproteina 625 bp

Dall'immagine sopra riportata si desumono le seguenti informazioni: le cellule mantengono la sintesi di albumina, transferrina, eritropoietina e fibronectina.

7. Ibridizzazione *in situ* dell'albumina

L'ibridizzazione *in situ* dell'albumina eseguita su tessuto epatico umano, sulla linea cellulare Hep-G2 e sul nostro sistema cellulare epatocitario ha mostrato che, pur essendovi un netto decremento dell'intensità del segnale rispetto al tessuto epatico, non si osservano differenze rilevanti tra le popolazioni cellulari esaminate.

8. Analisi morfologica

Le cellule appaiono grandi (15-30 μm di diametro), poliedriche, più allungate ed irregolari quando disperse, più piccole e regolari quando a confluenza. Quando isolate esse tendono a ricercare il contatto mediante la creazione di estroflessioni citoplasmatiche. I nuclei sono grandi, sferoidali, centrali, i nucleoli sempre ben evidenti. Il citoplasma si presenta granulare, ed il numero delle granulazioni tende ad aumentare quando le cellule sono poste in terreno di differenziazione.

Le cellule poste in terreno di differenziamento hanno mostrato a partire dal giorno successivo al cambiamento del terreno, una riduzione delle dimensioni, una regolarizzazione dei margini (cellule più piccole, poligonali e strettamente adiacenti tra loro) ed un aumento delle granulazioni interne.

8.1 Colorazione con Ematossilina ed Eosina. I citoplasmi delle cellule appaiono eosinofili, talora in modo netto ed uniforme, talora in modo più sfumato e granulare. I nuclei presentano invece la classica colorazione blu/viola; sono talora spostati a destra per effetto del processo di centrifugazione.

8.2 Analisi immunoistochimica. La natura epatocitaria della nostra linea cellulare è stata confermata dall'esecuzione dell'immunoistochimica: gli epatociti umani normali si colorano solo con anticorpi rivolti contro citocheratine di basso peso molecolare (CAM 5.2, CK 8) mentre la positività per CEA policlonale mostra una disposizione canalicolare, anch'essa tipica degli epatociti a confluenza. In dettaglio nella Figura 16 sono riportati i dati relativi alla

colorazione con anticorpi anti CAM 5.2, CK 8 e CEA policlonale. La positività appare come una colorazione di colore rossastro identificabile nelle fotografie dei preparati.

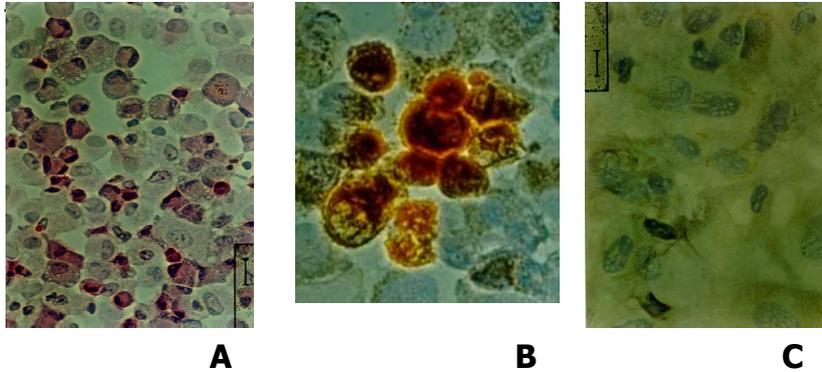


Figura 16. Immunoistochimica delle cellule per CAM 5.2 (A), CK 8 (B) e CEA policlonale (C). Vedi testo per i dettagli

9. Microscopia elettronica

La microscopia elettronica eseguita sulla nostra linea cellulare rivela la presenza di organelli intracellulari tipici degli epatociti umani. In alcuni ingrandimenti è possibile osservare la presenza di estroflessioni della membrana tipo microvilli, localizzate in corrispondenza delle superfici di contatto intercellulari (Figura 17).

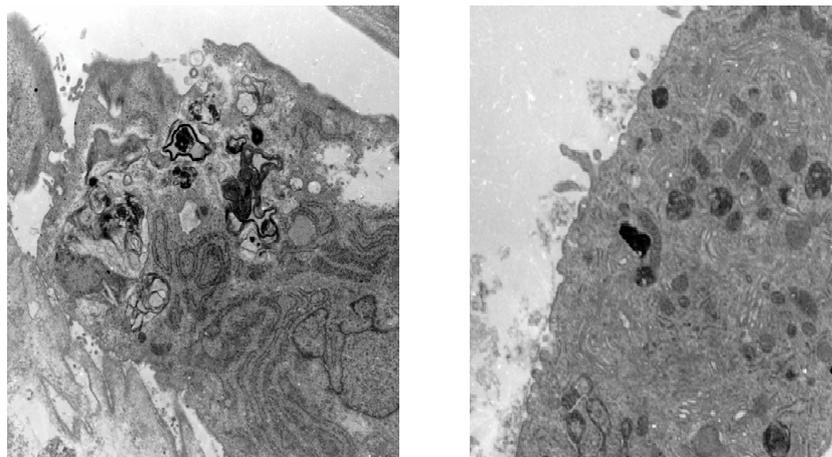


Figura 17. Microscopia elettronica. Le cellule mostrano nuclei con cromatina condensata alla periferia, un ricco RER, l'apparato di Golgi, mitocondri e microvilli.

11. Studio dei cromosomi

La Figura 18 riporta la ricostruzione del cariotipo (cariogramma), con i cromosomi ordinati dalla prima alla 22^a coppia, più la coppia di cromosomi XY. Sono visibili 44 cromosomi più la coppia XY: non si osservano delezioni o riarrangiamenti. Il cariotipo è pertanto definibile normale.

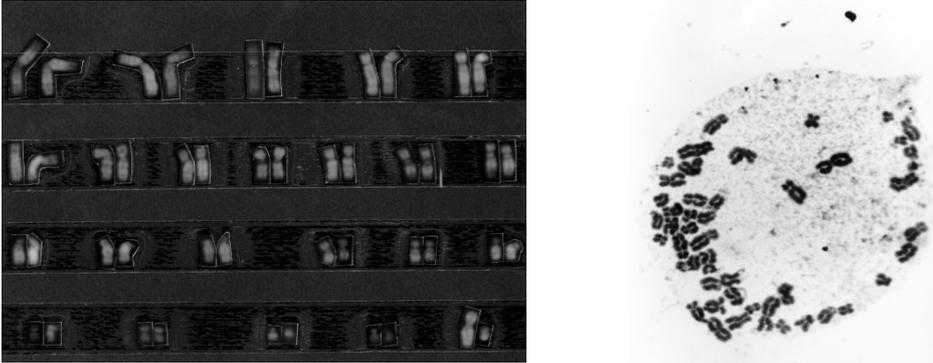


Figura 18. Citogenetica. La maggior parte delle cellule ha un cariotipo normale diploide. Sono anche riscontrabili occasionali cellule diploidi.

PROSPETTIVE FUTURE

- Ci proponiamo di analizzare in Western Blot frazioni cellulari isolate di nuclei e citoplasma delle cellule HepG2 e Huh7 trasfettate, in modo da verificare l'effettiva localizzazione della proteina, anche se questo tipo di esperimento presenta numerose difficoltà legate all'elevata quantità di materiale cellulare necessario.
- Ci proponiamo poi di ripetere gli esperimenti di immunofluorescenza con tecnica confocale, utilizzando marcatori specifici per il reticolo endoplasmatico e/o la membrana nucleare, in modo tale da evitare confondimenti legati all'utilizzo di un'analisi di tipo bidimensionale per visualizzare strutture tridimensionali.
- Ci proponiamo infine di passare dall'utilizzo di linee cellulari trasformate, quali sono le COS-7 e le HepG2, al sistema epatocitario umano normale in fase di sperimentazione, per valutare quali siano gli effetti diretti della proteina core su queste cellule, utilizzando come metodo di trasfezione il sistema dei lentivirus in fase di messa a punto presso il nostro laboratorio.
- Dal momento che in letteratura è riportato che la proteina core inibisce selettivamente a livello post-trascrizionale la proteina nucleare p21/Waf1, sarebbe interessante verificare, sia nelle linee cellulari trasformate che nelle colture cellulari di epatociti: 1) se l'espressione di altre proteine nucleari (per esempio p53 o C-fos) e citoplasmatiche (2'-5' OAS, RNaseL) sia influenzata dal core; 2) quale parte della proteina in questione sia richiesta per l'inibizione di p21/Waf1.

DISCUSSIONE

La diversa espressione della proteina del core nella linea cellulare COS-7, a seconda che la sequenza fosse posta sotto il controllo del promotore virale precoce del Citomegalovirus (scarsa efficienza) o sotto il controllo del promotore virale tardivo dell'Adenovirus (maggiore efficienza) ci ha indotto a considerare due diverse ipotesi: la prima era che vi potesse essere un effetto inibitorio della proteina del core sul promotore del Citomegalovirus, come del resto già proposto in letteratura [94], l'altra prendeva in considerazione il fatto che le COS-7 sono cellule trasformate dal virus SV40, che esprimono quindi l'antigene T grande del virus stesso, e che la trasfezione di queste cellule con un plasmide che porta l'enhancer del virus SV40, potesse portare ad un'amplificazione del processo di trascrizione, che in qualche modo mascherasse l'effetto inibitore del virus sul promotore. Questo fenomeno è stato però escluso dalla trasfezione, con entrambi i promotori, della linea cellulare HepG2 (non trasformata dal virus SV40). In questo caso, infatti, i risultati visualizzati all'immunofluorescenza risultano sovrapponibili ai precedenti. Si è infatti osservata, anche in queste cellule, una differenza di espressione legata all'utilizzo dei due diversi promotori: nel caso del promotore del Citomegalovirus l'efficienza di espressione si è rivelata piuttosto scarsa, mentre questa risultava decisamente più elevata nel caso dell'utilizzo del promotore dell'Adenovirus; in questo modo è stata definitivamente esclusa la possibilità di un fenomeno di autoamplificazione legato alla presenza di una sequenza dell'SV40. I risultati dimostrano che vi è una effettiva inibizione da parte del core sul promotore del Citomegalovirus, anche se non possiamo stabilire se questa inibizione sia data dalla sequenza nucleotidica, o dalla sequenza amminoacidica.

Contemporaneamente, è stato inoltre portato avanti il subclonaggio di una regione più ampia della sequenza virale, posta sotto il controllo del promotore del Citomegalovirus, contenente una parte della regione non tradotta al 5', la sequenza E_1 e una parte della sequenza E_2 . Scopo di questo ulteriore clonaggio era di verificare se la produzione di una parte della poliproteina virale,

in modo che potesse avvenire lo splicing intracellulare, modificasse in qualche modo l'espressione o la localizzazione della proteina core. L'analisi al Western Blot ha evidenziato che la trasfezione delle cellule con i plasmidi recanti le sequenze più lunghe ha portato ad un aumento significativo della quantità di proteina espressa sotto il controllo del promotore del Citomegalovirus -anche se non raggiungeva lo stesso livello del promotore dell'Adenovirus- e ad uno splicing cellulare, con produzione di due forme della proteina (p21 e p19), rispettivamente descritte in letteratura come forma innata e forma matura. In conseguenza di ciò abbiamo supposto che nella regione aggiunta ci fosse un tratto di sequenza in grado di contrastare l'inibizione esercitata dal core sul promotore del Citomegalovirus. Negli esperimenti sono stati utilizzati due frammenti di diversa lunghezza: il primo codificante per le regioni core, E₁ ed E₂ (plasmide p112); il secondo per il tratto core-E₁ (plasmide p113). I risultati ottenuti sono stati in realtà sovrapponibili; infatti non vi era una differenza quantitativamente significativa nell'espressione del core tra i due plasmidi. Questi dati ci hanno portato a pensare che la regione promuovente la trascrizione non fosse a livello delle proteine del pericapside, ma a livello della regione non tradotta al 5' (5' UTR). In questo senso stiamo portando avanti ulteriori subclonaggi della sequenza virale, costituiti da frammenti di diversa lunghezza in parte sovrapponibili della regione UTR 5', volti a verificare quale sia l'estensione minima di questa regione necessaria alla promozione dell'espressione proteica.

L'altro fenomeno messo in evidenza dal Western Blot, come già accennato, riguarda lo splicing cellulare della proteina stessa, evidenziato grazie alla presenza di due bande, di peso molecolare diverso, riconosciute dall'anticorpo specifico per la proteina del core. Queste sembrerebbero corrispondere alle due forme della proteina core p21 e p19. Interessante è notare come questo splicing sia presente solo nelle cellule trasfettate con la forma lunga di proteina, indicando che le sequenze amminoacidiche successive a quella del core siano necessarie per un corretto splicing cellulare della proteina stessa.

Un discorso a parte merita l'analisi della localizzazione cellulare della proteina, osservata in immunofluorescenza. In primo luogo si sono valutate le cellule COS-7 trasfettate con i plasmidi recanti il solo frammento del core. Sia con utilizzo del promotore del Citomegalovirus (plasmide p103), sia con utilizzo del promotore dell'Adenovirus (plasmide p105), l'unica localizzazione osservata è stata vacuolare citoplasmatica, lasciando il nucleo completamente vuoto. Si pensa che questi vacuoli rappresentino la superficie del reticolo endoplasmatico, ove il virus si replica, o delle goccioline lipidiche, come già osservato da diversi autori [120]. Nonostante in letteratura sia stata segnalata una localizzazione nucleare della forma corta della proteina, i dati in nostro possesso non consentono di confermare questa osservazione. Infatti, nonostante abbiamo potuto evidenziare la produzione di una forma corta con il Western Blot, non abbiamo potuto dimostrare alcuna localizzazione nucleare in immunofluorescenza. È peraltro ipotizzabile che tale fenomeno, se pur presente, non sia stato visualizzabile, a causa di un insufficiente livello di espressione proteica o del diverso tipo cellulare. In realtà non esistono dubbi in letteratura per quanto riguarda la localizzazione citoplasmatica della proteina, mentre ancora aperto è il dibattito su una possibile localizzazione nucleare, osservata da alcuni. Secondo diversi autori, la mancata localizzazione nucleare potrebbe essere legata a una soppressione dell'espressione nucleare della proteina, legata alla presenza della forma citoplasmatica, o innata, della proteina stessa. Questa, infatti, quando presente, inibirebbe la traslocazione a livello nucleare di una forma più corta di proteina, detta matura [121].

Per valutare se vi fosse un'influenza del tipo o dell'origine cellulare sulla localizzazione proteica abbiamo poi analizzato in immunofluorescenza sia le cellule COS-7 che le cellule HepG2, trasfettate con il plasmide p112. Solo le cellule di derivazione epatocitaria hanno mostrato la presenza di numerose fini granulazioni nucleari. I risultati da noi ottenuti quindi andrebbero ad avvalorare le teorie che vedono una localizzazione anche nucleare della proteina, peraltro tipo-specifica. Va considerato però che in un precedente lavoro [122] si dimostra come i dati della sola immunofluorescenza vadano considerati con

forte spirito critico. Infatti analizzando la localizzazione cellulare del core in due linee cellulari, una di origine non epatica (ovaio di criceto cinese, CHO) ed una di origine epatica (HepG2) la semplice immunofluorescenza poteva trarre in inganno, facendo ipotizzare una localizzazione nucleare della proteina. Ulteriori analisi in microscopia confocale con doppia colorazione con un marker di membrana nucleare hanno potuto dimostrare che, quella che sembrava una positività nucleare nelle cellule CHO, era in realtà un artefatto d'immagine legato alla visualizzazione bidimensionale di una struttura tridimensionale, quale è la cellula. Alla visione stratificata, infatti, il citoplasma delle cellule ha mostrato numerose invaginazioni nucleari, che alla visione bidimensionale classica assumevano l'aspetto di una localizzazione nucleare. Secondo altri autori il core potrebbe acquisire una localizzazione nucleare o citoplasmatica a seconda del genotipo virale, oltre che delle dimensioni della proteina processata.

In parallelo al clonaggio ed all'espressione della proteina del core in linee cellulari trasformate, il nostro gruppo ha contribuito allo sviluppo di un nuovo sistema cellulare di derivazione epatocitaria, possibile target finale per l'espressione della suddetta proteina virale, e pertanto descritta in questo progetto di ricerca. Tale sistema è stato ottenuto da tessuto umano normale grazie alle caratteristiche del terreno da noi formulato ed alle condizioni di coltura adottate; le cellule sono state denominate Human Normal Hepatocytes (HNH). Dalle colture primarie è stato infatti possibile ottenere colture secondarie, mediante passaggio, ed espandere successivamente la nostra popolazione. Le cellule si sono dimostrate in grado di crescere continuamente per oltre sei mesi, mantenendo la capacità di rallentare la propria replicazione sino alla quiescenza quando piastrate con un terreno di diversa composizione. L'albumina, una delle principali proteine di sintesi epatica, viene secreta e risulta dosabile nel mezzo di coltura con tecnica nefelometrica. L'analisi dell'mRNA eseguito mediante PCR ha dimostrato come risultino presenti i trascritti di una serie di proteine di sintesi epatica quali albumina, eritropoietina, fattore IX della coagulazione, transferrina; non si è invece riscontrata evidenza di espressione di α FP. Questi dati suggeriscono

pertanto che le cellule si mantengano differenziate anche dopo lungo tempo in coltura e che risultino fenotipicamente epatociti.

Due dati meritano una più approfondita discussione: la positività della ricerca dell'eritropietina e la negatività dell' α FP. La prima, come precedentemente ricordato, risulta abitualmente espressa in condizioni cliniche e sperimentali di rigenerazione epatica: essa non è classicamente prodotta dagli epatociti maturi quiescenti, ma non è sorprendente pertanto che sia espressa da cellule in corso di attiva replicazione. L' α FP è invece un'oncoproteina fetale, espressa dagli epatoblasti, dagli epatociti immaturi e da linee cellulari di epatoma. Secondo alcuni autori l'espressione di tale proteina correlerebbe con lo stato di differenziazione cellulare. Nel nostro caso, il riscontro dell'assenza dei trascritti per l' α FP confermerebbe l'assunto di trovarsi di fronte a epatociti maturi, che sotto opportuni stimoli sono risultate in grado di andare incontro a replicazione senza peraltro regredire ad una condizione "fetale" di totipotenza e dedifferenziazione. L'ibridizzazione in situ per l'albumina ha confermato la presenza di mRNA codificanti per l'albumina a livello citoplasmatico delle cellule in attiva replica in quantità pari a quella riscontrata nelle le Hep-G2 ma inferiore a sezioni di tessuto epatico umano. Morfologicamente tali cellule mantengono caratteristiche proprie degli epatociti: la colorazione con ematossilina ed eosina evidenzia la presenza di nuclei grandi, livementi eccentrici in presenza di un citoplasma fortemente basofilo. La caratterizzazione immunoistochimica, che risulta positiva per CAM-5.2 e citocheratina 8, supporta ulteriormente la loro natura escludendone l'origine da cellule dei dotti biliari. L'analisi eseguita per il CEA su cellule fatte crescere fino a confluenza su vetrini portaoggetto ha identificati una disposizione canalicolare dell'antigene che è una caratteristica peculiare dei soli epatociti. La microscopia elettronica evidenzia un'architettura cellulare caratteristica: nucleo grande, leggermante periferico, apparato di Golgi abbondantemente sviluppato così come il reticolo endoplasmatico, numerosi mitocondri. Strutture microvillari suggestive di formazione canalicolare sono visibili in alcuni preparati. Tuttavia, l'elemento a nostro avviso più rilevante di tale coltura è data dalla sua integrità genomica anche dopo lungo tempo in

coltura; questo ci consente infatti di ipotizzare che tali cellule sono in grado di esprimere fenotipicamente la totalità delle loro funzioni se portate all'appropriate grado di differenziazione ed interazione. Il sistema colturale da noi sviluppato si discosta da quelli precedentemente utilizzati fondamentalmente per la sua semplicità: non vi è stato infatti il ricorso a cocoltura, a immortalizzazione mediante transfezione con oncogeni, né a complesse interazioni cellula-matrice quali quelle che prevedono l'utilizzo del collagene gel sandwich o del matrigel [105]. Pertanto l'elemento determinante per la crescita ed il mantenimento delle caratteristiche di differenziazione della nostra linea è da attribuirsi alle caratteristiche del terreno di crescita da noi formulato. La possibilità poi di modulare la replicazione e la differenziazione cellulare mediante l'uso del terreno di differenziazione costituisce un'altro prezioso vantaggio rendendo disponibile un modello in vitro sia di rigenerazione che di studio delle funzioni dell'epatocita maturo. La filosofia che sta alla base del disegno dei terreni è fondamentalmente il ricorso a basse concentrazioni di calcio, magnesio e siero fetale, più opportune stimolazioni ormonali (estratti di ipotalamo ed ipofisi, 5H). I vantaggi offerti da tale "disegno" sono infatti quella di scoraggiare crescita di tipi cellulari differenti che hanno requisiti metabolici diversi (per esempio fibroblasti che non sopravvivono in presenza di basse concentrazioni di calcio), di impedire altresì alle cellule di formare complesse interazioni cellulari tramite giunzioni calcio-dipendenti, mantenendo pertanto la cellula spostata verso una condizione proliferativa, limitandone però la differenziazione. Per contro, il terreno di differenziazione (ottenuto eliminando il siero, gli estratti ed aumentando le concentrazioni degli elettroliti) è stato studiato per consentire agli epatociti di instaurare interazioni complesse, con interscambio di segnali e molecole. Ciò permette alle cellule di giungere alla sintesi di fattori di crescita autocrini, con sostentamento reciproco per lungo tempo in un terreno "povero" da un punto di vista nutrizionale.

Tra i molteplici possibili futuri indirizzi di ricerca di tale sistema cellulare vi sono lo studio della differenziazione cellulare in diverse condizioni di coltura, l'utilizzo di tali cellule per il supporto bioartificiale del fegato o per il trapianto

epatocitario e, appunto, lo studio dell'infettabilità in vitro con virus epatotropi umani. Non esistono, al momento attuale, sistemi di coltura in vitro di virus epatotropi umani: benché brillantemente pubblicati, i risultati relativi all'infettabilità da parte del virus dell'epatite B sia nelle cellule Hep-G2 [102] che nelle colture primarie di epatociti dopo trattamento con dimetil solfossido [107] non sono risultati ripetibili. Anche per quanto concerne il virus dell'epatite C vi è un unico studio ad oggi pubblicato, nel quale si afferma di aver ottenuto la replicazione a lungo termine di tale virus in epatociti fetali umani [108]. Le applicazioni di un efficace modello di replicazione virale in vitro sarebbero numerose, oltre a quelle più immediate per quanto riguarda il presente progetto (vale a dire, verifica dello splicing della proteina del core HCV, individuazione della localizzazione cellulare delle forme espresse, studio degli effetti dell'espressione della proteina sulla trascrizione ed espressione di diverse proteine cellulari): studi sulla penetrazione dei virus all'interno degli epatociti, dal momento che non è stato ancora identificato con certezza un recettore specifico, benché si ipotizzi un ruolo del recettore delle LDL; messa a punto di nuove terapie antivirali.

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. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25:1527-38.
3. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39:5-19.
4. Major ME, Rehermann B, Feinstone SM. Hepatitis C Viruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
5. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003; 362:2095-100.
6. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26:62S-65S.
7. Leigh JP, Bowlus CL, Leistikow BN, Schenker M. Costs of hepatitis C. *Arch Intern Med* 2001; 161:2231-7.
8. Pirisi M, Toniutto P, Fabris C, et al. Factors associated with serum HCV RNA positivity in anti-HCV antibody positive intravenous drug users. *J Clin Epidemiol* 1998; 51:423-7.
9. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty MC, Nelson KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Public Health* 1996; 86:655-61.
10. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996; 334:1685-90.
11. Schuttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems WR, Gerlich WH, Schaefer S. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. *Lancet* 2000; 355:41-2.
12. Sartori M, La Terra G, Aglietta M, Manzin A, Navino C, Verzetti G. Transmission of hepatitis C via blood splash into conjunctiva. *Scand J Infect Dis* 1993; 25:270-1.
13. Lissen E, Alter HJ, Abad MA, et al. Hepatitis C virus infection among sexually promiscuous groups and the heterosexual partners of hepatitis C virus infected index cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:827-31.
14. Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, et al. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 1995; 21:639-44.
15. Gonzalez-Peralta RP, Qian K, She JY, et al. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1996; 49:242-7.

16. Kaplan M, Gawrieh S, Cotler SJ, Jensen DM. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection: a review of immunological and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003; 125:597-604.
17. Bertolotti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 2003; 38:4-13.
18. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004; 12:96-102.
19. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Epatite cronica. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson J, J.L., eds. *Harrison - Principi di Medicina Interna*. Vol. 2. Milano: McGraw-Hill, 2002.
20. Heintges T, Wands JR. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology* 1997; 26:521-6.
21. Seeff LB, Buskell-Bales Z, Wright EC, et al. 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.
22. Foster GR, Goldin RD, Thomas HC. Chronic hepatitis C virus infection causes a significant reduction in quality of life in the absence of cirrhosis. *Hepatology* 1998; 27:209-12.
23. Shakil AO, Conry-Cantilena C, Alter HJ, et al. Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic, and histologic features. The Hepatitis C Study Group. *Ann Intern Med* 1995; 123:330-7.
24. Pirisi M, Scott C, Fabris C, et al. Mild sialoadenitis: a common finding in patients with hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29:940-2.
25. Scott CA, Avellini C, Desinan L, et al. Chronic lymphocytic sialoadenitis in HCV-related chronic liver disease: comparison of Sjogren's syndrome. *Histopathology* 1997; 30:41-8.
26. El-Serag HB, Kunik M, Richardson P, Rabeneck L. Psychiatric disorders among veterans with hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2002; 123:476-82.
27. Castera L, Pawlotsky JM, Dhumeaux D. Worsening of steatosis and fibrosis progression in hepatitis C. *Gut* 2003; 52:1531.
28. Lechmann M, Woitas RP, Langhans B, et al. Decreased frequency of HCV core-specific peripheral blood mononuclear cells with type 1 cytokine secretion in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31:971-8.
29. Lee CH, Choi YH, Yang SH, Lee CW, Ha SJ, Sung YC. Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages. *Virology* 2001; 279:271-9.
30. Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002; 155:323-31.
31. Ratziu V, Trabut JB, Poynard T. Fat, diabetes, and liver injury in chronic hepatitis C. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6:22-9.

32. FriedenberG F, Pungpapong S, Zaeri N, Braitman LE. The impact of diabetes and obesity on liver histology in patients with hepatitis C. *Diabetes Obes Metab* 2003; 5:150-5.
33. 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.
34. Bruno S, Silini E, Crosignani A, et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 1997; 25:754-8.
35. Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, et al. Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 1995; 346:1051-5.
36. Papatheodoridis GV, Papadimitropoulos VC, Hadziyannis SJ. Effect of interferon therapy on the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis: a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:689-98.
37. El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2001; 5:87-107, vi.
38. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002; 36:S74-83.
39. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19:1321-4.
40. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19:13-8.
41. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 1993; 67:3338-44.
42. Reynolds JE, Kaminski A, Carroll AR, Clarke BE, Rowlands DJ, Jackson RJ. Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *Rna* 1996; 2:867-78.
43. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, et al. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998; 72:6048-55.
44. Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, Lai MM, Ou JH. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 1995; 213:455-61.
45. Hope RG, McLauchlan J. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* 2000; 81:1913-25.
46. Majeau N, Gagne V, Boivin A, et al. The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. *J Gen Virol* 2004; 85:971-81.

47. Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, Watowich SJ. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2001; 75:2119-29.
48. Lai MM, Ware CF. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 242:117-34.
49. Ferlenghi I, Clarke M, Ruttan T, et al. Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Mol Cell* 2001; 7:593-602.
50. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002; 108:717-25.
51. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:10583-7.
52. Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, et al. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993; 67:4665-75.
53. Love RA, Parge HE, Wickersham JA, et al. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 1996; 87:331-42.
54. Yan Y, Li Y, Munshi S, et al. Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci* 1998; 7:837-47.
55. Kwong AD, Kim JL, Lin C. Structure and function of hepatitis C virus NS3 helicase. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 242:171-96.
56. Cho HS, Ha NC, Kang LW, et al. Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus. A feasible mechanism of unwinding duplex RNA. *J Biol Chem* 1998; 273:15045-52.
57. Heilek GM, Peterson MG. A point mutation abolishes the helicase but not the nucleoside triphosphatase activity of hepatitis C virus NS3 protein. *J Virol* 1997; 71:6264-6.
58. Lin C, Thomson JA, Rice CM. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J Virol* 1995; 69:4373-80.
59. Hugle T, Fehrman F, Bieck E, et al. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 2001; 284:70-81.
60. Reed KE, Rice CM. Identification of the major phosphorylation site of the hepatitis C virus H strain NS5A protein as serine 2321. *J Biol Chem* 1999; 274:28011-8.
61. Gale M, Jr., Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999; 73:6506-16.

62. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* 1989; 8:3867-74.
63. Qin W, Luo H, Nomura T, Hayashi N, Yamashita T, Murakami S. Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 2002; 277:2132-7.
64. Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* 1983; 41:816-21.
65. He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* 1987; 156:636-40.
66. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996; 23:205-9.
67. Petracca R, Falugi F, Galli G, et al. Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol* 2000; 74:4824-30.
68. Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:7270-4.
69. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2:533-43.
70. Mackenzie JM, Westaway EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* 2001; 75:10787-99.
71. Jordan R, Nikolaeva OV, Wang L, et al. Inhibition of host ER glucosidase activity prevents Golgi processing of virion-associated bovine viral diarrhea virus E2 glycoproteins and reduces infectivity of secreted virions. *Virology* 2002; 295:10-9.
72. McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000; 7:2-14.
73. Lo SY, Selby MJ, Ou JH. Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol* 1996; 70:5177-82.
74. Cristofari G, Ivanyi-Nagy R, Gabus C, et al. The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:2623-31.
75. Zhao WD, Wimmer E, Lahser FC. Poliovirus/Hepatitis C virus (internal ribosomal entry site-core) chimeric viruses: improved growth properties through modification of a proteolytic cleavage site and requirement for core RNA sequences but not for core-related polypeptides. *J Virol* 1999; 73:1546-54.
76. Kim YK, Lee SH, Kim CS, Seol SK, Jang SK. Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding

- sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *Rna* 2003; 9:599-606.
77. Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997; 71:9417-26.
 78. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, et al. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998; 72:3691-7.
 79. Tai DI, Tsai SL, Chen YM, et al. Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2000; 31:656-64.
 80. Zhu N, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology* 2001; 283:178-87.
 81. Hsieh TY, Matsumoto M, Chou HC, et al. Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J Biol Chem* 1998; 273:17651-9.
 82. You LR, Chen CM, Yeh TS, et al. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999; 73:2841-53.
 83. Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000; 74:1736-41.
 84. Ray RB, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996; 226:176-82.
 85. Honda M, Kaneko S, Shimazaki T, et al. Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *Hepatology* 2000; 31:1351-9.
 86. Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 202:149-56.
 87. Ruggieri A, Murdolo M, Harada T, Miyamura T, Rapicetta M. Cell cycle perturbation in a human hepatoblastoma cell line constitutively expressing Hepatitis C virus core protein. *Arch Virol* 2004; 149:61-74.
 88. Ruggieri A, Harada T, Matsuura Y, Miyamura T. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1997; 229:68-76.
 89. Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998; 273:2256-9.
 90. Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* 1999; 73:4713-20.
 91. 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; 23:2472-83.

92. Kao CF, Chen SY, Lee YH. Activation of RNA polymerase I transcription by hepatitis C virus core protein. *J Biomed Sci* 2004; 11:72-94.
93. Ray RB, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes. *Virology* 2000; 271:197-204.
94. Koike K, Moriya K, Kimura S. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:394-400.
95. Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K, et al. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis. *J Med Virol* 1999; 59:141-5.
96. Rappaport AM. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr. Path.* 1976; 157:215.
97. Fried W, Barone J, Schade S, Anagnostu A. Effects of carbon tetrachloride on extrarenal erythropoietin production in rats. *J Lab Clin Med.* 1979; 93:700-5.
98. Fried W. The liver as a source production extrarenal erythropoietin production and function. *Blood* 1972; 40: 671-677.
99. Pirisi M, Fabris C, Soardo G, Falletti E, Gasparini D, Vitulli D, Toniutto P, Gonano F, Bartoli E. Hepatic release of erythropoietin induced by transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995; 22:148-52.
100. Sigal SH, Brill S, Fiorino AS, Reid LM. The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol* 1992; 263:G139-48.
101. Guillonzo A, Morel F, Langouet S, Maheo K, Rissel M. Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds". *J Hepatol* 1997; 26: 73-80.
102. Bchini R, Capel F, Dauguet C, Dubanchet S, Petit M-A. In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. *J Virol* 1990; 64:3025-32.
103. Roberts EA, Letarte M, Squire J, Yang S. Characterization of human hepatocytes lines derived from normal liver tissue. *Hepatology* 1994;19:1390-1399.
104. Macé K, Aguilar F, Wang JS, Vautravers P, Gómez-Lechón M, Gonzalez FJ, Groopman J, Harris CC, Pfeifer AM. Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 1997; 18:1291-7.
105. Kono Y, Yang S, Letarte M, Roberts EA. Establishment of a human hepatocyte line derived from primary culture in a collagen gel sandwich culture system. *Exp Cell Research* 1995; 221:478-485.
106. Zu Putlitz J, Roberts EA, Wieland S, Kono Y, Blum HE. Hepatitis B virus replication and viral antigen synthesis in hepatocyte lines derived from normal human liver. *Virus Research* 52 1997; 52:177-182.
107. Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, Guguen-Guillonzo C. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* 1988; 62:4136-4143.

108. Iacovacci S, Manzin A, Barca S, Sargiacomo M, Serafino A, Valli B, Macioce G, Hassan HJ, Ponzetto A, Clementi M, Peschle C, Carloni G. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology* 1997; 26:1328-1337.
- 110 Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD. Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:5860-5864.
- 111 Nakamura J, Okamoto T, Schumacher IK, Tabei I, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Fox IJ. Treatment of surgically induced acute liver failure by transplantation of conditionally immortalized hepatocytes. *Transplantation* 1997; 63:1541-1547.
- 112 Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of Diseased Mouse Liver by Hepatic Cell Transplantation. *Science* 1994; 253:1149-1152.
- 113 Ponder Parker C, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, Ledley FD, Chowdhury JR, Woo SLC. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:1217-1221.
114. Okamura A, Zheng YW, Hirochika R, Tanaka J, Taniguchi H. In-vitro reconstitution of hepatic tissue architectures with neonatal mouse liver cells using three-dimensional culture. *J Nanosci Nanotechnol* 2007; 7:721-5.
115. Du Y, Han R, Wen F, Ng San San S, Xia L, Wohland T, Leo HL, Yu H. Synthetic sandwich culture of 3D hepatocyte monolayer. *Biomaterials* 2008; 29:290-301.
116. Follenzi A, Naldini L. Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods Enzymol.* 2002; 346:454-65.
117. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998; 72:8463-71.
118. Fässler R. Lentiviral transgene vectors. *EMBO Rep.* 2004; 5:28-9.
119. Cronin J, Zhang XY, Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther.* 2005; 5:387-98.
120. McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Embo J* 2002; 21:3980-8.
121. Yamanaka T, Uchida M, Doi T. Innate form of HCV core protein plays an important role in the localization and the function of HCV core protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294:521-7.
122. Barba G, Harper F, Harada T, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:1200-5.