

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Mediche



DOTTORATO DI RICERCA IN “MEDICINA MOLECOLARE”

XXII° CICLO

TESI DI DOTTORATO

CARATTERIZZAZIONE CLINICA E MOLECOLARE DEGLI AUTO-  
ANTICORPI ANTI-CITOCROMO P4502E1 (CYP2E1) ASSOCIATI  
ALL'EPATITE CRONICA C

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Umberto Dianzani

Tutor: Chiar.mo Prof. Emanuele Albano

Candidato: Salvatore Sutti

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

## INDICE

RIASSUNTO.....	pag.4
PUBBLICAZIONI.....	pag.5
INTRODUZIONE.....	pag.6
Il virus dell'epatite C.....	pag.6
L'epatite cronica C.....	pag.7
Meccanismi alla base del danno epatico indotto da HCV.....	pag.14
Danno epatico mediato da effetti citopatici diretti.....	pag.15
Danno epatico immuno-mediato.....	pag.20
Autoimmunità ed infezione cronica C.....	pag.27
Manifestazioni extraepatiche in corso di epatite cronica C.....	pag.28
Epatite cronica C ed auto-anticorpi non organo specifici (NOSA).....	pag.29
Autoreattività anti-citocromi P450.....	pag.31
Autoanticorpi anti-LKM1.....	pag.35
Autoanticorpi anti-citocromo P450 2E1.....	pag.38
MATERIALI E METODI.....	pag.41
Reclutamento di pazienti e controlli.....	pag.41
Misurazione degli autoanticorpi anti-CYP2E1 con saggio immunoenzimatico in fase solida.....	pag.42
Induzione dell'espressione del citocromo P450 isoforma 2E1.....	pag.43
Isolamento degli epatociti.....	pag.43
Valutazione della capacità di sieri HCV di riconoscere il CYP2E1 espresso sulla membrana degli epatociti in citofluorimetria a flusso.....	pag.44
Preparazione di CYP2E1 ricombinante umano wild-type e isoforme mutate mediante espressione in <i>E. Coli</i> .....	pag.44
Purificazione e misurazione di CYP2E1 wild-type umano.....	pag.46

Valutazione dell'autoreattività anti-CYP2E1 tramite western blot ed immunoprecipitazione.....	pag.47
Allineamento delle sequenze aminoacidiche e generazione di un modello molecolare di CYP2E1.....	pag.48
Analisi di potenziali cross-reazioni tra CYP2E1 e proteine di HCV.....	pag.49
Clonaggio dei peptidi 438-449 e 456-465 della RNA-polimerasi RNA-dipendente (NS5B) di HCV omologa al CYP2E1 umano.....	pag.49
Espressione e purificazioni delle proteine di fusione GST-NS5B <sub>438-449</sub> e GST-NS5B <sub>456-465</sub> .....	pag.51
Valutazione della cross-reattività tra i peptidi virali NS5B <sub>438-449</sub> e NS5B <sub>456-465</sub> e gli autoanticorpi anti-CYP2E1 mediante ELISA e saggi di competizione.....	pag.52
Induzione della perdita della tolleranza verso il CYP2E1 nel topo mediante immunizzazione con i peptidi virali NS5B <sub>438-449</sub> e NS5B <sub>456-465</sub> .....	pag.52
Analisi dei dati e statistica.....	pag.53
SCOPO DEL LAVORO.....	pag.54
RISULTATI.....	pag.55
Autoanticorpi anti-CYP2E1: prevalenza, specificità antigenica e contributo patogenetico alla progressione della patologia epatica in corso di CHC.....	pag.55
Caratterizzazione della specificità antigenica degli auto-anticorpi anti-CYP2E1: identificazione di epitopi maggiori.....	pag.63
Prevalenza e significato clinico degli autoanticorpi anti-CYP2E1 in pazienti CHC sottoposti a trapianto epatico ortotopico (OLT).....	pag.67
Fenomeno del mimetismo molecolare tra RNA polimerasi RNA dipendente di HCV (NS5B) ed il citocromo P4502E1 alla base dello sviluppo di auto-reattività anti-CYP2E1.....	pag.70
Induzione della perdita della tolleranza verso il CYP2E1 nel topo mediante immunizzazione con i peptidi virali NS5B <sub>438-449</sub> e NS5B <sub>456-465</sub> .....	pag.75
DISCUSSIONE.....	pag.76
BIBLIOGRAFIA.....	pag.85

## RIASSUNTO

Il presente lavoro ha indagato, in una ampia coorte di soggetti con CHC, la prevalenza, il significato clinico come pure la specificità antigenica e l'origine degli auto-anticorpi anti-CYP2E1. In particolare, nei 137 pazienti oggetto del presente studio sono state riscontrate IgG anti-CYP2E1 nel 38% (52/137) dei soggetti. Tuttavia, è emerso che il 44% (23/52) dei sieri positivi perde la propria reattività verso il CYP2E1 in condizioni denaturanti e riducenti (western blotting) indicando nello specifico un preferenziale riconoscimento di antigeni conformazionali e suggerendo per questi auto-anticorpi l'esistenza di una diversa specificità antigenica. Sebbene tra i pazienti non ci siano differenze peculiari sia da un punto di vista clinico che biochimico tuttavia, all'esame istologico i soggetti con immunoglobuline dirette preferenzialmente verso epitopi conformazionali presentano a livello delle biopsie epatiche un grado di necro-infiammazione e di fibrosi significativamente superiore rispetto agli altri pazienti. Inoltre, è stato evidenziato come le IgG anti-CYP2E1 conformazionali siano in grado di riconoscere il CYP2E1 espresso sulla membrana plasmatica degli epatociti suggerendo il loro potenziale coinvolgimento in fenomeni di citotossicità anticorpo-dipendente. Per di più abbiamo dimostrato come le IgG anti-CYP2E1 conformazionali riconoscano un epitopo derivante dalla giustapposizione delle eliche J e J', localizzato sulla superficie molecolare del CYP2E1 e ben accessibile per il legame da parte degli autoanticorpi. L'allineamento di sequenza tra il CYP2E1 e la poliproteina di HCV ha altresì mostrato l'esistenza di una buona omologia di sequenza e strutturale tra i peptidi CYP2E1<sub>324-334</sub>, CYP2E1<sub>335-346</sub> e, rispettivamente, NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub> appartenenti alla RNA polimerasi RNA dipendente di HCV NS5B. Nello specifico, le IgG anti-CYP2E1 sono in grado di cross-reagire con i peptidi virali NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub>, i quali a loro volta

competono con il CYP2E1 per il legame alle suddette immunoglobuline. Infine, esperimenti di immunizzazione con i peptidi virali NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub> hanno messo in evidenza la capacità di questi ultimi di indurre la perdita della tolleranza verso il CYP2E1 ricombinante umano. Concludendo, questi risultati mostrano che l'auto-reattività anti-CYP2E1 non costituisce esclusivamente un epifenomeno ma è coinvolta nella patogenesi e progressione della lesione epatica in corso di CHC. Inoltre abbiamo dimostrato come è possibile individuare, sulla base della specificità antigenica, un sottogruppo di pazienti a maggior rischio di progressione della patologia epatica nella CHC. Infine, questi dati suggeriscono che l'origine degli auto-anticorpi anti-CYP2E1 nell'epatite cronica C sia da ricercare in fenomeni di mimetismo molecolare con la proteina del virus C NS5B.

## PUBBLICAZIONI

Albano E., Maina V., **Sutti S.**, Vidali M. New insights in the role of oxidative stress in the adverse effects of alcohol in the liver. Annual Meeting of the Society for Free Radical Research-Europe. Rome, Italy, 26-29 August, 2009 (ISBN 978 88 7587 515 2).

Rigamonti C, Vidali M, Donato MF, **Sutti S**, Occhino G, Ivaldi A, Arosio E, Agnelli F, Rossi G, Colombo M, Albano E. Serum autoantibodies against cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) predict severity of necroinflammation of recurrent hepatitis C. *Am J Transplant* 9(3): 601-9, 2009.

Vidali M, Tripodi MF, Ivaldi A, Zampino R, Occhino G, Restivo L, **Sutti S**, Marrone A, Ruggiero G, Albano E, Adinolfi LE. Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 48(3):399-406, 2008.

Vidali M, Hietala J, Occhino G, Ivaldi A, **Sutti S**, Niemelä O, Albano E. Immune responses against oxidative stress-derived antigens are associated with increased circulating tumor necrosis factor-alpha in heavy drinkers. *Free Radic Biol Med.* 45(3):306-11, 2008.

## INTRODUZIONE

### **IL VIRUS DELL'EPATITE C**

Il virus dell'epatite C (HCV), il cui genoma è stato clonato per la prima volta nel 1989 (Choo et al. 1989), è l'agente eziologico responsabile di molti casi di epatite un tempo definita non-A e non-B (NANBH). Già a partire dagli inizi degli anni '50 emersero indizi a sostegno dell'esistenza di un terzo tipo di epatite virale, ma solo nel 1975, con l'avvento di saggi sierologici per il virus dell'epatite A e B (HAV e HBV), e con la scoperta di numerosi casi di epatite, associata a trasfusione, che non mostravano marcatori sierologici né dell'uno né dell'altro virus che è stato possibile identificare il nuovo agente infettivo (Alter et al. 1975; Feinstone et al. 1975).

HCV appartiene alla famiglia dei *Flaviviridae*, è un virus a RNA singolo filamento, è dotato di envelope ed il genoma misura circa 9.6 Kb. HCV non presenta, nel suo ciclo replicativo, un intermedio a DNA, quindi le sequenze virali non possono essere integrate nel genoma dell'ospite. Il virus C mostra tropismo sia per gli epatociti che per i linfociti, in particolare, il linfotropismo rappresenta un importante step nella patogenesi dei disordini immunologici che sono correlati all'infezione virale (Zignego et al. 1992).

HCV è stato classificato, sulla base della sequenza nucleotidica, in sei genotipi maggiori e più di 50 sottotipi (Robertson et al. 1998).

In particolare, il genoma del virus C codifica per una poliproteina costituita da più di 3000 aminoacidi, la quale è successivamente processata a livello del reticolo endoplasmico sia da proteasi virali che cellulari per generare 10 polipeptidi, tra questi alcuni sono proteine strutturali (core, E1 e E2) ed altri invece proteine non strutturali (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Lindenbach et al. 2005; Penin et al. 2004). Tra le suddette proteine talune sono implicate nella replicazione della

particella virale, come ad esempio NS3-4A, enzima responsabile del taglio proteolitico a valle di NS3, tale processo genera le molecole che a loro volta costituiscono il complesso di replicazione dell'RNA virale (Lindenbach et al. 2005), in particolare NS5B rappresenta l'RNA polimerasi RNA-dipendente, ossia l'enzima deputato alla sintesi del genoma virale (Bartenschlager et al. 2004). Tra le rimanenti possiamo ancora menzionare la glicoproteina 2 dell'envelope (E2), la quale media l'infezione dei diversi citotipi, contribuendo in ultima analisi alla patogenesi della lesione epatica (Wack et al. 2001; Rosa et al. 2005; Mazzocca et al. 2005).

## **L'EPATITE CRONICA C**

### **Epidemiologia**

Il virus dell'epatite C rappresenta in molti paesi la causa principale di patologia epatica cronica, di cirrosi e carcinoma epatocellulare (HCC), come pure la più comune indicazione per il trapianto epatico (Wasley et al. 2000; Alter et al. 1997; Charlton et al. 2001).

Si stima che approssimativamente il 3% della popolazione mondiale, circa 170 milioni di persone, siano cronicamente infette da HCV. La prevalenza dell'epatite cronica C (CHC) oscilla tra lo 0.1% ed il 5% (Alter et al. 1995; Trépo et al. 1999; Naoumov et al. 1999), ed è stato stimato che ci siano circa 4 milioni di portatori cronici di HCV negli Stati Uniti e 5 milioni nell'Europa Occidentale. Inoltre, è stata riscontrata una prevalenza maggiore di CHC nell'Europa dell'Est rispetto a quella dell'Ovest (Naoumov et al. 1999).

Nei Paesi industrializzati, HCV è responsabile del 20% dei casi di epatite acuta e del 70% di epatite cronica (Hoofnagle et al. 1997; Marcellin et al. 1999), del 40% di cirrosi, del 60% dei casi di HCC (Di Bisceglie et al. 1997; Colombo et al. 1999).

E' stato stimato che l'incidenza delle nuove infezioni sintomatiche sia annualmente 1-3 casi\1000000 abitanti, anche se ci sono buone ragioni di credere che sia in realtà molto più alta, dato l'elevato numero di casi che decorrono in maniera clinicamente silente (Alter et al. 1997).

La mortalità HCV-correlata, legata all'insorgenza di complicanze che si sviluppano quando l'epatopatia si è evoluta in cirrosi, è duplicata dal 1990 ad oggi (Wise et al. 2008) ed è attesa aumentare nuovamente nella prossima decade (Davis et al. 2003).

### **Storia naturale dell'infezione da HCV**

L'infezione da HCV non presenta un decorso clinico o una storia naturale caratteristici, ma piuttosto un ampio spettro di lesioni epatiche, quadri clinici e prognosi estremamente eterogenei (Figura 1). Dei soggetti infettati solo una minima parte guarisce spontaneamente (15-25%), mentre in circa il 75-85% dei casi si assiste alla persistenza della viremia ed al successivo sviluppo di epatite cronica, anch'essa spesso clinicamente silente (Alberti et al. 1992; Mattsson et al. 1993; Barrera et al. 1995). Caratteristica dell'infezione da HCV è infatti la tendenza alla cronicizzazione, legata principalmente alla capacità del virus di sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite (Houghton et al. 1991; Weiner et al. 1992). L'alta percentuale di cronicizzazione dell'infezione e la presentazione clinica spesso asintomatica spiegano la presenza di un grosso reservoir di soggetti infettati.

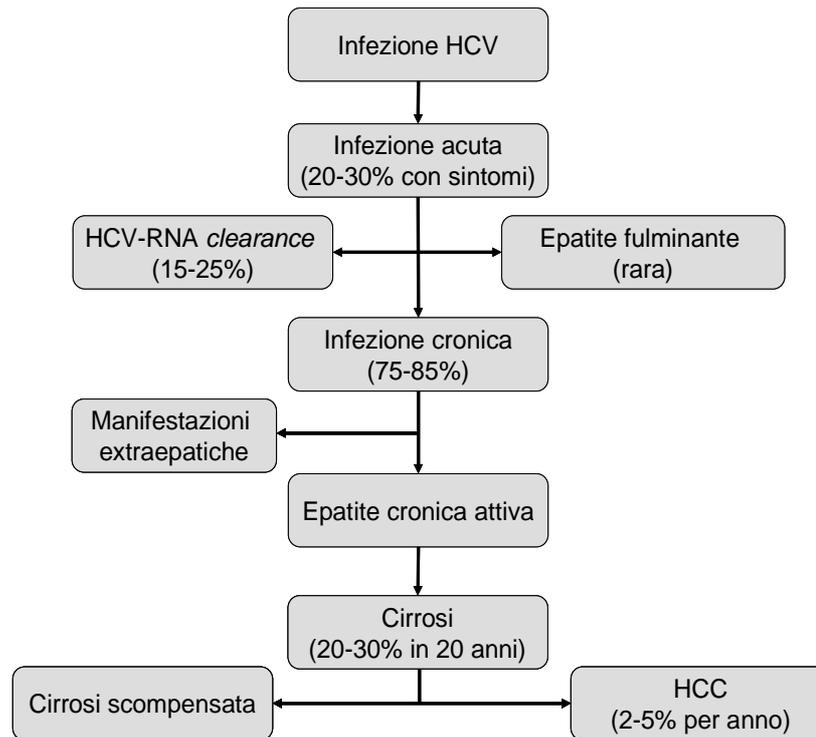


Figura 1: Storia naturale dell'infezione da HCV (adattata da Chen e Morgan 2006)

Sebbene la maggior parte dei pazienti con l'infezione acuta sviluppi l'epatite cronica, la severità della malattia epatica può variare notevolmente. La più importante complicanza dell'epatite cronica C è lo sviluppo di cirrosi, che può insorgere rapidamente, dopo 1-2 anni dall'infezione, o lentamente, entro le prime 2 decadi. A questo proposito, studi di follow-up della durata di 10-20 anni hanno rilevato che in questo arco di tempo la cirrosi interessa il 20-30% dei pazienti (Seeff et al. 1992; Di Bisceglie et al. 1991; Yano et al. 1996; Takahashi et al. 1993). La cirrosi può decorrere asintomatica per molti anni, diagnosticata tardivamente alla biopsia epatica o a seguito di complicanze (varici esofagee e ascite). In molti casi la diagnosi di cirrosi è fatta allo stadio di carcinoma epatocellulare. Infatti il carcinoma interessa raramente i pazienti con epatite cronica senza cirrosi, mentre si presenta nei cirrotici con una incidenza annua del 3-10% (Colombo et al. 1999; Marcellin et al. 1999). Alla comparsa di complicanze maggiori il paziente è da considerare in stadio terminale di malattia. La mortalità nei pazienti cirrotici, dovuta principalmente a ipertensione

portale, insufficienza epatica o carcinoma epatocellulare, è del 2-5% per anno (Fattovich et al. 1997). La malattia epatica terminale rappresenta la maggiore indicazione al trapianto epatico. Secondo recenti indagini dello United Network for Organ Sharing Registry, l'epatite C è responsabile del 21% dei trapianti di fegato effettuati in pazienti adulti tra il 1987 e il 1995. Negli ultimi anni la percentuale dei trapianti dovuti a malattia epatica terminale da HCV è ulteriormente aumentata (30%), rappresentando attualmente la principale indicazione al trapianto epatico (Charlton et al. 1998).

### **Fattori di rischio per lo sviluppo di infezione cronica C**

Circa il 75-85%, dei soggetti, infetti da HCV, evolve verso l'epatite cronica, condizione caratterizzata dalla persistenza della viremia a 6 mesi dall'inizio dell'infezione acuta. Il tasso di infezioni croniche C è influenzato da numerosi fattori tra cui l'età al momento dell'infezione, il sesso, gruppo etnico di appartenenza e lo sviluppo di ittero durante l'infezione acuta (Tabella 1).

<b>FATTORI DI RISCHIO</b>
Età al momento dell'infezione > 25 anni
Sesso maschile
Assenza di ittero o altri sintomi durante l'infezione acuta
Razza Afro-Americana
Infezione da HIV
Immunosoppressione

*Tabella 1: Fattori di rischio per lo sviluppo di infezione cronica C*

In particolare, la probabilità di sviluppare una infezione cronica appare essere ridotta se l'età al momento del contagio è inferiore ai 25 anni, in effetti, in soggetti HCV positivi con età compresa tra 12-25 anni, si ha cronicizzazione solo nel 56% dei casi, mentre la percentuale sale al 87% nei pazienti in età più avanzata (Bellentani et al. 2001).

Infatti, studi di follow-up, condotti su individui in età pediatrica con epatite contratta a seguito di trasfusione, mostrano che solo il 55-60% rimane HCV positivo in età adulta (Vogt et al. 1999). Inoltre, dati emersi dallo studio sulla trasmissione verticale, hanno suggerito che in un considerevole numero di casi, si va a risoluzione attraverso un'infezione transiente e talvolta senza neanche lo sviluppo di anticorpi anti-HCV (Sasaki et al. 1997). Alcune indagini indicano invece che il tasso di cronicizzazione sia particolarmente ridotto nei soggetti più giovani e di sesso femminile, suggerendo che il sesso maschile possa costituire un fattore di rischio, ma al momento questo aspetto non trova ancora una linea di pensiero pienamente condivisa (Alter et al. 1999; Bellentani et al. 2001). Dalla letteratura emerge inoltre che, tra i vari gruppi etnici ci siano differenze nell'insorgenza di infezioni croniche C, come nella risposta alla terapia e nello sviluppo di complicanze. Per ragioni ancora non del tutto chiarite sembrerebbe che negli Stati Uniti, gli Afro-Americani, abbiano una probabilità più elevata di cronicizzazione dell'infezione rispetto a qualsiasi altro gruppo etnico lì presente (Alter et al. 1999). Altrettanto interessante è il dato relativo al fatto che da una parte gli Afro-Americani e dall'altra gli Asiatici hanno un rischio aumentato di sviluppare HCC, rispettivamente di 2 e 4 volte, se confrontati con i Caucasici (Nguyen et al. 2004). Tuttavia, al momento non sono ancora state identificate peculiarità genetiche dell'ospite o del virus che possano spiegare la diversa incidenza di CHC, come pure la risposta al trattamento e lo sviluppo di HCC. E' stato inoltre evidenziato che i pazienti che manifestano ittero od altri sintomi durante la

fase acuta dell'infezione C, hanno una minore probabilità di progredire verso la CHC, a sostegno di queste osservazioni, alcuni autori hanno speculato sul fatto che l'ittero possa essere associato con una più robusta risposta immunitaria di tipo Th1 (Gruner et al. 2000; Lechner et al. 2000). Un altro fattore di cruciale importanza per ciò che riguarda la progressione della infezione C, è rappresentato dalla competenza del sistema immunitario, tanto è vero che in soggetti infetti da HIV si riscontra una più probabile evoluzione a CHC rispetto ai soggetti immuno-competenti (Thomas et al. 2000).

### **Fattori di rischio per la progressione della fibrosi epatica.**

L'alterazione dell'architettura epatica, conosciuta anche come fibrosi, è variabile nel corso della CHC, in taluni casi può essere limitata all'area portale o peri-portale, mentre in altri casi, può estendersi da un area portale all'altra (fibrosi a setti) determinando cambi strutturali più marcati. Esistono diversi fattori che possono incrementare il rischio di progressione della patologia epatica, alcuni strettamente legati all'ospite, mentre altri prevalentemente allo stile di vita (Tabella 2).

<b>FATTORI DI RISCHIO</b>
Consumo di alcol > 60g / die negli uomini, > 40g / die nelle donne
Età al momento dell'infezione > 40 anni
Sesso maschile
Grado di infiammazione e fibrosi nelle biopsie epatiche
Co-infezioni con HIV o HBV

*Tabella 2: Fattori di rischio per una avanzata progressione della fibrosi epatica*

Il consumo di alcol costituisce sicuramente uno dei più importanti fattori di rischio che guidano la progressione della fibrosi durante CHC. Numerosi studi hanno evidenziato un'importante associazione fra alcol e progressione della malattia epatica in pazienti con infezione cronica da HCV (Vento et al. 2002; Pagliaro et al. 1999). In particolare, un consumo alcolico superiore ai 40 g/die per le donne e 60 g/die per gli uomini accelera lo sviluppo di cirrosi ed aumenta di 2-3 volte il rischio di sviluppare cirrosi o malattia epatica scompensata, indipendentemente dalla durata dell'infezione (Wiley et al. 1998).

Allo stesso modo, esistono numerose pubblicazioni scientifiche a sostegno della stretta associazione esistente tra lo sviluppo di fibrosi e l'età al momento dell'infezione (Poynard et al. 1997; Ryder et al. 2004). In particolare, il grado di fibrosi appare significativamente più elevato nei pazienti che hanno contratto l'infezione ad un'età superiore ai 40 anni (Poynard et al. 1997).

Il grado di infiammazione e fibrosi riscontrato alla biopsia è stato inoltre associato ad un ulteriore peggioramento della malattia epatica in corso della CHC (Yano et al. 1996).

Questi dati suggeriscono che la progressione della fibrosi nella infezione da HCV non sia lineare, ma possa evolvere in maniera più rapida nei soggetti adulti.

Le co-infezioni HCV e HIV come pure HBV, costituiscono un altro significativo fattore di rischio, in particolare, la co-infezione HCV ed HIV estremamente comune tra gli emofilici ed i tossico dipendenti, sembrerebbe accelerare notevolmente la progressione verso la fibrosi epatica (Ragni et al. 2001; Benhamou et al. 1999; Di Martino et al. 2001). Allo stesso modo, le co-infezioni HCV ed HBV sono associate ad una più probabile e rapida insorgenza di cirrosi. Per contro, negli individui HIV

positivi, l'HCV è stato associato ad una più rapida progressione verso la sindrome da immuno-deficienza acquisita (AIDS) (Lesens et al. 1999).

Ad una malattia epatica più aggressiva contribuiscono inoltre tutta una serie di condizioni patologiche che determinano uno stato di immunosoppressione, in particolare, pazienti con una deficienza di immunoglobuline (ipogammaglobulinemia), oppure i riceventi un trapianto d'organo, hanno mostrato una più rapida progressione alla cirrosi rispetto ai soggetti immunocompetenti (Benhamou et al. 1999; Bjoro et al. 1994; Berenguer et al. 2000).

Infine, è stato inoltre dimostrato che anche l'insulino resistenza, rappresenta uno stimolo che contribuisce al peggioramento della fibrosi ed ad una ridotta risposta alla terapia (D'Souza et al. 2005).

### **MECCANISMI ALLA BASE DEL DANNO EPATICO INDOTTO DA HCV**

L'CHC si manifesta con un variabile grado di infiammazione epatica e di fibrosi ed un incrementato rischio di sviluppare cirrosi e HCC.

Tra i meccanismi alla base della patogenesi del danno epatico indotto da HCV sembrano essere coinvolti sia effetti citopatici diretti sia processi immuno-mediati.

Alcune evidenze a sostegno di tali ipotesi appaiono emergere dal fatto che il danno epatico progredisce più rapidamente nei pazienti immuno-deficienti (es. HIV positivi, immunoglobulino-deficienti, riceventi trapianto epatico) rispetto ai pazienti immunocompetenti. Tali osservazioni forniscono una evidenza indiretta della presenza di un danno epatico mediato da effetti citopatici correlati a prodotti genici di HCV (Thomas et al. 2005).

Mentre, un'altra evidenza indiretta, questa volta a sostegno del ruolo della risposta immunitaria nella patogenesi della CHC deriva dall'osservazione che il danno indotto da HCV coincide con lo sviluppo della risposta immunitaria dell'ospite e non semplicemente con la replicazione virale.

Tra i potenziali meccanismi che al momento sono ritenuti essere alla base del danno epatico in corso di CHC, alcuni coinvolgono la regolazione dell'apoptosi e della steatosi, mentre altri l'attivazione delle cellule epatiche stellate (HSCs) e la risposta mediata dai linfociti T citotossici.

## **DANNO EPATICO MEDIATO DA EFFETTI CITOPATICI DIRETTI**

### ***Regolazione dell'apoptosi***

L'apoptosi, anche conosciuta come morte cellulare programmata, è un meccanismo intracellulare strettamente regolato che permette l'eliminazione di cellule potenzialmente pericolose determinando una ridotta fuoriuscita di componenti intracellulari e di conseguenza una ridotta infiammazione (Bantel et al. 2003). In particolare, l'apoptosi degli epatociti, è un processo che è stato descritto ampiamente nei pazienti cronicamente infetti da HCV (Bantel et al. 2003). Bantel e colleghi hanno recentemente identificato un sito di taglio delle caspasi sulla molecola della citocheratina 18 (CK-18), la quale costituisce il maggior filamento intermedio presente negli epatociti. E' stato anche dimostrato che nei pazienti HCV si assiste ad un incremento dei prodotti derivanti dalla proteolisi della CK-18 sia a livello sierico che delle biopsie epatiche; tutto ciò va a sostegno dell'ipotesi che ci sia una attivazione delle caspasi e quindi dell'apoptosi. Infatti, alcuni autori hanno proposto come l'apoptosi degli epatociti possa essere causa diretta di fibrosi mediante l'attivazione delle cellule stellate (HSCs) (Canbay et al. 2004). In accordo con tali

ipotesi, è stato riportato come l'attivazione *in vitro* delle HSCs, mediata dai corpi apoptotici, incrementa l'espressione dei geni codificanti per il collagene delle HSCs e del TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) (Canbay et al. 2004; Canbay et al. 2003). Tuttavia, al momento non è ancora del tutto chiaro se le singole proteine di HCV possano promuovere o inibire l'apoptosi (Bantel et al. 2003). Una ipotesi ragionevole è che HCV possa direttamente inibire l'apoptosi degli epatociti determinando sopravvivenza cellulare e permettendo al virus di proliferare. In effetti, l'inibizione dell'apoptosi sembra essere un passaggio chiave nella patogenesi del HCC in vari modelli animali (Baskin-Bey et al. 2005). In conclusione, l'infezione degli epatociti da parte di HCV incrementa l'apoptosi a livello epatico, ed i corpi apoptotici potrebbero direttamente stimolare la fibrosi. HCV, probabilmente, altera il pathway apoptotico intracellulare ed appare logico che il virus possa inibire l'apoptosi stimolata dalla sua stessa infezione per incrementare la propria sopravvivenza, analogamente a quanto descritto per altri virus (Bantel et al. 2003). Inoltre, l'inibizione del processo apoptotico potrebbe determinare l'immortalità degli epatociti e dunque spiegare l'alto tasso di incidenza di HCC descritta nei pazienti con CHC. Alcuni autori hanno per di più proposto che l'aumentata rigenerazione degli epatociti, che rimangono a seguito dell'induzione dell'apoptosi da parte di HCV, possa risultare in un elevato turnover cellulare ed un più rapido accorciamento dei telomeri. Quest'ultimo fenomeno sembra stimolare la senescenza epatocellulare, seguita a sua volta dall'attivazione delle cellule stellate e di conseguenza dalla fibrosi (Tillmann et al. 2005).

### **Steatosi**

La steatosi appare essere più comune nei pazienti HCV rispetto alla popolazione generale (Asselah et al. 2006). In particolare, la steatosi macrovescicolare interessa

la regione periportale del fegato dei pazienti HCV, a differenza della distribuzione prevalentemente centrolobulare descritta nei pazienti NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease), tutto ciò suggerisce che il virus C possa contribuire direttamente all'insorgenza di steatosi (Yoon et al. 2006). Inoltre, nei pazienti infetti dal genotipo 3 si assiste normalmente ad un aumento del carico virale, il quale correla con la severità della steatosi; queste evidenze costituiscono un ulteriore prova a sostegno del fatto che il virus possa effettivamente avere un ruolo diretto nell'insorgenza della steatosi (Yoon et al. 2006). Recentemente, è stato messo in evidenza come le proteine virali core e NS5A possano alterare, a livello epatico, i pathways del metabolismo lipidico determinando così l'insorgenza della steatosi. In particolare, due studi indipendenti hanno dimostrato come le proteine virali possano incrementare l'attività delle proteine SREBPs (Sterol Regulatory Elements Binding Proteins) che regolano l'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi e del colesterolo (Kim et al. 2007; Waris et al. 2007). Tuttavia, esiste solamente una debole relazione causale tra la steatosi indotta da HCV ed un incrementata progressione della fibrosi, in quanto esistono al momento solo studi retrospettivi e non tutti supportano la connessione tra i due fenomeni (Asselah et al. 2006).

### ***Insulina resistenza e steatosi***

Dalla letteratura emerge chiaramente la presenza di una associazione tra l'infezione cronica da parte del virus C e l'insulina resistenza (IR) (Allison et al. 1994), tale associazione risulta di estrema importanza poiché recenti osservazioni hanno dimostrato l'esistenza di una significativa correlazione tra il grado di IR e quello della fibrosi (Hui et al. 2003; McCaughan et al. 1999). In particolare, Fartoux e colleghi hanno recentemente messo in evidenza come i pazienti HCV infetti dal genotipo 3, rispetto a quelli positivi per il genotipo 1, mostrino una maggior prevalenza di steatosi

e viceversa una ridotta incidenza di IR. In particolare, si ritiene che nei soggetti HCV (genotipo 1), l'IR costituisca un fattore di rischio indipendente di steatosi mentre, nei pazienti CHC (genotipo 3) risulta invece il carico virale ad essere indipendentemente associato alla steatosi. Sulla base di queste osservazioni, l'IR, nei pazienti infetti dal genotipo 1, potrebbe essere causa più che conseguenza di steatosi e di fibrosi (Fartoux et al. 2005), in effetti, aumentati livelli di insulina circolante sono associati ad un incremento del rischio di fibrosi (Fartoux et al. 2005). I meccanismi alla base della correlazione tra iperinsulinemia e fibrosi non sono, ad oggi, completamente compresi anche se, è stato osservato come elevati livelli di insulina e glucosio possano stimolare e promuovere la proliferazione delle cellule stellate epatiche e l'espressione del fattore di crescita del tessuto connettivo, il quale risulta strettamente connesso alla progressione della fibrosi (Paradis et al. 2001). Allo stesso modo anche i meccanismi che inducono l'insorgenza di IR, nel corso di CHC, non sono ancora del tutto stati chiariti. Alcuni autori hanno proposto come l'IR possa originare dalla steatosi, suggerendo che un eccesso di acidi grassi liberi possa regolare negativamente la via di segnalamento del substrato 1 del recettore dell'insulina (IRS-1) (Neuschwander-Tetri et al. 2003). Quest'ipotesi è ulteriormente sostenuta da evidenze sperimentali, in particolare, è stato messo in luce come si possa ottenere, in modelli animali steatosici, un miglioramento della IR attraverso una riduzione della steatosi stessa (An et al. 2004). Tuttavia, come precedentemente riportato, la mancanza di una associazione tra steatosi ed IR nei pazienti CHC (genotipo 3), non sostiene la suddetta ipotesi. In aggiunta, Shintani e colleghi hanno dimostrato come in topi transgenici, esprimenti la proteina core di HCV, l'IR preceda la comparsa della steatosi (Shintani et al. 2004). Nello specifico, è stato riportato come la proteina core di HCV sia in grado di incrementare i livelli della molecola SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3), la quale a sua volta induce

l'ubiquitinazione e la degradazione, da parte del proteasoma, di IRS1 e IRS2 determinando quindi l'insorgenza di IR (Kawaguchi et al. 2004) ed in ultima analisi la progressione verso la fibrosi.

### ***Attivazione delle cellule stellate***

Le HSCs risiedono nello spazio di Disse, che si trova interposto tra gli epatociti e le cellule endoteliali dei sinusoidi, e rappresentano nel fegato danneggiato il principale tipo cellulare fibrogenico. Sebbene, siano quiescenti in condizioni fisiologiche, esistono diversi stimoli capaci di attivarle e di determinare la produzione di abbondanti quantità di proteine della matrice extracellulare (Rockey et al. 2005).

In particolare, l'infiammazione cronica correlata all'infezione da HCV sembra essere tra gli stimoli capaci di determinarne l'attivazione (Schuppan et al. 2003). E' stato per di più ipotizzato che HCV possa direttamente infettare le HSCs, a tal riguardo esistono importanti evidenze sperimentali che sostengono come alcune proteine di HCV possano indurre cambi fenotipici nelle HSCs. In particolare, quando vengono sperimentalmente introdotte, mediante vettori adenovirali, la proteina core e specifiche proteine non strutturali quali NS3 e NS5 nelle cellule stellate, ciò determina un incremento della bioattività del TGF $\beta$ 1 e dell'espressione del procollagene I (Bataller et al. 2004). E' stato inoltre dimostrato come le proteine NS3 e NS5 possano interagire con il mitocondrio ed indurre sia l'accumulo che la degradazione di lipidi (Gong et al. 2001; Moriya et al. 2001). La conseguente modifica della compartimentalizzazione e del metabolismo dei lipidi favorisce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che a loro volta inducono l'espressione del TGF $\beta$ 1 ed in ultima analisi la fibrosi (Schuppan et al. 2003).

## **DANNO EPATICO IMMUNO-MEDIATO**

### **Inibizione della immunità innata**

Oltre ad influenzare l'apoptosi, steatosi e la fibrosi, HCV probabilmente regola anche il sistema della immunità innata, il quale costituisce la prima linea di difesa contro le infezioni virali. L'immunità innata, nel fegato, include la risposta intrinseca degli epatociti alle infezioni virali, l'attivazione dei fagociti e delle cellule presentanti l'antigene (APC). L'immunità innata risponde rapidamente alla presenza di patogeni e stimola a sua volta una risposta immunitaria adattativa, antigene specifica, mediata dalle cellule B e T. Le infezioni virali intracellulari sono rilevate attraverso recettori della famiglia del Toll-like receptor e dalla RNA elicasi RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) (Hiscott et al. 2006). Negli epatociti, RIG-I è in grado di rilevare la presenza dell'RNA doppio filamento prodotto dalle infezioni virali inducendo la produzione di interferone, che a sua volta attiva i meccanismi che degradano il genoma virale, inibisce la replicazione virale, la traduzione delle proteine virali ed induce l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe 1 (MHC di classe 1). In questo contesto, la proteasi di HCV NS3/4 interferisce direttamente con la produzione, da parte degli epatociti, dell'INF- $\alpha$  attraverso il taglio proteolitico della sequenza di indirizzamento mitocondriale della proteina di segnalamento antivirale MAVS (mitochondrial antiviral signaling) (Hiscott et al. 2006; Meylan et al. 2005). Quest'ultima rappresenta una molecola adattatrice che lega il rilevamento dell'RNA virale, da parte di RIG-I, all'attivazione dell'espressione del gene IFN e del signaling del fattore nucleare Kappa B (NF $\kappa$ B). La localizzazione mitocondriale della proteina unitamente all'osservazione che l'inibizione dell'espressione del gene MAVS, attraverso siRNA (small interference RNA), determina un incremento dell'apoptosi, suggerisce che MAVS possa avere un ruolo protettivo nei confronti dell'apoptosi precoce nelle infezioni virali (Hiscott et al. 2006; Seth et al. 2005). Tutte queste

osservazioni rinforzano ulteriormente il concetto secondo cui HCV abbia evoluto molteplici meccanismi attraverso i quali sfuggire alla risposta innata dell'ospite e promuovere dunque la propria sopravvivenza.

### ***Il ruolo dei linfociti citotossici***

I linfociti citotossici sono principalmente responsabili dell'eliminazione di cellule danneggiate o infettate, quindi sono cruciali nel mediare la risposta immunitaria nel corso di infezioni virali. I linfociti citotossici comprendono i linfociti T citotossici (CTLs), cellule natural killer (NK), cellule natural killer T (NKT) e T  $\gamma\delta$  (Waterhouse et al. 2004). I meccanismi attraverso i quali, i vari tipi di linfociti, identificano le cellule bersaglio appaiono essere diversi, mentre viceversa si pensa che il processo di eliminazione sia piuttosto simile.

### ***Linfociti T citotossici***

I Linfociti T CD8+, sono essenziali per contrastare le infezioni virali, possono migrare nel tessuto infettato, riconoscere le cellule bersaglio attraverso peptidi virali che sono presentati in associazione con il complesso MHC di classe I; ed inibire la replicazione virale mediante citolisi e la secrezione di citochine antivirali (Kagi et al. 1996). L'eliminazione di virus intracellulari, mediata dal sistema immunitario, richiede la distruzione delle cellule infettate, da parte di CTLs virus-specifici, che possono agire attraverso due differenti pathways o perforina-dipendente o Fas-dipendente (Guidotti et al. 2001). In particolare, si ritiene che i CTLs utilizzino sia la citolisi sia la produzione di citochine antivirali per l'eradicazione delle infezioni che interessano un ampio numero di cellule, come accade nei grossi organi ampiamente vascolarizzati, quali il fegato (Guidotti et al. 2001).

Alcuni studi hanno dimostrato come il numero di CTLs, specifici per HCV, sia inversamente associato ai titoli virali ed invece direttamente associato al danno epatico, nonostante tali evidenze è bene ricordare che queste associazioni sono ancora ampiamente dibattute (Bowen et al. 2005). Tanto è vero che, sono stati descritti pazienti, con infezione acuta da HCV, in cui la comparsa di CTLs funzionali, HCV-specifici, era temporaneamente associata al controllo della viremia (Schoukry et al. 2003). Sulla base di queste osservazioni si evince che la presenza di CTLs, specifici per HCV, si associa tipicamente a differenti esiti clinici (Cox et al. 2005), ciò suggerisce che queste cellule possano avere sia un ruolo protettivo sia nocivo a seconda della loro capacità funzionale e del microambiente nel quale si trovano (Bertoletti et al. 2000). L' evidenza che i CTLs, virus-specifici, possano mediare una immunopatologia severa è suggerita da un recente lavoro, nel quale si riporta come due pazienti con una grave infezione acuta abbiano sviluppato persistenza della viremia; ed in entrambi i casi linfociti CD8+ riconoscevano l'epitopo, HLA-A2 ristretto, 1073 di NS3 ed inoltre cross-reagivano con un epitopo del virus dell'influenza A (Urbani et al. 2005). Queste osservazioni ci permettono di speculare sul fatto che, l'immunità eterologa potrebbe spiegare almeno in parte la ragione per cui, le infezioni da HCV contratte in età avanzata tendano a mostrare un decorso clinico più severo (Rehermann et al. 2005).

Altri studi hanno riportato come l'inizio dell'epatite acuta e dell'infiammazione coincida con l'induzione dei CTLs CD38+CD69+ che non producono INF- $\gamma$ , il che suggerisce che la distruzione, delle cellule infettate, mediata dall'immunità abbia probabilmente un importante ruolo nella patogenesi della malattia epatica (Lechner et al. 2000; Thimme et al. 2001).

L'INF-  $\gamma$ , inibisce la replicazione di repliconi di HCV in cellule Huh-7 (Frese et al. 2002), ma allo stesso modo media l'attivazione dei macrofagi, incrementa la

suscettibilità al danno epatico mediato dal TNF ed inizia il reclutamento delle cellule T, NK e NKT attraverso l'incremento del rilascio di citochine chemotattiche (Bertoletti et al. 2000). In effetti, la progressione del danno epatico nei pazienti con infezioni cronica da HCV è stata correlata all'espressione intra-epatica degli mRNAs che codificano per citochine Th1 (Napoli et al. 1996).

Riassumendo, nei pazienti con infezione cronica da HCV, i CTLs attivati possono quindi mostrarsi inefficienti nell'eliminazione dell'infezione virale attraverso meccanismi citochina-mediati, ma potrebbero essere capaci di indurre un danno epatico tramite gli effetti citotossici (Bertoletti et al. 2000).

### ***Cellule Natural killer***

Le cellule NK sembrerebbero svolgere un importante funzione nel contrastare la replicazione dei virus epatotropi (Golden-Mason et al. 2006). Per il controllo delle infezioni virali le cellule NK si avvalgono sia di funzioni citolitiche sia della produzione di citochine (Tay et al. 1997; Guidotti et al. 1999). In particolare, le cellule NK, possono direttamente indurre apoptosi degli epatociti infetti (Liu et al. 2000), attraverso la produzione dell'IFN- $\gamma$ , inoltre, sono coinvolte nell'attivazione delle cellule NKT e dei CTLs, che a loro volta possono promuovere il danno epatico durante il tentativo, prolungato e vano, di eliminare il virus. Le cellule NK sono direttamente o indirettamente coinvolte nell'induzione del danno epatico in corso di CHC. In particolare, studi sull'epatite virale, in modelli transgenici, hanno messo in evidenza un coinvolgimento delle cellule NK nel promuovere le lesioni epatiche (Liu et al. 2000).

In aggiunta, è stato dimostrato che, la down regolazione delle proteine di superficie MHC classe I, che rappresenta una manifestazione comune nel corso delle infezioni

virali, potrebbe rendere gli epatociti, infetti da HCV, più suscettibili alla lisi indotta dalle cellule NK (Ljunggren et al. 1990; Karre et al. 1997).

Altri studi hanno invece messo in evidenza come nella CHC, la popolazione di cellule NK CD3+CD56+ non correla con i parametri istologici della malattia (Pernollet et al. 2002), e si riduca con la progressione del danno a livello tissutale (Deignan et al. 2002; Tran et al. 1997); ciò suggerisce che le cellule NK potrebbero non essere direttamente coinvolte nel mediare il danno.

Allo stesso modo, esistono convincenti dati a sostegno di un ruolo delle cellule NK nella protezione del fegato dalla fibrosi, attraverso l'induzione dell'apoptosi delle cellule HSCs attivate (Melhem et al. 2006; Radaeva et al. 2006).

In sintesi, il contributo relativo delle cellule NK nell'ambito delle infezioni croniche da HCV, sia esso nocivo o protettivo, non è stato ancora del tutto chiarito.

### **Cellule T $\gamma\delta$**

Il recettore delle cellule T (TCR), può presentarsi in due diverse isoforme  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . Il TCR  $\alpha\beta$  è presente in più del 90% delle cellule T periferiche, mentre solo una ridotta parte di queste esprime il TCR  $\gamma\delta$ . Tuttavia, un discreto numero di cellule T  $\gamma\delta$  sono state identificate a livello dei siti primari di esposizione agli antigeni come l'intestino, la pelle ed il fegato (Hayday et al. 2003; Kenna et al. 2004).

Dalla letteratura emerge che, le cellule T  $\gamma\delta$ , abbiano un duplice ruolo nel corso dell'infezione cronica C, da una parte una funzione protettiva nei confronti della lesione epatica, mentre dall'altra sembrerebbero contribuire alla progressione del danno epatico. In particolare, il numero delle cellule T  $\gamma\delta$  circolanti sembra essere incrementato nei pazienti con epatite cronica virale (Nikopoulou et al. 1995), inoltre, nei pazienti con CHC, l'incremento del numero di cellule T  $\gamma\delta$  che infiltrano il fegato, correla direttamente con punteggi più alti dell'indice di attività istologica (HAI) e di

Ishak (Yonukura et al. 2000; Agrati et al. 2001). In aggiunta, linee cellulari di cellule T, ottenute da biopsie epatiche di soggetti con CHC, presentano un numero più elevato di cellule T  $\gamma\delta$  se confrontate con quelle ottenute da soggetti con epatite non virale (Tseng et al. 2001). Tutte queste osservazioni suggeriscono che le cellule  $\gamma\delta$  possano avere, in corso di infezione cronica C, un ruolo nella patogenesi del danno epatico. Tuttavia, in altri studi, nei quali è stata confrontata la popolazione delle cellule T in fegati normali ed in fegati che presentavano una modesta o grave infezione C, non è stato possibile osservare un arricchimento in cellule T  $\gamma\delta$  nei fegati patologici (Deignan et al. 2002). Inoltre, in parecchi modelli murini, è stato dimostrato come le cellule  $\gamma\delta$  abbiano un ruolo protettivo nel limitare il danno epatico in condizioni infiammatorie croniche (Hayday et al. 2003). In particolare, topi deficienti per le cellule  $\gamma\delta$ , infettati con *Listeria monocytogenes*, mostrano un danno epatico mediato dall'immunità di notevoli proporzioni (Fu et al. 1994). Il ruolo protettivo delle cellule T  $\gamma\delta$  sembra risultare principalmente dalla down regolazione, in condizioni infiammatorie croniche, della risposta potenzialmente dannosa mediata dalle cellule T  $\alpha\beta$  (Hayday et al. 2003). Comunque, data l'esistenza di risultati così contrastanti, ulteriori studi sono necessari per una più precisa definizione del ruolo di queste cellule nella patogenesi del danno epatico correlato all'infezione cronica C.

### **Cellule T Natural Killer**

Le cellule NKT, costituiscono una linea cellulare linfoide distinta dalle cellule B e T o NK, anche se esprimono marcatori di superficie sia delle cellule T che delle NK (Exley et al. 2004). Le cellule NKT sembra siano coinvolte nell'eliminazione di patogeni che presentano diversi tropismi. In particolare, alcuni autori hanno suggerito che le cellule NKT abbiano un ruolo di protezione nelle fasi precoci dell'infezione da HCV, ma che siano invece un mediatore chiave del danno epatico durante l'infezione

cronica (Exley et al. 2004). In effetti, nei pazienti con CHC è stato messo in evidenza un incremento del numero di cellule NKT infiltranti il fegato (Nutti et al. 1998; Durante-Mangoni et al. 2004). Inoltre, è stato osservato che in caso di una modesta CHC le cellule NKT mostrano un fenotipo proinfiammatorio Th1, mentre in presenza di fibrosi e cirrosi sono prodotte anche citochine di tipo Th2 (Durante-Mangoni et al. 2004). In conclusione, come per gli altri tipi cellulari precedentemente presi in considerazione, non è al momento possibile definire chiaramente il contributo, delle cellule NKT, nella patogenesi della lesione epatica mediata dall'immunità.

**AUTOIMMUNITA' ED INFEZIONE CRONICA C**

L'autoimmunità è un meccanismo fisiopatologico che determina, a carico di svariati organi, l'insorgenza di patologie infiammatorie croniche. Per definizione, l'autoimmunità è caratterizzata dalla perdita, da parte del sistema immunitario, della tolleranza verso gli antigeni self. Tuttavia, al momento, i meccanismi molecolari e cellulari che sono alla base dell'autoimmunità non sono ancora stati completamente definiti. Sappiamo che la protezione verso i cloni autoreattivi, delle cellule B e T, viene raggiunta precocemente nel corso della vita attraverso la selezione negativa e quindi l'induzione dell'apoptosi. A sopprimere i fenomeni d'autoimmunità contribuisce, inoltre, la tolleranza periferica attraverso la delezione clonale e l'induzione dell'anergia (Goodnow et al. 1996). Tuttavia, una volta che la tolleranza centrale e periferica sono state stabilite, non necessariamente tutti i cloni auto-reattivi vengono eliminati, questo perché o gli antigeni non sono accessibili o perché il livello antigenico è troppo basso per determinarne l'attivazione (Goodnow et al. 1996). Appare comunque ormai chiaro che, esistano diversi meccanismi per aggirare la tolleranza verso il self, in particolare, numerosi studi si sono focalizzati sul ruolo svolto dal mimetismo molecolare. In breve, se un soggetto predisposto viene infettato da un patogeno con determinanti antigenici che sono immunologicamente simili a quelli dell'ospite, ma che se presentati alle cellule T, sono in grado di innescare una risposta immunitaria, allora quest'ultima potrebbe cross-reagire con antigeni tissutali dell'ospite e determinare la distruzione del tessuto stesso. In aggiunta, questo attacco autoimmune potrebbe progressivamente diffondersi ad altri auto-antigeni (epitope spreading). In particolare, le risposte immunitarie, cross-reattive, possono coinvolgere sia l'immunità umorale (anticorpi) sia quella cellulare (cellule T) oppure entrambe. I linfociti T CD8+ citotossici sono le principali cellule effettrici in numerose patologie autoimmuni, ma si ritiene allo stesso modo che, le cellule T CD4+

regolatrici giocano un ruolo fondamentale nel controllo dell'autoimmunità patologica. Infine, un altro punto cruciale è rappresentato dall'interazione tra cellule B ed antigeni, in quanto tali cellule mostrano una varietà di caratteristiche che possono contribuire all'insorgenza di fenomeni d'autoimmunità. In particolare, gli autoanticorpi sono marcatori di numerose malattie autoimmuni (Strassburg et al. 2000) e possono loro stessi innescare processi autoimmunitari (Matsumoto et al. 1999). Inoltre, le cellule B vergini sono in grado di differenziare in cellule B polarizzate con un proprio profilo di citochine e comportarsi come classiche cellule presentanti l'antigene, quindi in ultima analisi possono loro stesse orchestrare una risposta immunitaria e potenzialmente innescare una autoimmunitaria.

Nel corso dell'infezione cronica C viene dunque montata una risposta immunitaria volta all'eradicazione del virus, ma la cronicizzazione del processo infiammatorio determina talvolta l'innescarsi di processi autoimmunitari che potrebbero contribuire alla patogenesi ed alla progressione del danno epatico.

### **Manifestazioni extraepatiche in corso di epatite cronica C**

L'infezione cronica da virus dell'epatite C è spesso associata a numerose manifestazioni extraepatiche di autoimmunità quali scialoadenite linfocitica, lichen piano, poliarterite nodosa, glomerulonefrite, tiroidite e crioglobulinemia mista (MC) (Strassburg et al. 2003).

Tra i disordini immunologici, associati all'infezione C, la crioglobulinemia mista (MC), espansione policlonale o monoclonale delle cellule B, rappresenta sicuramente una delle più comuni manifestazioni extraepatiche. Le crioglobuline, ossia immunoglobuline che precipitano reversibilmente alle basse temperature, sono state identificate nel 50% dei pazienti HCV, ma sembrerebbe che solo il 25-30% di essi

sviluppi sintomi clinici quali stanchezza, porpora, artralgia, fenomeno di Raynaud, vasculiti e neuropatie periferiche (Cacoub et al. 2000). L'associazione tra la MC e l'infezione C sembra dovuta dalla capacità del virus di legare i linfociti B attraverso CD81 (Czaja et al. 1995), riducendo la soglia di attivazione delle cellule e quindi facilitando la produzione di anticorpi (Pileri et al. 1998). Tuttavia, sono stati proposti altri meccanismi, come il mimetismo molecolare, esistente tra particolari antigeni di HCV ed autoantigeni dell'ospite, che potrebbero essere responsabili dell'attivazione dei linfociti B e della produzione di anticorpi (Ferri et al. 2006). La comparsa della MC è legata alla formazione di immunocomplessi e le manifestazioni cliniche si pensa siano causate direttamente dalla deposizione degli stessi a livello dei vari organi.

I sintomi, causati dalla crioglobulinemia, rispondono al trattamento con interferone, ma si ha frequentemente ricaduta ogni volta che il trattamento viene sospeso (Lunel et al. 1999).

Infine, ci sono numerosi studi che suggeriscono una importante associazione tra CHC e linfomi di Hodgkin e non-Hodgkin. In particolare, i pazienti HCV mostrano una maggior incidenza rispetto ai controlli, della traslocazione t(14;18), la quale determina una overespressione della proteina antiapoptotica bcl-2 (Zignego et al. 2000).

In conclusione, questi dati sostengono la teoria secondo la quale, la MC deriverebbe dalla stimolazione cronica del sistema immunitario, ad opera di HCV, che predisporrebbe anche allo sviluppo di disordini di tipo linfoproliferativo.

### **EPATITE CRONICA C ED AUTO-ANTICORPI NON ORGANO SPECIFICI (NOSA)**

Circa il 25-30%, dei pazienti HCV, sviluppa autoanticorpi non organo specifici (NOSA) (Cassani et al. 1997; Lenzi et al. 1999; Muratori et al. 2003). Tra questi i più frequenti sono rappresentati dagli anticorpi anti-actina del muscolo liscio (SMA),

seguiti dagli anti-nucleo (ANA) ed infine dagli anti-microsomi epatici e renali di tipo 1(LKM1). La suscettibilità, allo sviluppo dei NOSA, appare essere strettamente correlata al background genetico che predispone all'insorgenza dell'epatite autoimmune (AIH). In effetti, nei pazienti HCV Nord-Americani e Cinesi, gli aplotipi HLA A1-B8-DRB1\*0301 e DRB1\*0401 sono associati allo sviluppo di anticorpi anti-nucleo ed all'insorgenza di patologie immunologiche, quali tiroiditi autoimmuni, sinoviti e vasculiti (Czaja et al. 1995; Hwang et al. 2002). Mentre, gli aplotipi HLA-DRB1\*0701 e il DQB1\*0201 sono significativamente più frequenti nei pazienti HCV europei che risultano essere positivi per gli anticorpi anti-LKM1 (Hwang et al. 2002).

I due principali quesiti a proposito dei NOSA, associati ad epatite C, riguardano: la loro origine e se questi sono degli epifenomeni o giocano un ruolo patogenetico nello sviluppo della necrosi epatocellulare.

Riguardo il primo quesito autori hanno suggerito come lo sviluppo degli autoanticorpi, in corso di CHC, possa essere imputabile alla presenza, sui linfociti B, di CD81 che viene considerato, a tutti gli effetti, il recettore cellulare di HCV (Pileri et al. 1998). CD81 è una tetraspannina che ha come ligando naturale la proteina 2 dell'envelope (E2) di HCV (Levy et al. 2005, Rosa et al. 2005). Strettamente associate a CD81 vi sono altre due proteine specifiche delle cellule B, ossia CD21 e CD19 (Levy et al. 2005). CD21 rappresenta il recettore per il frammento C3d del complemento, mentre CD19 è una molecola coinvolta nella trasduzione dei segnali di attivazione. In particolare, quando HCV, possibilmente rivestito dal frammento C3d, lega CD81, il recettore delle cellule B (BCR) ed il complesso co-stimolatorio CD19-CD21 determina da una parte un abbassamento della soglia per l'attivazione di una risposta policlonale, mentre dall'altra la produzione di crioglobuline ed anticorpi (Dempsey et al. 1996; Fearon et al. 2000). Tuttavia, altri fattori devono essere,

necessariamente, coinvolti, poiché è stato osservato che in molti pazienti positivi per gli autoanticorpi non vi è traccia di crioglobuline.

Per quanto riguarda il secondo aspetto, è stato dimostrato che nei soggetti HCV positivi, la presenza degli autoanticorpi è significativamente associata ad evidenze cliniche e biochimiche di patologia epatica, suggerendo quindi una connessione tra i due fenomeni (Cassani et al. 1997; Lenzi et al. 1999).

Tra i NOSA, gli anti-LKM1 sono, allo stato attuale, quelli meglio caratterizzati ed più interessanti per il loro potenziale contributo patogenetico nell'insorgenza e progressione della malattia epatica.

### **AUTOREATTIVITA' ANTI-CITOCROMI P450**

I citocromi P450 (CYPs) rappresentano una famiglia ubiquitaria di emoproteine, e sono coinvolti nella biotransformazione di una ampia gamma di sostanze xenobiotiche (Coon et al. 2005).

A prescindere dalle differenze esistenti a livello della omologia di sequenza, i CYPs possono essere suddivisi sulla base della loro funzione in quelli che giocano un ruolo specifico nel metabolismo degli ormoni od altre molecole endogene e, viceversa quelli che catalizzano la bioconversione di molecole esogene come farmaci ed altre sostanze xenobiotiche; ciò nonostante, alcune isoforme sono in grado di metabolizzare allo stesso modo sia substrati endogeni sia esogeni (Coon et al. 2005). Per un certo lasso di tempo, i CYPs sono stati considerati proteine specifiche del fegato, mentre oggi è ampiamente dimostrata la loro espressione extraepatica a livello di svariati tessuti, inclusi testicoli, ovaie, surrenali, tratto respiratorio, polmoni, reni, cervello, tratto gastrointestinale e tessuto adiposo della mammella (Coon et al. 2005; Hedlund et al. 2001; Ding et al. 2003).

Lo sviluppo di auto-reattività verso diverse isoforme del citocromo P450 non costituisce un evento così raro, tanto è vero che già a partire dal 1992 è stato fornito un contributo decisivo alla comprensione della immuno-patogenesi, del morbo di Addison idiopatico, identificando il citocromo P450 21-idrossilasi (CYP21) quale maggior auto-antigene presente nella corteccia surrenale (Winqvist et al. 1992; Baumann-Antczak et al. 1992). Studi successivi hanno poi messo in evidenza come auto-anticorpi diretti verso il CYP17- $\alpha$ -idrossilasi (CYP17), CYP11A1 e CYP21 possono essere trovati nei sieri dei pazienti affetti dalla malattia polighiandolare autoimmune di tipo I e II (APS tipo I, II) ed in alcuni casi isolati del morbo di Addison (Uibo et al. 1994).

### **Come gli enzimi diventano auto-antigeni?**

Che cosa attivi il sistema immunitario a reagire verso gli auto-antigeni non è allo stato attuale completamente noto. A lungo si è pensato che le proteine intracellulari fossero immunologicamente privilegiata poiché nascoste al riconoscimento da parte del sistema immunitario, e quindi al riparo da eventuali attacchi autoimmuni. In effetti, era stato ipotizzato come i neo-antigeni rilasciati a seguito dell'instaurarsi di un danno epatico potessero essere riconosciuti come estranei dal sistema immunitario fornendo, così, un potenziale stimolo per lo sviluppo di un attacco autoimmune verso epitopi criptici localizzati sulle molecole dei CYPs (Lanzavecchia et al. 1995). Questa tesi ha tuttavia fallito nel fornire una spiegazione credibile a causa della straordinaria specificità osservata nelle risposte autoimmunitarie anti-CYPs. Infatti, non tutte le forme di "distruzione" epatica sono associate ad una risposta anti-CYP; in particolare, questi anticorpi sono praticamente assenti nell'epatite virale A, B e nell'epatite autoimmune di tipo 1 (AIH1). Inoltre, nei contesti patologici associati con risposte immunitarie anti-CYP, possono essere presenti profili autoimmunitari

altamente specifici. Ad esempio, autoanticorpi anti-CYP2D6 sono presenti nell'AIH tipo 2 ed in una certa frazione di pazienti con epatite cronica C (Alvarez et al. 1999; Zachou et al. 2004; Dalekos et al. 2002; Dalekos et al. 1999), ma in nessuna di queste condizioni patologiche è possibile evidenziare la presenza di autoanticorpi anti-CYP1A2, marker dell'epatite associata alla sindrome poliendocrina autoimmune di tipo 1 (APS-1) (Zachou et al. 2004; Dalekos et al. 2002; Clemente et al. 1998; Manns et al. 1997; Gebre-Medhim et al. 1997; Clemente et al. 1997; Manns et al. 1990). Inoltre, malgrado l'elevata omologia di sequenza esistente tra il CYP1A2 ed il CYP1A1 quest'ultimo non è mai stato identificato come un auto-antigene (Clemente et al. 1998; Bogdanos et al. 2003). In aggiunta, anticorpi anti-CYP2E1 sono presenti nell'epatite indotta da alcol, alotano ed isoniazide ed in una certa percentuale di pazienti con epatite cronica C, ma non sono stati descritti in altre forme di patologia epatica (Bogdanos et al. 2003; Vidali et al. 2007). In conclusione, sulla base di queste evidenze possiamo escludere che la perdita della tolleranza verso i citocromi P450 costituisca un evento casuale ed aspecifico, al contrario, quello che si evinceva a sostegno dell'esistenza di meccanismi antigene-specifici che guidano la perdita della tolleranza immunologica verso singoli CYPs (Zachou et al. 2004; Bogdanos et al. 2003). Lo sviluppo di reazioni autoimmunitarie indotte da farmaci, contro i CYPs, rappresenta un valido modello per la comprensione dei meccanismi attraverso i quali gli stessi possano diventare il bersaglio di un attacco autoimmune (Boitier et al. 1999; Beaune et al. 1993; Beaune et al. 1994). Nello specifico, i citocromi P450 metabolizzano sostanze xenobiotiche generando specie altamente reattive che possono a loro volta legarsi covalentemente ai CYPs stessi, generando molecole self modificate che vengono riconosciute come estranee dal sistema immunitario, tutto ciò può portare all'attivazione di quest'ultimo ed alla comparsa di autoanticorpi diretti sia verso la porzione alchilata della molecola (neo-antigeni) sia verso quella non

modificata (Beaune et al. 1994). Un tipico esempio di neo-antigeni sono quelli correlati agli anticorpi anti-CYP2C9 e anti-CYP1A2 indotti, rispettivamente, dall'acido tienilico e dalla diidralazina (Beaune et al. 1994; Robin et al. 1996). La diidralazina è un farmaco anti-ipertensivo, descritto in letteratura come responsabile dell'insorgenza di svariati casi di epatite grave (Bourdi et al. 1994). Dopo la somministrazione, la diidralazina viene trasformata dal CYP1A2 in un metabolita estremamente reattivo, il quale può a sua volta interagire con l'enzima stesso generando un complesso (neo-antigene) fegato-specifico, che determina l'induzione di una risposta immunitaria anomala e l'instaurarsi di una conseguente condizione patologica (Manns et al. 1997, Beaune et al. 1994, Bourdi et al. 1994). Nell'epatite indotta da diidralazina, gli autoanticorpi che riconoscono in modo specifico il CYP1A2 rappresentano un tratto peculiare della patologia stessa; in questo scenario, risulta di particolare interesse il fatto che l'auto-immunità insorga solo in alcuni pazienti, nonostante che, tutti i soggetti possano generare il metabolita ed alchilare dunque il citocromo. Tutto ciò trova un razionale nella variabilità interindividuale che si manifesta sia nella produzione delle specie reattive sia nel legame di queste ultime con l'enzima stesso (Loeper et al. 1993). Un ulteriore esempio è rappresentato dagli autoanticorpi anti-CYP2E1, che come precedentemente ricordato sono stati descritti, inizialmente, in associazione con l'epatite indotta da alotano (Bourdi et al. 1996) e, successivamente messi in evidenza in soggetti con danno epatico causato dai refrigeranti idroclorofluorocarburi (Hoet et al. 1997) o con epatite idiosincratca indotta da anestetici (Njoko et al. 2006). Elevati titoli di autoanticorpi anti-CYP2E1 sono stati inoltre mostrati in circa il 40% dei pazienti affetti da epatopatia alcolica con evidenza di danno epatico (Vidali et al. 2003). Concludendo, possiamo ricordare come siano stati, inoltre, descritti rari casi di reazione immunitarie anti-CYP in

pazienti sottoposti al trattamento farmacologico con anticonvulsivanti aromatici quali carbamazepina, fenitoina e fenobarbital (Manns et al. 1997; Mizutani et al. 2005).

### **Autoanticorpi anti-LKM1**

Gli anticorpi anti-LKM1, costituiscono un marcatore sierologico caratteristico dell'epatite autoimmune di tipo 2, tuttavia la loro presenza è stata messa in luce anche in pazienti infetti da HCV, dove raggiunge una prevalenza di circa il 6-10% (Cassani et al. 1997; Giostra et al. 1996). Nonostante, la loro scarsa frequenza gli anticorpi anti-LKM1 sono al momento i NOSA meglio caratterizzati, in particolare è stato identificato il loro bersaglio molecolare sia nella AIH che nella CHC ed in entrambi i casi è rappresentato dal citocromo P450 isoforma 2D6, una proteina microsomale coinvolta nel metabolismo di sostanze xenobiotiche. Già a partire dal 1991, Manns e colleghi avevano ipotizzato, come spiegazione alla base della presenza degli anti-LKM1 nella CHC, l'esistenza di un potenziale fenomeno di mimetismo molecolare tra la poliproteina di HCV ed il CYP2D6, in particolare, tra la proteina virale non strutturale 5B (NS5B<sub>2272-2280</sub>), la proteina dell'envelope 1 (E1<sub>313-321</sub>) ed il CYP2D6<sub>254-271</sub> (Manns et al. 1991). Quest'ipotesi è stata successivamente confermata da vari gruppi, i quali hanno messo in evidenza come questa porzione della molecola del CYP2D6 sia riconosciuta dai sieri dei pazienti HCV e contenga allo stesso tempo sia epitopi lineari che conformazionali (Bogdanos et al. 2004; Marceau et al. 2005). Ovviamente, la sequenza CYP2D6<sub>254-271</sub>, non è l'unica ad essere stata oggetto di studio; in effetti, esistono in letteratura studi che mostrano una estesa omologia tra la poliproteina di HCV e vari epitopi lineari (CYP2D6<sub>193-212</sub>, CYP2D6<sub>313-332</sub>), come anche conformazionali (CYP2D6<sub>321-379</sub>) (Kerkar et al. 2003; Ma et al. 2006; Sugimura et al. 2002). Nello specifico, Kerkar e colleghi, hanno messo in evidenza come la sequenza del CYP2D6<sub>193-212</sub> costituisca il maggior

epitopo riconosciuto dalle cellule B; in effetti, verso di esso mostrano reattività, rispettivamente, il 93% dei sieri dei pazienti con AIH-2 ed il 50% dei pazienti con CHC positivi per gli anti-LKM1. Questi autori hanno anche dimostrato l'esistenza di una estesa cross-reattività tra CYP2D6<sub>193-212</sub> e regioni altamente omologhe all'interno di specifiche proteine del virus C (HCV<sub>2977-2996</sub>) come anche del citomegalovirus (CMV<sub>121-140</sub>) (Kerkar et al. 2003). In aggiunta, è stata ulteriormente documentata l'esistenza di cross-reazioni tra la sequenza CYP2D6<sub>254-271</sub> e quelle omologhe su proteine dei virus herpes simplex tipo 1 (HSV1), CMV, Epstein-Barr (EBV) e l'adenovirus umano. Queste scoperte suggeriscono che un meccanismo "multiple hit" coinvolgente epitopi chiave sul CYP2D6 ed i loro omologhi virali possa rendere conto della generazione degli anticorpi anti-CYP (Bogdanos et al. 2001). In accordo con questo modello, ripetute esposizioni al CMV, EBV, HSV1 o altri patogeni virali comuni, potrebbero determinare condizioni immunologiche permissive attraverso l'attivazione di cross-reazioni da parte di un sottogruppo di linfociti auto-reattivi (Bogdanos et al. 2001). Mentre, in ultima analisi, l'infezione cronica da parte del virus C potrebbe quindi fornire lo stimolo finale per la generazione degli autoanticorpi anti-CYP2D6 in corso di CHC. L'ipotesi che un fenomeno di mimetismo molecolare possa determinare la comparsa e la persistenza di anticorpi anti-LKM1 è stato indirettamente dimostrato: in effetti, i soggetti che rispondono, a lungo termine, alla terapia antivirale tendono a perdere gli anti-LKM1 in concomitanza con l'eradicazione del virus (Ma et al. 2002).

Nel 1996, Giostra e collaboratori, in uno studio condotto su 62 soggetti con infezione da HCV, hanno descritto una significativa riduzione del carico virale nei pazienti positivi per gli anti-LKM1, nonostante presentassero una gravità della malattia confrontabile con quella della popolazione negativa per gli anticorpi (Giostra et al.

1996). A tal riguardo, recenti osservazioni hanno evidenziato che i pazienti positivi per gli anti-LKM1 soffrono, al momento della diagnosi, di una malattia epatica più aggressiva ed avanzata se confrontati con i soggetti negativi per i NOSA (Ma et al. 1996). Inoltre, diverse evidenze sperimentali suggeriscono che meccanismi autoimmuni possano avere un effetto sinergico con l'infezione virale nell'indurre danni epatici. Infatti, sieri di pazienti infetti da HCV, positivi per gli anti-LKM1, reagiscono con aree discrete della membrana degli epatociti, non permeabilizzati, e l'antigene riconosciuto risulta essere il CYP2D6 (Muratori et al. 2000). La presenza del CYP2D6 sulla membrana plasmatica, degli epatociti, lo rende accessibile agli effettori della risposta umorale; suggerendo un ruolo delle cellule B auto-reattive, LKM1 specifiche, e dei loro anticorpi nell'induzione e perpetuazione del danno epatico. Le risposte immunitarie nei soggetti HCV, positivi per anti-LKM1, risultano essere peculiari; in particolare, numerosi studi hanno evidenziato un peggioramento dell'epatite in seguito alla somministrazione della terapia con interferone ed una remissione al trattamento con steroidi. E' interessante notare che questo fenomeno sembrerebbe associato alla presenza dell'allotipo HLA B51 (Monti et al. 2005; Bortolotti et al. 1996; Garcia-Buey et al. 1995; Lijima et al. 2001; Muratori et al. 1994; Todros et al. 1995), che potrebbe costituire dunque un fattore di rischio. Tuttavia, complessivamente la risposta al trattamento antivirale non differisce nei pazienti positivi per gli anti-LKM1 rispetto ai siero-negativi

Va ricordato che l'auto-reattività anti-citocromi, nelle varie patologie, non si manifesta unicamente come immunità umorale. Infatti, a livello cellulare, Ma e colleghi (Ma et al. 2006) hanno dimostrato che in alcuni pazienti con CHC, le cellule T CD4+ sono in grado di riconoscere il peptide CYP2D6<sub>313-332</sub>. Il riconoscimento di questa sequenza self, la quale condivide una estesa omologia di sequenza con il peptide HCV<sub>794-801</sub>,

potrebbe essere cruciale nel guidare la perdita della tolleranza verso il self e lo sviluppo di autoimmunità nell'infezione cronica C (Ma et al. 2002).

Kammer e collaboratori (Kammer et al. 1999) hanno invece caratterizzato la risposta dei linfociti T citotossici verso il peptide HCV<sub>178-187</sub>, che rappresenta un noto epitopo riconosciuto dai CTLs circolanti nel sangue periferico dei pazienti con CHC. In particolare, questo epitopo mostra una stretta omologia di sequenza con il CYP2A6 ed il CYP2A7 umani (Kammer et al. 1999). Sulla base di queste osservazioni, i peptidi omologhi di HCV, del CYP2A6 e del CYP2A7 sono stati utilizzati per indurre l'attivazione dei CTLs, i quali a loro volta sono stati testati per valutare la loro capacità di riconoscere i tre diversi epitopi (Kammer et al. 1999). Sorprendentemente, i CTLs indotti con il peptide di HCV cross-reagiscono con i peptidi del CYP2A6 e del CYP2A7 ed inoltre sono in grado di lisare cellule trasfettate, stabilmente, con un plasmide codificante per l'intera molecola del CYP2A6 (Kammer et al. 1999). Questi dati hanno dimostrato che le cellule T, specifiche per HCV, possono riconoscere l'epitopo del CYP2A6 presentato attraverso le molecole MHC di classe I, mettendo in evidenza la loro capacità di indurre l'attivazione di cellule T CD8+ auto-reattive (Kammer et al. 1999).

### **Autoanticorpi anti-citocromo P450 2E1**

Nel 2001, Miyakawa e colleghi, hanno descritto per la prima volta la presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 in corso di CHC, nello specifico, tali autori hanno identificato tramite western blotting come il 4-6% dei pazienti, rispettivamente, LKM-1 positivi e negativi sviluppavano anticorpi anti-CYP2E1 (Miyakawa et al. 2001). Più recentemente, un lavoro condotto nel nostro laboratorio ha confermato come le IgG dirette verso il CYP2E1 siano significativamente incrementate nei pazienti HCV

rispetto a controlli sani. Tale studio ha inoltre messo in luce come la prevalenza dei suddetti anticorpi, nel corso dell'infezione cronica C, risulti essere circa del 40%, vale a dire nettamente superiore a quella descritta in precedenza (Vidali et al. 2007). Questi anticorpi non cross-reagiscono con il CYP2D6 e non sono associati né con il genere né con l'età od il genotipo virale. Inoltre, la prevalenza di IgG anti-CYP2E1 non è significativamente diversa se confrontiamo tra loro pazienti con CHC astemi o consumatori abituali di alcol (Vidali et al. 2007). Nonostante che, la presenza di anticorpi anti-CYP2E1 sia risultata indipendente da un aumento delle transaminasi, i pazienti con epatite all'interfaccia periportale/perisetale moderata o grave (score >1) mostrano titoli anticorpali anti-CYP2E1 significativamente superiori rispetto a quelli con score ≤1. Inoltre, l'analisi di regressione multivariata ha confermato come esista una significativa associazione tra la presenza di IgG anti-CYP2E1 e la gravità della epatite da interfaccia periportale/perisetale, ciò indipendentemente dai livelli delle  $\gamma$ -globuline circolanti (Vidali et al. 2007). Queste osservazioni inducono a pensare che probabilmente l'auto-reattività anti-CYP2E1 possa in qualche maniera partecipare all'induzione ed alla perpetuazione del danno epatico nei pazienti con CHC. In effetti, l'esistenza di un potenziale contributo patogenetico da parte degli autoanticorpi anti-CYP2E1 è stata suggerita da una serie di evidenze sperimentali, nelle quali è stato dimostrato come, diverse isoforme del citocromo P450 siano trasportate, mediante vescicole di secrezione, dal reticolo endoplasmatico alla membrana cellulare degli epatociti, dove sono esposte a livello extracitoplasmatico (Loeper et al. 1993; Wu et al. 1992; Neve et al. 1996). In effetti, in esperimenti di microscopia confocale è stato confermato come gli autoanticorpi anti-CYP2E1 siano in grado di legare il CYP2E1 espresso sul lato extracitoplasmatico della membrana plasmatica di epatociti di ratto (Vidali et al. 2007). Tali osservazioni sono in accordo con precedenti studi che hanno dimostrato come, gli anticorpi LKM1 associati con l'epatite autoimmune e l'infezione

C, come pure gli autoanticorpi anti-CYP2E1 nei pazienti con epatite da alcolano legano, rispettivamente, il CYP2D6 ed il CYP2E1 a livello della membrana cellulare (Muratori et al. 2000; Bourdi et al. 1996).

L'elevata prevalenza ed il potenziale contributo patogenetico degli autoanticorpi anti-CYP2E1, nella CHC, ci hanno indotto a studiare la suddetta auto-reattività in una più ampia popolazione di pazienti, al fine di implementare le nostre conoscenze circa la prevalenza, il significato clinico ed i meccanismi alla base della genesi della stessa.

## MATERIALI E METODI

### **Reclutamento di pazienti e controlli.**

Per questo studio sono stati esaminati 137 pazienti affetti da epatite cronica C (CHC) afferiti consecutivamente all'Ospedale Maggiore della Carità di Novara. L'infezione da virus C è stata confermata dalla rilevazione di anticorpi anti-HCV, utilizzando un test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) di seconda generazione (Ortho Diagnostic System, Milano, Italy), e dell'HCV-RNA tramite kit Amplicor HCV (Roche Diagnostic System). Il genotipo virale è stato determinato impiegando il kit INNO-Lipa (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium), secondo le indicazioni del produttore. Tutti i pazienti erano negativi per la presenza di antigeni di superficie del virus HBV e di anticorpi anti-HIV e non erano affetti da altra patologia epatica. Il consumo alcolico giornaliero è stato valutato al momento del ricovero, utilizzando un questionario standardizzato descritto da Corrao e colleghi (Corrao et al. 1991). Le caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione in studio sono mostrate in Tabella 1. 65 controlli sani senza infezione da HCV provenienti dalla stessa area geografica, e comparabili per sesso ed età alla popolazione in studio, sono stati reclutati tra il personale ospedaliero e universitario. Tutti i controlli presentavano un consumo alcolico entro i limiti indicati dalle linee guida WHO.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico e tutti i pazienti inclusi nello studio hanno fornito il loro consenso informato scritto. I campioni di sangue (5 ml) sono stati prelevati la mattina a digiuno per la preparazione del siero. Tutti i gruppi non assumevano alcol almeno nelle 24 ore precedenti il prelievo.

La biopsia epatica è stata effettuata in 113 pazienti all'inizio dello studio con tecnica di Menghini. Nei restanti pazienti, la presenza di controindicazioni severe associate

alla cirrosi epatica ha precluso l'analisi. Ogni biopsia è stata valutata in cieco da un anatomopatologo per grading e staging, secondo la classificazione di Ishak (Ishak et al. 1995).

### **Misurazione degli autoanticorpi anti-CYP2E1 con saggio immunoenzimatico in fase solida.**

Per la ricerca degli autoanticorpi anti-CYP2E1 sono state utilizzate delle piastre di polistirene per ELISA (Nunc-Immuno Maxi-Sorp, Nunc, S/A, Roskilde, Denmark). Metà dei pozzetti sono stati ricoperti con 18,5 nM di CYP2E1 (Oxford Biochemicals Inc. Oxford, MI, USA) solubilizzato in buffer bicarbonato 0,1 M a pH 9,6 ed incubato overnight a 4°C. I rimanenti pozzetti sono stati riempiti con lo stesso volume di solo buffer bicarbonato. I siti di legame non specifici sono stati bloccati con 0,3 ml di coating buffer contenente il 3% (w/v) di BSA in PBS a pH 7,4 per 1 h a 37°C. I sieri dei pazienti (0,2 ml diluiti 1:50 in coating buffer) sono stati piastrati in duplicato ed incubati per 1 ora a 37°C. Dopo cinque lavaggi con PBS 0,25% (v/v) Triton X-100, ai pozzetti sono stati aggiunti 0,2 ml di siero anti-human di capra coniugato con perossidasi (diluizione 1:5000 in coating buffer) (Dako S.p.A., Milano, Italy). Dopo 1 h di incubazione a 37°C e ulteriori cinque lavaggi con PBS 0,25% (v/v) Triton X-100, la reattività anticorpale è stata valutata tramite l'aggiunta di una miscela di reazione contenente 0,4 mg/ml di 1-phenylendiamine, 0,4 µl/ml di perossido di idrogeno (30%), 5,1 mg/ml di acido citrico e 6,1 mg/ml di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anidro), a pH 5,0. I risultati sono stati espressi come densità ottica (o.d.) a 490 nm dopo aver sottratto alla reattività anti-CYP quella di background dei rispettivi pozzetti con il solo tampone bicarbonato.

**Induzione dell'espressione del citocromo P450 isoforma 2E1.**

Per indurre l'espressione del CYP2E1 è stato somministrato, a ratti maschi di ceppo Wistar, un bolo intragastrico (5ml/kg/die) di acetone 30% (v/v) in soluzione fisiologica, per due giorni consecutivi. Il terzo giorno, i ratti sono stati anestetizzati e sacrificati per l'isolamento degli epatociti.

**Isolamento degli epatociti.**

Gli epatociti primari sono stati isolati da fegato di ratti maschi di ceppo Wistar con peso corporeo di 250-300gr (Harlan Italy S.Pietro al Natisone (UD), Italia), utilizzando la tecnica della perfusione "in situ" con collagenasi. L'uso e cura degli animali sono stati approvati dal Ministro Italiano della Salute e dalla Commissione Università per la Cura degli animali rispettando le direttive del Consiglio nazionale della Ricerca Italiana. I ratti sono stati anestetizzati iniettando intraperitonealmente una soluzione di pentotal sodico (50mg/Kg di peso corporeo) alla quale è stata aggiunta eparina (37mg/Kg di peso corporeo). Agli animali è stata aperta la cavità addominale ed è stata incanalata la vena porta. Il fegato è stato perfuso per 10 minuti con il tampone salino T1 (NaCl 143mM, KCl 7mM ed Hepes 10 mM a pH 7.4) mantenuto a 37°C, con un flusso costante di 7.5 unità di pressione grazie all'utilizzo di una pompa peristaltica LKB Bromma 2115. Dopo questa prima fase di lavaggio del fegato, l'organo è stato perfuso con 200ml di tampone salino T2 (NaCl 100mM, KCl 40mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, la collagenasi di tipo I 0.05%, tampone Hepes-NaOH 500mM, pH 7.4), anch'esso mantenuto a 37°C, con un flusso costante di 4 unità di pressione. Il fegato così digerito è stato rimosso dall'animale e risospeso in 50ml di terreno DMEM5671 (Sigma) e gli epatociti sono stati purificati attraverso tre centrifugate da 5 minuti l'una a 500 rpm, seguite da un'ultima centrifugata 1050 rpm su gradiente di Percoll.

Dopo questo procedimento è stato effettuato il conteggio delle cellule utilizzando una camera Burkner ed è stata valutata la vitalità cellulare attraverso la conta al microscopio degli epatociti sfruttando il test di esclusione del Blu Tripiano. Dopo il conteggio la sospensione cellulare viene portata ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml.

**Valutazione della capacità di sieri HCV di riconoscere il CYP2E1 espresso sulla membrana degli epatociti in citofluorimetria a flusso.**

Gli epatociti primari,  $1 \times 10^6$  cellule per punto sperimentale, sono stati risospesi in 500  $\mu$ l di PBS-BSA 0,1% freddo, contenente, rispettivamente, un siero di un paziente HCV (diluito 1:50) o un anticorpo policlonale di coniglio anti-CYP2E1 (diluito 1:250), mentre per il controllo negativo è stato aggiunto solo PBS 1X. Quindi, i campioni sono stati incubati sul rotore orbitale per 1h a 4°C. Successivamente, gli epatociti sono stati lavati con 500  $\mu$ l di PBS-BSA 0,1% e risospesi nuovamente in PBS-BSA 0,1% contenente, rispettivamente, l'anticorpo secondario (diluito 1:100) anti-human IgG o anti-rabbit IgG coniugati con il FITC (Fluoresceina isotiocianato). Incubati 30 minuti su rotore orbitale a 4°C. A questo punto dopo aver effettuato un lavaggio con PBS-BSA 0,1%, i campioni sono stati risospesi, in 700 $\mu$ l di PBS 1X, ed analizzati al FACScan Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). I dati ottenuti da ciascun esperimento sono stati analizzati usando il programma WINMDI.

**Preparazione di CYP2E1 ricombinante umano wild-type e isoforme mutate mediante espressione in *E. Coli*.**

Il plasmide di espressione pCWori+ (Barnes, 1996) contenente l'insero codificante per il CYP2E1 wild-type è stato gentilmente donato dal Prof. Magnus Ingelman-Sundberg della Divisione di Tossicologia Molecolare, Istituto di Medicina Ambientale, Istituto Karolinska, Stoccolma, Svezia. In particolare alla sequenza del CYP2E1 sono

stati aggiunti 6 residui di istidina all'estremità C-terminale e, per ottimizzare l'espressione, sono stati eliminati i nucleotidi codificanti i primi 18 aminoacidi (Gillam et al. 1994). Per l'espressione delle isoforme mutate di CYP2E1 (vedi Tabella sottostante) sono stati utilizzati plasmidi disponibili presso il nostro laboratorio e preparati come descritto precedentemente (Vidali et al. 2004).

Numero	Mutazione
1	Lys324 →Ala324
2	Arg331 →Ala331
3	Lys342 →Ala342
4	Arg344 →Ala344
5	Glu346 →Ala346
6	Lys420 →Ala420
7	Phe421 →Ala421
8	Lys243,Glu244,Glu248,Lys251 ↓ Ala243,Ala244, Ala248,Ala251

*Elenco delle isoforme mutate di CYP2E1 espresse in E. Coli ed utilizzate per gli esperimenti di immunoprecipitazione.*

Cellule Supercompetenti XL1 Blue di E. Coli (70 µl) sono state trasformate per shock termico con 1 µl delle soluzione di CYP2E1 plasmidico wild-type o mutato e successivamente selezionate con piastre LB agar contenenti ampicillina. Singole colonie sono state ulteriormente cresciute per 16 h a 37°C e 10 h a 4°C in terreno LB più ampicillina. 2 ml di queste colture sono stati aggiunti ad una soluzione contenente 178 ml di TB-medium (Bacto-Tryptone 1,2% (w/v), estratto di lievito 2,4% (w/v), glicerolo 0,4% (v/v), 20 ml di buffer potassio-fosfato 0,17 M (0,17 M di idrogenofosfato di potassio, 0,72 M idrogenofosfato di di-potassio), 200 µl di ampicillina (50mg/ml), 200 µl di tiamina (1 M), 200 µl di acido δ-amino levulinico o d-ALA (0,5 M) e 200 µl di FeCl<sub>3</sub> (25 mM). La miscela di reazione è stata quindi incubata a 37°C in agitazione continua. La crescita batterica è stata monitorata spettrofotometricamente. Al raggiungimento di una densità ottica (o.d.) di 0,7 unità,

alla miscela sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di IPTG (1 M) e 20  $\mu$ l di imidazolo (0,5 M) a cui è seguita una successiva incubazione a 30°C in agitazione continua per 24 h.

### **Purificazione e misurazione di CYP2E1 wild-type umano.**

Le colture sono state trasferite in tubi da centrifuga e raffreddate in ghiaccio per 15 minuti. Dopo centrifugazione a 2800 g per 12 minuti a 4°C, i pellet sono stati risospesi in buffer TSE a 4°C (Tris-Acetato 50 mM a pH 7,6, saccarosio 250 mM, EDTA 0,25 mM) e in 0,25 mg/ml di lisozima. Dopo un'incubazione di 30-60 minuti in ghiaccio, gli sferoblasti sono stati recuperati per centrifugazione a 2800 g per 12 minuti a 4°C, risospesi in 100 mM di potassio fosfato buffer a pH 7,6, 6 mM di Mg-Acetato, 20% di glicerolo, 25  $\mu$ l/ml di inibitori di proteasi (Hoffmann-La Roche) e lisati per sonicazione. I lisati batterici sono stati quindi centrifugati a 12000 g per 12 minuti a 4°C. Dopo trasferimento dei surnatanti in tubi da ultracentrifuga e centrifugazione a 100000 g per 60 minuti a 4°C, i pellet sono stati prima risospesi in 2 ml di 50 mM di sodio fosfato buffer a pH 7,4, 300 mM di NaCl, 5 mM di imidazolo, 20% di glicerolo, 1% di sodio deossicolato e 1 mM di PMSF, omogeneizzati, incubati per 20 minuti e di nuovo centrifugati a 100000 g per 60 minuti a 4°C. I surnatanti sono stati quindi incubati con 0,5 ml di resina al Nickel (QIAGEN) per 1 h a 4°C e le miscele resina-campione sono state applicate alle colonne per la successiva separazione. Le colonne sono state lavate 4 volte con 4 ml di 50 mM di sodio fosfato buffer a pH 7,4, 300 mM di NaCl, 10 mM di imidazolo, 20% di glicerolo, 0,1% di sodio deossicolato e le frazioni contenenti il CYP2E1 sono state eluite con 0,5 ml di 50 mM di Tris-HCl a pH 7,4, 100 mM di NaCl, 500 mM di imidazolo, 20% di glicerolo, 1 mM di CaCl<sub>2</sub> e 0,1% di sodio deossicolato. La quantità ed il corretto folding di CYP2E1 wild-type sono stati controllati tramite lettura spettrofotometrica a 450 nm in presenza di sodio

ditionito e CO, in accordo con il protocollo originale di Omura e Sato (Omura et al. 1964).

### **Valutazione dell'autoreattività anti-CYP2E1 tramite western blot ed immunoprecipitazione.**

Il CYP2E1 ricombinante umano ( 9,6 pmol ) è stato solubilizzato in 15 µl di SDS buffer a pH 6,8 ( SDS 4% (w/v), 0,2 mol/l di Tris-HCl, 26% di glicerolo (v/v)) e usato per elettroforesi SDS/PAGE (90 minuti a 100 V, stacking gel al 4% e resolving gel al 10%). Dopo trasferimento su gel di nitrocellulosa Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Amersham, UK) (60 minuti a 100 V), la membrana è stata incubata con sieri umani (diluiti 1:100) o con un siero anti-istidina (diluizione 1:2000) (Amersham Biosciences, Amersham, UK). Il legame degli anticorpi è stato rivelato con immunoglobuline anti-human (diluizione 1:5000) o anti-mouse (diluito 1:2000) coniugate con perossidasi e reagente Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) e con apparecchiatura VersaDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA).

Per gli esperimenti di immunoprecipitazione sono stati utilizzati il CYP2E1 wild-type ricombinante umano espresso in laboratorio come descritto precedentemente oppure forme mutate di CYP2E1 già disponibili presso il Laboratorio di Patologia Generale ( vedi tabella paragrafo precedente). 10 pmol di CYP2E1 wild-type o mutato sono stati disciolti in RIPA buffer (50 mmol/l di Tris/HCl, 1% di NP-40, 0,25% di sodio deossicolato, 150 mmol/l di NaCl e 1 mmol/l di EDTA a pH 7,4) a cui sono stati aggiunti 5 µl di siero umano (volume finale 100 µl con diluizione finale siero 1:20) ed incubati per 16 ore a 4°C su rotore orbitale. Dopo incubazione per 2 ore a 4°C con 50 µl di proteina A-sepharosio CL4B (1:1 sospensione in PBS) (Amersham Biosciences, Amersham, UK), gli immunocomplessi legati vengono recuperati tramite

centrifugazione, lavati tre volte con 1 ml di PBS e sottoposti a western blot, utilizzando come anticorpo rivelatore della proteina CYP2E1 un siero anti-istidina di topo. L'intensità delle bande ottenute con le differenti forme mutate di CYP2E1 è stata misurata tramite videodensitometria, utilizzando il software Quantity One versione 4.5.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), ed espressa come percentuale di intensità residua rispetto al CYP2E1 wild-type.

### **Allineamento delle sequenze aminoacidiche e generazione di un modello molecolare di CYP2E1.**

Le sequenze aminoacidiche, in formato FASTA, del CYP2E1 umano (P05181) e delle RNA polimerasi di differenti genotipi di HCV, contenute nel database Swiss-Prot/TrEMBL accessibile al sito web Expasy (<http://www.expasy.org>), sono state allineate utilizzando il programma di allineamento multiplo di sequenze proteiche ClustalW, disponibile al sito web dell'Istituto Europeo di Bioinformatica EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). La rappresentazione grafica degli allineamenti è stata ottenuta utilizzando il software BOXSHADE versione 3.21, disponibile al sito web EMBnet ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

Per generare un modello molecolare di CYP2E1 è stato utilizzato il server automatico di modellazione per omologia di struttura SWISS-MODEL, accessibile dal server web Expasy (<http://www.expasy.org/swissmod/>), fornendo il codice SWISS-PROT di CYP2E1 umano (P05181) e indicando come template la struttura di CYP2C5 di coniglio (codice ExpDB 1DT6A), che condivide una discreta omologia di sequenza aminoacidica (54,1%) con il CYP2E1. La minimizzazione dell'energia del modello è stata ottenuta usando l'algoritmo GROMOS96; la radice dell'errore quadratico medio (Root Mean Square Error, RMSE) e le distanze interatomiche sono state calcolate usando il software DeepView-SwissPdbViewer (versione 3.7). La visualizzazione

grafica è stata ottenuta utilizzando il software RasTop (versione 2.6.4) di Philippe Valadon (La Jolla, CA).

### **Analisi di potenziali cross-reazioni tra CYP2E1 e proteine di HCV.**

Dopo aver individuato una buona omologia di sequenza tra i peptidi 324-334 e 335-346 di CYP2E1 e, rispettivamente, i peptidi 438-449 e 456-465 della proteina virale NS5B, abbiamo valutato la presenza di un'eventuale omologia a livello strutturale. A tal fine, avvalendoci del modello molecolare del CYP2E1, e tramite l'ausilio del software RasTop, abbiamo isolato la sequenza aminoacidica di interesse e generato un modello tridimensionale della regione contenente il peptide 324-346. Similmente abbiamo utilizzato il modello tridimensionale della proteina virale NS5B genotipo 1b (codice 1C2P), l'unica al momento disponibile nella banca dati RCSB Protein Data Bank (PDB) accessibile dal sito internet <http://www.rcsb.org>, per generare un modello tridimensionale del peptide virale 421-480aa. Infine, utilizzando il software DeepView-SwissPdbViewer, abbiamo confrontato i due modelli così realizzati, per valutare l'esistenza di motivi strutturali omologhi. L'analisi al computer ha dimostrato che i due modelli tridimensionali presentavano una buona sovrapposizione (RMSE = 0,062 nm).

### **Clonaggio dei peptidi 438-449 e 456-465 della RNA-polimerasi RNA-dipendente (NS5B) di HCV omologa al CYP2E1 umano.**

Per generare le sequenze nucleotidiche di NS5B omologhe al CYP2E1 umano è stata realizzata una reazione di PCR in assenza di DNA come stampo. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 20  $\mu$ l, utilizzando per la miscela di reazione: primer forward e reverse (tabella sottostante) tra loro parzialmente sovrapponibili (18

bp) 0.5  $\mu$ M,  $T_m$  56°C (Biomers),  $MgCl_2$  1.5 mM (Fermentas), dNTPs 0.5 mM (Fermentas), Dream Taq polymerase 0.5 U/ $\mu$ l (Fermentas).

In particolare, il primer forward comprende la sequenza codificante per un linker glicina-serina, mentre entrambi gli oligonucleotidi recano un sito di riconoscimento per gli enzimi di restrizione utilizzati successivamente per consentire l'inserimento del prodotto di amplificazione in un vettore di espressione.

Gli amplificati ottenuti, dopo aggiunta del colorante "Orange G" DNA Loading Buffer (6X), sono stati analizzati attraverso elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio 1.5% (45 minuti a 100 V) in TAE (40 mM Tris, 40 mM acido acetico, 1 mM EDTA pH 8), e rivelati con GelRed (10000X) (Biotium, Hayward, CA). Per l'acquisizione delle immagini della corsa elettroforetica è stato utilizzato il sistema GelDoc Imaging XR System (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA).

I campioni sono stati successivamente purificati dal gel di agarosio avvalendosi del kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). Un'aliquota di ciascun campione è stata sottoposta ad un'ulteriore corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,5% (45 minuti 100 V) per controllare la resa dello step di purificazione, e quantificata al transilluminatore (BioRad UVGen), mediante confronto con un marker di DNA (GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus).

<b>NS5B1b<sub>438-449</sub> forward</b>	GCTAGCGCGCATGGTGGAGGTGGCTCCCACTTGAGAAAGCCCTAGATTGTCAG
<b>NS5B1b<sub>438-449</sub> reverse</b>	CGATGCTAGCCCCGTAGATCTGACAATCTAGGGCTTTCTC
<b>NS5B1b<sub>456-465</sub> forward</b>	GCTAGCGCGCATGGTGGAGGTGGCTCCCACTTGACCTACCT CAG
<b>NS5B1b<sub>456-465</sub> reverse</b>	CGATGCTAGCTCGTTCAATGATCTGAGGTAGGTCAAGTGG

*Elenco dei primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione dei peptidi NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub> di HCV genotipo1b.*

Il templatò è stato poi sottoposto a reazione di sequenza (BigDye terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem) ed analizzato con sequenziatore

automatico (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer). Successivamente, una versione modificata del vettore di espressione pGex4T-1, e lo stesso inserto sono stati digeriti attraverso enzimi di restrizione BssHII e NheI e successivamente sottoposti a reazione di ligazione con DNA ligasi per l'inserimento del frammento di DNA nel vettore di clonaggio. Dopodiché, cellule competenti di E.coli (DH5 $\alpha$ ) sono state trasformate, per shock termico, con i differenti plasmidi e selezionate su piastre LB agar contenenti ampicillina.

### **Espressione e purificazioni delle proteine di fusione GST-NS5B<sub>438-449</sub> e GST-NS5B<sub>456-465</sub>.**

Le singole colonie sono state cresciute in terreno LB contenente ampicillina (50  $\mu$ g/ml) fino al raggiungimento di una densità ottica (o.d.) di 0,6 unità, a questo punto alla coltura è stato aggiunto IPTG alla concentrazione finale di 1 mM, ed è seguita una successiva incubazione a 30°C in agitazione continua per 5h. Le colture sono state trasferite in tubi da centrifuga e centrifugate per 15 minuti a 1250g. Dopo centrifugazione i pellet sono stati risospesi in PBS 1X, pH 7.4, contenente 1% di Triton-X-100, Lisozima (0,25 mg/ml), PMSF (1mM), EDTA (1mM) ed inibitori delle proteasi (25 $\mu$ l/ml; Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland), e lisati per sonicazione. Dopo 15 min di centrifugazione a 13000g, gli estratti batterici sono stati incubati su rotore orbitale per 1h a 4°C, con resina Glutathione-Agarosio (Sigma-Aldrich), ed i peptidi coniugati con il GST (GST-NS5B<sub>438-449</sub> e GST-NS5B<sub>456-465</sub>) sono stati purificati tramite cromatografia di affinità usando come eluente glutathione ridotto 10mM in Tris-HCl 50mM, pH 9.5.

**Valutazione della cross-reattività tra i peptidi virali NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub> e gli autoanticorpi anti-CYP2E1 mediante ELISA e saggi di competizione.**

Per valutare la cross-reattività in ELISA dei sieri dei pazienti CHC con i peptidi virali omologhi al CYP2E1 sono state utilizzate delle piastre di polistirene (Nunc-Immuno Maxi-Sorp, Nunc, S/A, Roskilde, Denmark). Metà dei pozzetti sono stati ricoperti con 2µg dell'uno o dell'altro peptide, l'altra metà invece con la sola proteina carrier (GST), il tutto solubilizzato in buffer bicarbonato 0,1 M a pH 9,6 ed incubato overnight a 4°C. Per gli esperimenti di competizione i sieri umani sono stati incubati overnight su rotore orbitale con 0,1nmol/ml di CYP2E1 o, in alternativa, con 4µg/ml, rispettivamente, di GST-NS5B<sub>438-449</sub> e GST-NS5B<sub>456-465</sub> o GST. Gli immunocomplessi sono stati separati per centrifugazione a 13000g per 8 min ed i surnatanti sono stati testati per la loro reattività, in ELISA, nel primo caso verso GST-NS5B<sub>438-449</sub> e GST-NS5B<sub>456-465</sub> mentre nel secondo verso il CYP2E1.

**Induzione della perdita della tolleranza verso il CYP2E1 nel topo mediante immunizzazione con i peptidi virali NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub>.**

Topi maschi di ceppo FVB sono stati immunizzati attraverso l'inezione sottocute di una soluzione contenente 100 µg, rispettivamente, di NS5B<sub>438-449</sub>, NS5B<sub>456-465</sub> o della sola GST risospesi in PBS 1X e un equal volume di adiuvante di Freund completo (Sigma-Aldrich, Milano). Dopo tre settimane ai topi è stata iniettata una seconda dose di antigene con l'aggiunta questa volta dell'adiuvante di Freund incompleto (Sigma-Aldrich, Milano). A distanza di una settimana i topi sono stati sacrificati ed è stato prelevato il sangue, ed al fine di ottenere il siero è stato centrifugato a 14000 rpm per 8 min. Dopodichè, il CYP2E1 ricombinante umano ( 9,6 pmol ) è stato solubilizzato in 15 µl di SDS buffer a pH 6,8 ( SDS 4% (w/v), 0,2 mol/l di Tris-HCl, 26% di glicerolo (v/v)) e usato per elettroforesi SDS/PAGE (90 minuti a 100 V, stacking gel al 4% e resolving gel al 10%). Dopo trasferimento su gel di

nitrocellulosa Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Amersham, UK) (60 minuti a 100 V), la membrana è stata incubata con sieri murini (diluiti 1:100) o con un siero policlonale anti-CYP2E1 (diluizione 1:5000) (Chemicon). Il legame degli anticorpi è stato rivelato con immunoglobuline anti-rabbit (diluizione 1:10000) o anti-mouse (diluito 1:2000) coniugate con perossidasi e reagente Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) e con apparecchiatura VersaDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA).

#### **Analisi dei dati e statistica.**

Per l'analisi statistica dei dati è stato impiegato il software statistico SPSS versione 15.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Le differenze tra i gruppi sono state stimate con test non parametrico Mann-Whitney o Kruskal-Wallis e con test Chi-quadro o test esatto di Fisher. L'intervallo di confidenza è stato calcolato usando il software CIA versione 2.1.1 (T Bryant, University of Southampton, UK). L'effetto indipendente delle variabili significative all'analisi univariata e multivariata è stato calcolato usando l'analisi di regressione logistica. L'adattamento alla distribuzione normale è stato valutato con i test di Kolmogorov-Smirnov e di Shapiro-Wilk. In presenza di una consistente deviazione dall'ipotesi di normalità, questa è stata corretta, quando possibile, attraverso trasformazione logaritmica.

LO SCOPO DELLA PRESENTE TESI DI DOTTORATO È STATO:

- Lo studio del ruolo dell'auto-reattività anti-CYP2E1 nella patogenesi e nella progressione del danno epatico in funzione della specificità anticorpale.
- La caratterizzazione della specificità antigenica degli auto-anticorpi anti-CYP2E1: identificazione di epitopi conformazionali maggiori.
- La valutazione dei meccanismi potenzialmente coinvolti nella perdita della tolleranza al self verso il CYP2E1.

## RISULTATI

**Autoanticorpi anti-CYP2E1: prevalenza, specificità antigenica e contributo patogenetico alla progressione della patologia epatica in corso di CHC.**

La presenza di autoanticorpi circolanti anti-CYP2E1 è stata valutata, mediante saggio ELISA in 137 pazienti affetti da CHC ed in 65 controlli sani confrontabili con i primi per età, sesso e provenienza geografica. I titoli di autoanticorpi anti-CYP2E1 erano significativamente aumentati nei pazienti con epatite cronica C rispetto ai controlli (o.d. 490nm  $0,427 \pm 0,255$  vs  $0,174 \pm 0,159$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 2). L'analisi delle frequenze ha mostrato che autoanticorpi anti-CYP2E1 a titoli superiori al 97° percentile della popolazione dei controlli erano evidenziabili in 52 (38%) pazienti affetti da HCV (Figura 2).

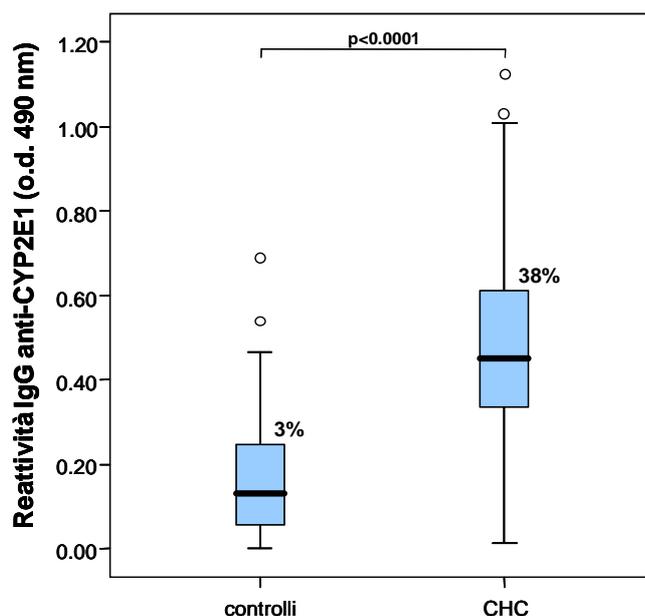


Figura 2: Diagrammi a scatola delle reattività IgG verso CYP2E1 del gruppo di controllo e dei pazienti con infezione cronica da HCV. I risultati sono espressi come unità di densità ottica a 490nm. Le scatole comprendono i valori tra il 25° e il 75° percentile, le linee in neretto rappresentano le mediane, le linee al di fuori delle scatole si estendono dal 10° al 90° percentile (80% dei valori), mentre le osservazioni estreme sono rappresentate da cerchi. I valori sopra le scatole indicano la percentuale dei soggetti con autoanticorpi in cui i titoli superano la soglia di positività, calcolata come 97° percentile della popolazione dei controlli (differenza di positività 35%, 95% IC 24-46%).

Ad ulteriore conferma di osservazioni pregresse, la presenza di auto-anticorpi anti-CYP2E1 non è risultata associata all'età, sesso, BMI, consumo alcolico né tanto

meno ad uno specifico genotipo virale oppure ad un aumento delle transaminasi e delle  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasi. I pazienti positivi, per gli autoanticorpi anti-CYP2E1, se confrontati con quelli negativi, hanno un età significativamente superiore ( $58.1 \pm 14.8$  vs  $52.7 \pm 12.5$  anni;  $p=0.027$ ) ed allo stesso tempo mostrano un aumento dei livelli di gamma globuline circolanti ( $1.72 \pm 0.61$  vs  $1.47 \pm 0.33$  g/dl;  $p=0.026$ ). Al contrario, sia la presenza di steatosi, sia lo score di necro-infiammazione (grading) come pure quello di fibrosi (staging) sono risultati comparabili tra i pazienti positivi e negativi per l'auto-reattività anti-CYP2E1 (Tabella 3).

	Anti-CYP2E1 IgG negativi (n=85)	Anti-CYP2E1 IgG positivi (n=52)	Signif
Età (anni)	52,7 (43,3-61,2)	58,1 (48,4-67,0)	<b>P=0,027</b>
Consumo alcolico (g/die)	8,6 (0,0-40,0)	0,0 (0,0-20,0)	P=0,136
Indice di massa corporea (BMI)	24,4 (22,9-27,0)	23,5 (21,1-27,4)	P=0,242
Volume corpuscolare medio eritrocitario (MCV) (fl)	89,2 (85,9-92,3)	88,3 (83,6-93,0)	P=0,286
Aspartato aminotransferasi (AST) (U/l)	52,0 (37,0-80,0)	69,0 (42,5-94,3)	P=0,064
Alanino aminotransferasi (ALT) (U/l)	76,0 (39,0-115,0)	91,5 (57,8-140,3)	P=0,122
$\gamma$ -glutamiltanspeptidasi ( $\gamma$ GT) (U/l)	38,0 (19,5-72,0)	48,0 (24,0-98,5)	P=0,324
Fosfatasi alcalina (ALP) (U/l)	159,0 (133,0-208,0)	192,0 (138,0-255,0)	P=0,223
Bilirubina ( $\mu$ mol/l)	0,76 (0,55-1,14)	0,80 (0,60-1,19)	P=0,380
Attività protrombinica (INR)	1,06 (1,00-1,14)	1,05 (1,00-1,11)	P=0,902
Albumina (g/dl)	4,2 (4,0-4,5)	4,3 (3,8-4,4)	P=0,811
Gammaglobuline (g/dl)	1,47 (1,20-1,69)	1,72 (1,38-1,90)	<b>P=0,026</b>
Sideremia ( $\mu$ mol/l)	112,5 (85,0-149,8)	105,0 (75,5-166,5)	P=0,756
Transferrina (mg/dl)	212,5 (147,5-265,8)	219,0 (178,0-269,8)	P=0,603
Ferritina (ng/ml)	259,0 (118,5-418,0)	96,0 (26,0-261,0)	<b>P=0,049</b>
Steatosi (pos)	45 (53%)	23 (44%)	P=0,380
Necro-infiammazione (grading)	4 (3-6)	4 (3-5)	P=0,648
Fibrosi (staging)	2 (2-3)	3 (2-4)	P=0,166

Tabella 3: *Caratteristiche biochimiche e cliniche dei pazienti CHC con e senza autoanticorpi anti-CYP2E1. I valori sono espressi come mediana e range interquartile (IQR).*

Precedenti osservazioni sperimentali avevano messo in luce come gli autoanticorpi anti-CYP2E1 differiscano nella loro specificità antigenica, ed in particolare sia presente una buona frazione di pazienti con immunoglobuline che riconoscono preferenzialmente epitopi conformazionali, le quali non sono più in grado di legare il loro bersaglio una volta che quest'ultimo è stato privato della propria struttura tridimensionale (Vidali et al. 2004). Sulla base di queste evidenze, abbiamo deciso di

realizzare un secondo screening dei nostri pazienti per definire complessivamente la specificità antigenica delle immunoglobuline anti-CYP2E1. A tal fine, i sieri dei 52 pazienti positivi, al primo step di selezione, sono stati diluiti in funzione della loro reattività in ELISA, in modo da rendere i titoli anticorpali paragonabili ed utilizzati per valutare la capacità degli stessi di riconoscere il CYP2E1 ricombinante umano, in condizioni denaturanti e riducenti dell'analisi in western blotting. La figura 3 mostra come, tutti i sieri esaminati siano in grado di immunoprecipitare il CYP2E1 nativo, confermando la specificità dell'interazione antigene-anticorpo osservata in ELISA. Al contrario, un buon numero di questi perdono la reattività verso l'enzima in western blotting (WB). In particolare, se esprimiamo le intensità delle singole bande, ottenute negli immunoblot, come percentuale di quella di un siero policlonale di coniglio anti-CYP2E1 usato come riferimento, è possibile osservare come 23 sieri su 52 (44%) mostrino una reattività verso il CYP2E1 denaturato al di sotto del 10% di quella del siero di riferimento (Fig.3). Ciò indica che un sottogruppo di pazienti con CHC presenta autoanticorpi che riconoscono preferenzialmente antigeni conformazionali che sono persi quando la proteina è priva della sua conformazione terziaria.

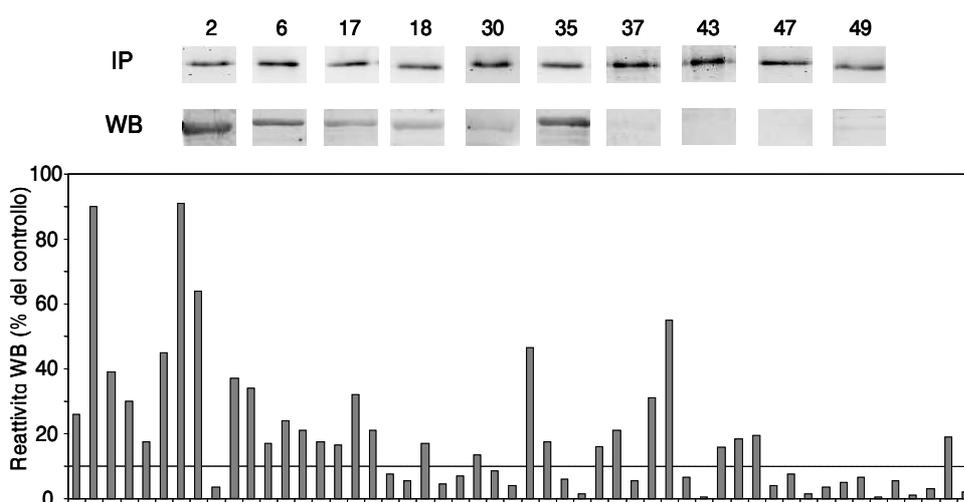


Figura 3: Autoreattività IgG anti-CYP2E1 valutata in Western blot (WB). Le intensità delle bande sono state misurate tramite video densitometria ed espresse come percentuale della reattività di un siero di controllo. La linea orizzontale indica la perdita di reattività maggiore o uguale al 90%, e rappresenta la soglia utilizzata per discriminare i pazienti con autoreattività anti-CYP2E1 verso epitopi conformazionali. In alto sono riportati alcuni blot rappresentativi degli esperimenti di WB ed immunoprecipitazione (IP).

Deve essere sottolineato come le differenze che emergono relativamente alla specificità antigenica non siano correlate alla reattività complessiva anti-CYP2E1, ottenuta in ELISA (O.D.<sub>490nm</sub> 0.708±0.112 vs 0.626±0.245; p=0.37), e neppure all'infezione da parte di uno specifico genotipo virale. Inoltre, la tabella 4 mostra che non si evidenziano differenze significative nelle caratteristiche cliniche e biologiche fra i soggetti con prevalenza di anticorpi anti-CYP2E1 diretti verso epitopi conformazionali, rispetto a quelli con anticorpi che riconoscono antigeni lineari.

	Pazienti con IgG anti-CYP2E1 conformazionali (n=23)	Pazienti rimanenti con IgG anti-CYP2E1 (n=29)	Pazienti senza IgG anti-CYP2E1 (n=85)	Signif
Età (anni)	63.0 (46.0-70.0)	57.4 (48.7-66.8)	52.5 (43.3-61.2)	p=0.070
Consumo Alcolico (g/die)	0.0 (0.0-10.0)	0.0 (0.0-20.0)	8.6 (0.0-40.0)	p=0.231
Indice massa corporea (BMI)	22.5 (20.8-28.5)	23.6 (21.6-26.9)	24.4 (22.9-27.0)	p=0.498
Genotipo virale (1 vs nom 1)	54.5% vs 45.5%	28.6% vs 71.4%	49.1% vs 50.9%	p=0.359
Volume corpuscolare medio (MCV; fL)	85.7 (82.4-89.7)	89.5 (85.0-95.0)	89.2 (85.9-92.3)	p=0.117
Aspartato aminotransferasi (AST; U/L)	82.0 (52.3-96.8)	55.5 (41.0-81.8)	52.0 (37.0-80.0)	p=0.056
Alanino aminotransferasi (ALT; U/L)	83.5 (61.0-155.3)	92.5 (51.5-134.5)	76.0 (39.0-115.0)	p=0.297
γ-glutamiltanspeptidasi (γGT; U/L)	48.0 (24.8-99.3)	47.0 (23.3-92.8)	38.0 (19.5-72.0)	p=0.519
Fosfatasi alcalina (ALP; U/L)	244.0 (162.0-258.5)	156.5 (127.0-246.3)	159.0(133.0-208.0)	p=0.079
Bilirubina (μmol/L)	1.00 (0.60-1.19)	0.80 (0.50-1.20)	0.76 (0.55-1.14)	p=0.667
Attività protrombinica (INR)	1.02 (0.98-1.11)	1.08 (1.02-1.15)	1.06 (1.00-1.14)	p=0.548
Albumina (g/dL)	4.1 (3.7-4.5)	4.3 (4.0-4.4)	4.2 (4.0-4.5)	p=0.669
Gammaglobuline (g/dL)	1.80 (1.55-1.90)	1.55 (1.30-1.90)	1.44 (1.20-1.69)	p=0.058
Sideremia (μmol/L)	14.1 (11.8-22.9)	2.1 (1.4-3.0)	2.0 (1.5-2.7)	p=0.424
Transferrina (mg/dL)	285.0 (227.8-340.8)	207.5 (170.0-249.0)	212.5 (147.5-265.8)	p=0.178
Ferritina (ng/ml)	226.0 (48.0-413.0)	89 (25.3-245.5)	259.0 (118.5-418.0)	p=0.100

*Tabella 4: Caratteristiche biochimiche e cliniche dei pazienti CHC negativi per autoanticorpi anti-CP2E1 o con anticorpi verso epitopi lineari e pazienti CHC con anti-CYP2E1 diretti verso epitopi conformazionali. I valori sono espressi come mediana e range interquartile (IQR).*

Tuttavia, dall'esame istologico emerge come gli score di necro-infiammazione e quelli di fibrosi siano significativamente maggiori (rispettivamente, p=0.048 e p=0.018) nei pazienti con IgG dirette verso epitopi conformazionali, rispetto ai rimanenti pazienti con CHC (Fig.4-5).

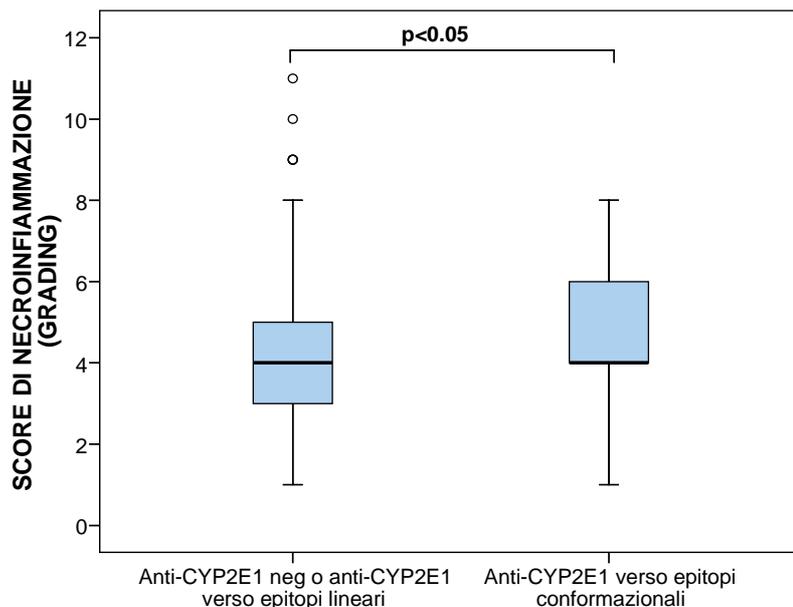


Figura 4: Diagrammi a scatola dello score di necroinfiammazione nei pazienti con anti-CYP2E1 negativi o con autoanticorpi diretti verso gli epitopi lineari e pazienti con autoanticorpi verso epitopi conformazionali di CYP2E1. Le scatole comprendono i valori tra il 25° e il 75° percentile, le linee in neretto rappresentano le mediane, le linee al di fuori delle scatole si estendono dal 10° al 90° percentile (80% dei valori), mentre le osservazioni estreme sono rappresentate da cerchi.

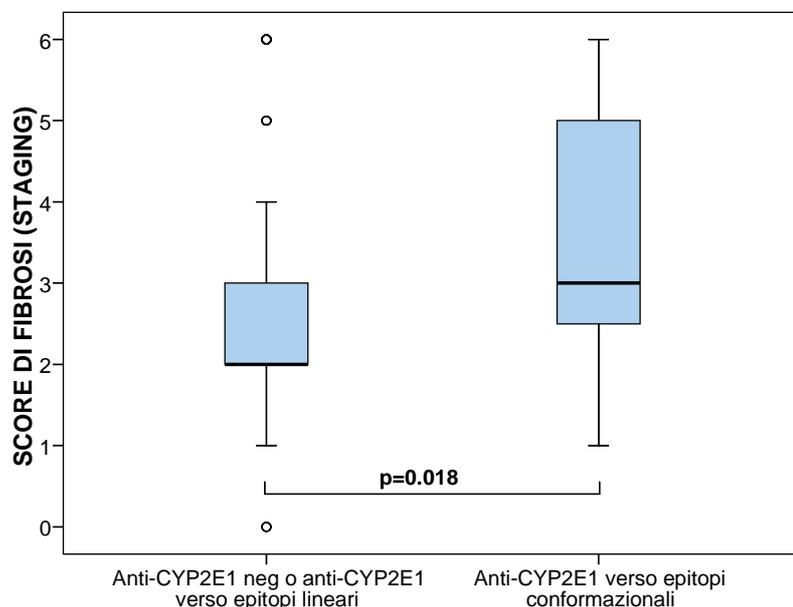


Figura 5: Diagrammi a scatola dello score di fibrosi nei pazienti con anti-CYP2E1 negativi o con autoanticorpi diretti verso gli epitopi lineari e pazienti con autoanticorpi verso epitopi conformazionali di CYP2E1. Le scatole comprendono i valori tra il 25° e il 75° percentile, le linee in neretto rappresentano le mediane, le linee al di fuori delle scatole si estendono dal 10° al 90° percentile (80% dei valori), mentre le osservazioni estreme sono rappresentate da cerchi.

Inoltre, questi pazienti presentano una maggior prevalenza di necro-infiammazione (grading  $\geq 4$ ) (93% vs 56%, differenza del 37%, 95%IC 12-49%;  $p=0,008$ ). In particolare, la presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 verso epitopi conformazionali è associata ad un incremento di 10 volte del rischio di grading  $\geq 4$  (O.R. 10,9; 95%IC 1,4-86,5). In aggiunta, il sottogruppo di pazienti con infezione cronica C e autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 presenta sia una maggior prevalenza (39% vs 13%, differenza del 26%, 95%IC 3-53%;  $p=0,037$ ) che un aumentato rischio (O.R. 4,3; 95%IC 1,2-16,1) di necrosi della lamina limitante epatocitaria ( $G1\geq 2$ ), un importante marker morfologico di progressione verso la cirrosi. All'analisi univariata l'età ( $p=0,035$ ) e la presenza di autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 ( $p=0,023$ ), ma non la positività anti-CYP2E1 ( $p=0,741$ ) sono significativamente associati con grading di necro-infiammazione  $\geq 4$ . L'analisi multivariata ha invece evidenziato che la presenza di anticorpi verso epitopi conformazionali rimane l'unico predittore indipendente di necro-infiammazione (Tabella 5).

Predittore	Analisi Univariata	Analisi Multivariata
Sesso	P=0,611	-
Età*	<b>P=0,035</b>	P=0,055
Consumo alcolico	P=0,459	-
Indice di massa corporea (BMI)	P=0,124	-
Alanino aminotransferasi (ALT)	P=0,504	-
Gammaglobuline	P=0,620	-
Genotipo virale (3 vs non3)	P=0,895	-
Steatosi (pos)	P=0,078	-
Anti-CYP2e1 (conf vs neg o lineari)*	<b>P=0,023</b>	<b>P=0,025</b>
Anti-CYP2e1 (pos)	P=0,741	-

Tabella 5: Analisi univariata e multivariata dei fattori significativamente associati con la necroinfiammazione di grado moderato (grading $\geq 4$ ). L'associazione tra la variabile dipendente (grading) e i predittori è stata valutata tramite la tecnica della Regressione Logistica, utilizzando età, consumo alcolico, BMI, ALT, gammaglobuline come variabili continue e sesso, genotipo virale, steatosi, positività anti-CYP2E1 e gruppo anti-CYP2E1 come variabili dicotomizzate. \* Queste variabili sono state selezionate per il modello multivariato. Significatività del modello multivariato  $p=0,001$ .

Anche il grado di fibrosi (staging) e la prevalenza di fibrosi di grado moderato/severo (staging>2) sono significativamente aumentati (75% vs 43%, diff 32%, 95%IC 8-49%; p=0.013) nei pazienti CHC con auto-reattività verso gli epitopi conformazionali di CYP2E1. E questi soggetti presentano un aumento di 4 volte del rischio (O.R. 4,0; 95%IC 1,3-11,7) di fibrosi moderata/severa. L'analisi dei fattori associati allo sviluppo di fibrosi di grado moderato/severo ha evidenziato una associazione significativa con l'età (p<0,001), la steatosi (p=0,038), la necroinfiammazione (p<0,001) e la presenza di autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 (p=0,013). Tuttavia, l'analisi multivariata ha evidenziato che solo il grading di necroinfiammazione e l'età sono predittori indipendenti di fibrosi moderata/severa (Tabella 6).

Predittore	Analisi Univariata	Analisi Multivariata
Sesso	P=0,159	-
Età*	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P=0,019</b>
Consumo alcolico	P=0,828	-
Indice di massa corporea (BMI)	P=0,760	-
Alanino aminotransferasi (ALT)	P=0,860	-
Gammaglobuline	P=0,635	-
Genotipo virale (3 vs non3)	P=0,488	-
Steatosi (pos)*	<b>P=0,038</b>	P=0,077
Grading (≥4 vs <4)*	<b>P&lt;0,001</b>	<b>P=0,001</b>
Anti-CYP2e1 (conf vs neg o lineari)*	<b>P=0,013</b>	P=0,361
Anti-CYP2e1 (pos)	P=0,223	-

*Tabella 6: Analisi univariata e multivariata dei fattori significativamente associati con la fibrosi di grado moderato/severo (staging>2). L'associazione tra la variabile dipendente (staging) e i predittori è stata valutata tramite la tecnica della Regressione Logistica, utilizzando età, consumo alcolico, BMI, ALT, gammaglobuline come variabili continue e sesso, genotipo virale, steatosi, grading, positività anti-CYP2E1 e gruppo anti-CYP2E1 come variabili dicotomizzate. \* Queste variabili sono state selezionate per il modello multivariato. Significatività del modello multivariato p<0,001.*

In conclusione, da questi risultati emerge come la reattività verso gli antigeni conformazionali, localizzati sulla molecola del CYP2E1, rappresenti un fattore di rischio per la progressione del danno epatico durante l'evoluzione della CHC.

Nell'ambito dello studio dei meccanismi patogenetici in corso di CHC, abbiamo deciso di valutare il potenziale contributo delle IgG anti-CYP2E1 nell'induzione e nella perpetuazione della lesione epatica. Nello specifico ci siamo chiesti se i sieri dei pazienti infetti da HCV siano in grado di riconoscere il CYP2E1 espresso sulla membrana plasmatica degli epatociti. A tal fine è stata indotta l'espressione del CYP2E1 tramite la somministrazione, a ratti maschi di ceppo Wistar, di un bolo di acetone 30% (v/v) in soluzione fisiologica per due giorni consecutivi. Gli epatociti sono stati isolati dal fegato, incubati con sieri dei pazienti HCV, ed analizzati in citofluorimetria a flusso per valutare l'effettiva reattività dei sieri umani verso il CYP2E1 di membrana. Da questi esperimenti emerge che i sieri dei pazienti con IgG dirette verso epitopi conformazionali del CYP2E1 sono in grado di marcare la superficie degli epatociti in maniera paragonabili ad un siero policlonale anti-CYP2E1 (36% vs 32% di eventi positivi), (Figura 6). Al contrario, i sieri negativi per gli autoanticorpi anti-CYP2E1 mostrano una ridotta percentuale di positività rispetto ai sieri positivi ed al siero di riferimento (dati non mostrati).

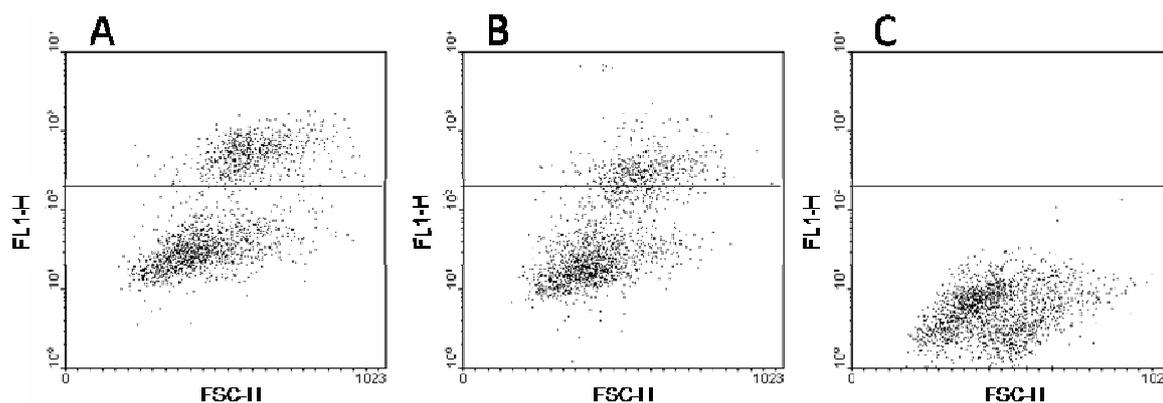


Figura 6. A) Dot plot relativo alla reattività, in citofluorimetria a flusso, di un siero HCV con IgG anti-CYP2E1 verso epatociti isolati da ratto e non permeabilizzati. B) Reattività verso gli epatociti di un siero policlonale di controllo anti-CYP2E1. C) Controllo negativo epatociti incubati con il solo anticorpo secondario fluorescinato.

Quindi se gli autoanticorpi anti-citocromo P4502E1 non costituiscono semplicemente un epifenomeno, risulta di fondamentale importanza definire quali siano gli epitopi

conformazionali maggiormente riconosciuti al fine di identificare un sottogruppo di pazienti a maggior rischio di progressione verso un danno epatico più grave.

***Caratterizzazione della specificità antigenica degli auto-anticorpi anti-CYP2E1: identificazione di epitopi maggiori***

Al fine di valutare la specificità antigenica degli autoanticorpi anti-CYP2E1 diretti preferenzialmente verso epitopi conformazionali, abbiamo utilizzato una metodica messa a punto nel nostro laboratorio e già utilizzata in passato per la caratterizzazione degli antigeni conformazionali associati ad epatite da alcolano ed alcolica. Tale approccio consiste nella sostituzione di singoli residui aminoacidici, selezionati sulla base delle loro proprietà chimico-fisiche e delle informazioni emerse dall'analisi del modello molecolare generato mediante simulazione al computer (Vidali et al. 2004). Studi precedenti avevano dimostrato che, sia per quanto riguarda il CYP2D6 sia il CYP2E1, le aree altamente antigeniche sono localizzate quasi esclusivamente a livello della porzione C-terminale della molecola (Vidali et al. 2004; Ma et al. 2002). Avvalendoci di queste informazioni, come punto di partenza, abbiamo prodotto attraverso procedure di mutagenesi sito-diretta 7 varianti del CYP2E1. Nelle quali, i residui aminoacidi Lys-324, Arg-331, Lys-342, Glu-346, Lys-420 e Phe-421, localizzati a livello delle eliche J e J' e sul loop di connessione tra le eliche K'' ed L, sono stati sostituiti uno alla volta con alanina. In particolare, tutti questi aminoacidi sono caratterizzati dal fatto di essere carichi e di trovarsi nella porzione carbossi terminale della proteina. Allo stesso modo, è stata generata una forma contenente, contemporaneamente, quattro sostituzioni a carico degli aminoacidi Lys243, Glu244, Glu248 e Lys251, i quali sono situati invece a livello dell'elica G. Tutti gli aminoacidi sopra elencati sono stati selezionati in quanto inseriti in aree antigeniche esposte sulla superficie del citocromo. Inoltre, come precedentemente dimostrato, la loro mutagenesi non altera la struttura terziaria della

molecola (Vidali et al. 2004). Le varianti così ottenute sono state espresse in batteri e purificate, successivamente utilizzate in esperimenti di immunoprecipitazione, nei quali abbiamo valutato la capacità di riconoscere le isoforme mutate di CYP2E1 di 20 sieri di pazienti con CHC ed elevata reattività verso antigeni conformazionali. La figura 6 mostra la reattività dei diversi sieri verso le varianti mutate espresse come percentuale rispetto al CYP2E1 normale. Nello specifico, si può osservare come il risultato appaia variabile, talvolta si registra un aumento della reattività mentre altre una riduzione. Questo effetto probabilmente riflette il cambio di affinità dell'anticorpo nei confronti dell'antigene in relazione alle modificazioni di carica indotte dalle mutazioni stesse. Più in dettaglio, se prendiamo come cut-off variazioni pari o superiori al 50% della capacità di immunoprecipitare le isoforme mutate rispetto al CYP2E1 normale emerge che le mutazioni a carico di Lys324 ed Arg331 da sole od in combinazione con altre alterano la capacità di interazione dell'85% (17/20) dei sieri oggetto dello studio. Mentre, il riconoscimento del CYP2E1 da parte dei tre sieri restanti è, invece, influenzato dalla mutagenesi di Lys342 e Glu346. In aggiunta, se analizziamo, contemporaneamente, i risultati relativi a Lys342, Arg344 ed Glu346, sono 17 i sieri (85%) nei quali viene indotto un cambio di affinità verso l'antigene. Abbiamo inoltre osservato che le sostituzioni aminoacidiche di Lys420 e Phe421 contribuiscono solo marginalmente (30% dei casi) ad alterare l'interazione antigene-anticorpo. Al contrario, l'uso della forma contenente le quattro mutazioni sull'elica G non altera, in maniera significativa, il legame del CYP2E1 da parte di nessuno dei campioni finora analizzati (Fig.7). Va notato come tutte le varianti di mutate impiegate, per questo studio, non siano in grado di alterare il riconoscimento del citocromo P4502E1 da parte dei sieri che riconoscono preferenzialmente antigeni lineari (Fig.7). Suggestendo che gli epitopi lineari possano localizzarsi in altre aree

antigeniche o comunque non coinvolgere i residui aminoacidi usati negli esperimenti qui descritti.

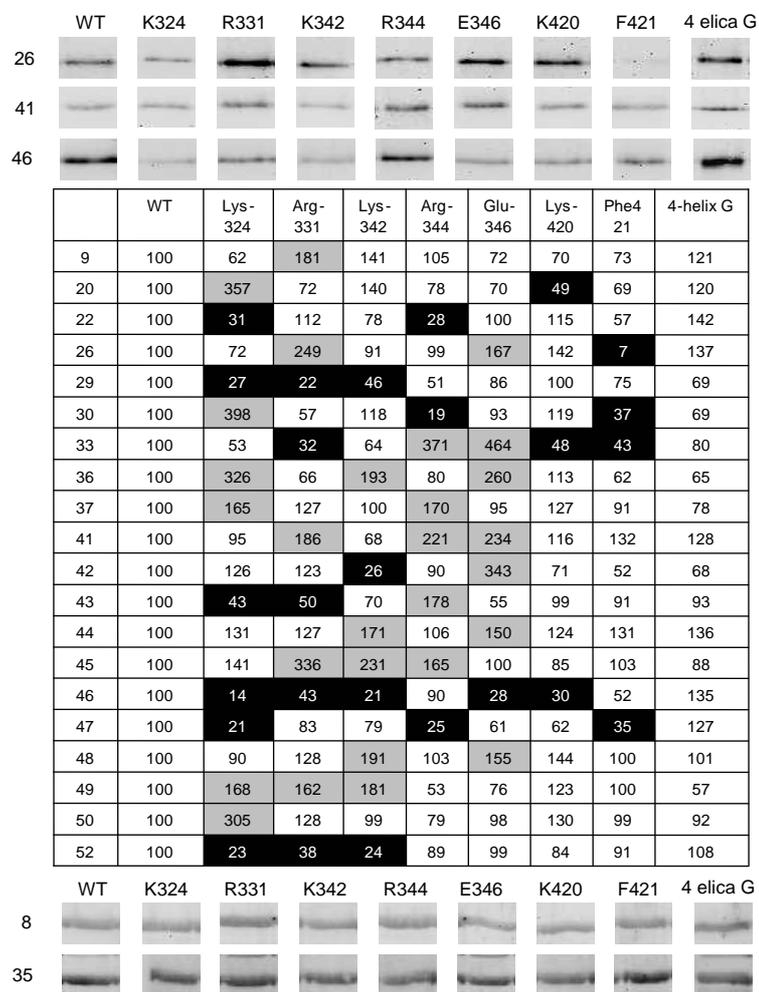
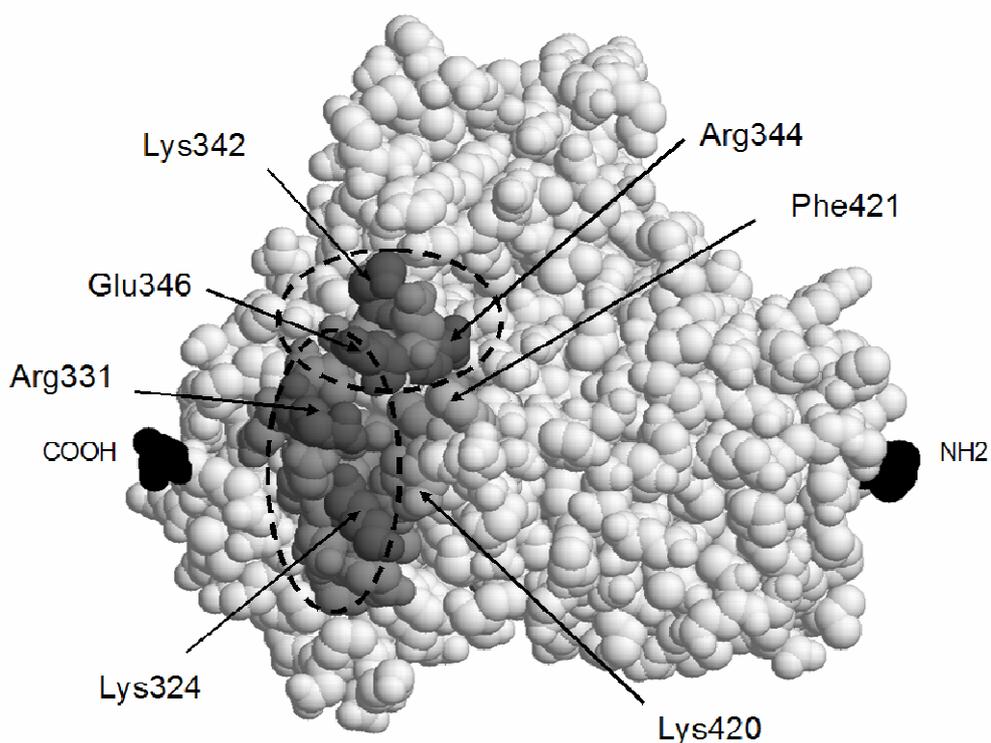


Figura 7: Effetto di singole sostituzioni aminoacidiche sul riconoscimento di CYP2E1 ricombinante umano da parte di 20 sieri di pazienti con CHC e anticorpi anti-CYP2E1 diretti verso epitopi conformazionali. Le intensità delle bande sono state misurate tramite videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come percentuale di reattività residua delle forme mutate rispetto al CYP2E1 wild-type. I quadrati grigi e quelli neri indicano rispettivamente un aumento o una riduzione maggiore del 50%. In alto, alcuni immunoblots di CYP2E1 wild-type e mutato dopo immunoprecipitazione con alcuni sieri. In basso, alcune bande relative alla reattività, in western blotting, di due sieri lineari verso il CYP2E1 WT e le isoforme mutate.

Sebbene nella struttura primaria Lys324, Arg331, Lys342, Arg344, Glu346, Lys420, Phe421 non si trovino in stretta successione, la simulazione al computer di un modello tridimensionale, ci ha permesso di rivelare come gli aminoacidi che

influenzano il riconoscimento del CYP2E1 siano tutti localizzati in stretta prossimità, in una area antigenica di 1.9-2.0 nm, a cavallo tra le eliche J-J' e K'' (Fig.8). Individuando un epitopo conformazionale, ben definito, in un area altamente antigenica sulla superficie molecolare del citocromo P4502E1.



*Figura 8: Modello molecolare tridimensionale di CYP2E1 (modalità spacefill). In nero sono colorate rispettivamente le estremità N- e C-terminale. Al centro, tra le eliche J', K'' e L in grigio scuro, è possibile osservare l'epitopo candidato con i residui aminoacidici Lys-324, Arg-331, Lys-342, Arg-344, Glu-346 e Lys-420 e Phe-421 (grigio chiaro) interessati dal processo di mutagenesi.*

### **Prevalenza e significato clinico degli autoanticorpi anti-CYP2E1 in pazienti CHC sottoposti a trapianto epatico ortotopico (OLT).**

La significativa associazione evidenziata tra l'auto-reattività anti-CYP2E1 e la progressione della lesione epatica in corso di CHC ci ha indotto a studiare la prevalenza e la specificità antigenica delle immunoglobuline anti-CYP2E1 anche in

un ristretto gruppo di pazienti in stadio terminale dell'evoluzione di CHC. In particolare, la presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 circolanti è stata valutata in 46 pazienti con cirrosi epatica conseguente ad infezione con HCV sottoposti a trapianto epatico ortotopico. Usando come soglia di positività il 97.5° percentile, calcolato sulla reattività della popolazione di controllo, abbiamo osservato come 19 su 46 pazienti (41%) mostrino, prima del trapianto, titoli anticorpali superiori alla soglia di positività (Fig.9).

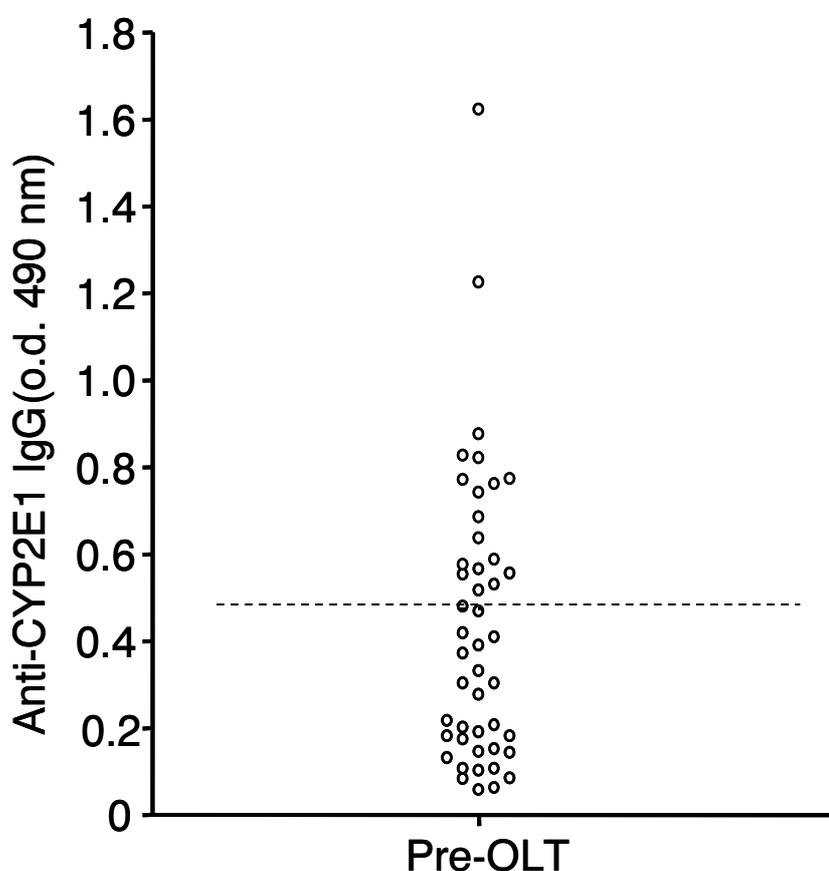


Figura 9: Reattività IgG anti-CYP2E1 umano ricombinante, i risultati sono espressi come unità di densità ottica a 490nm. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta il valore soglia per la positività calcolato sul 97,5° percentile della reattività della popolazione di controllo.

Considerando i risultati riportati nelle sezioni precedenti ci siamo chiesti se, anche in questo caso, la specificità antigenica verso il citocromo P450E1 fosse variabile. In particolare, in che proporzione fossero evidenti le IgG dirette preferenzialmente verso antigeni conformazionali. A tal proposito, è stata valutata, nei pazienti positivi pre-

OLT, da una parte la capacità di immunoprecipitare il CYP2E1 e dall'altra di legare l'enzima in immunoblot. Tutti i sieri esaminati sono in grado di immunoprecipitare la forma nativa del citocromo, mentre al contrario 17 sieri su 19 (89%) perdono la capacità di interazione con l'enzima a seguito della denaturazione proteica, indicando nel complesso un preferenziale riconoscimento di epitopi conformazionali (Fig.10).

Un aspetto particolare della presenza di tali anticorpi risulta dal fatto che i 19 pazienti con auto-reattività anti-CYP2E1 pre-OLT, mostrano un significativo aumento dello score di necro-infiammazione ( $p=0.046$ ) ed un aumento della prevalenza di recidiva post trapianto di epatite con un grading severo ( $\geq 9$ ) (53% vs 22%  $p=0.037$ ). Non sono state invece riscontrate differenze apprezzabili circa l'estensione della fibrosi. Dall'analisi multivariata l'auto-reattività anti-CYP2E1 pre-OLT ( $p=0.017$ ) assieme all'età del donatore  $>50$  ( $p=0.013$ ) ed una storia di rigetto acuto ( $p=0.022$ ) sono dei predittori indipendenti di recidiva di epatite con grading  $\geq 9$  nei 12 mesi successivi al trapianto.

Stante la rilevanza clinica degli auto-anticorpi anti-CYP2E1 diretti preferenzialmente verso epitopi conformazionali hanno nella recidiva post trapianto dell'infezione da HCV, abbiamo deciso di valutare se anche in questo gruppo di pazienti venisse riconosciuto lo stesso epitopo conformazionale precedentemente descritto. A tal fine, abbiamo valutato la capacità di 8 sieri con reattività verso epitopi conformazionali scelti casualmente di immunoprecipitare le isoforme recanti mutazioni puntiformi a carico di Lys324, Arg331, Lys342, Arg344, Glu346. Avvalendoci degli stessi criteri menzionati, si osservato che la combinazione Lys342, Arg344, Glu346 altera la capacità di legame in 5 su 8 (62,5%) dei casi. Al contrario, un solo siero risente della sostituzione aminoacidica di Arg331 mentre la mutazione a carico di Lys324,

addirittura, non altera l'interazione antigene-anticorpo di nessuno dei sieri oggetto del presente studio (Fig.10). Questi risultati confermano come l'epitopo CYP2E1<sub>324-342</sub> sia il principale antigene conformazionale riconosciuto dagli autoanticorpi anti-CYP2E1 anche nelle fasi terminali dell'epatite cronica C.

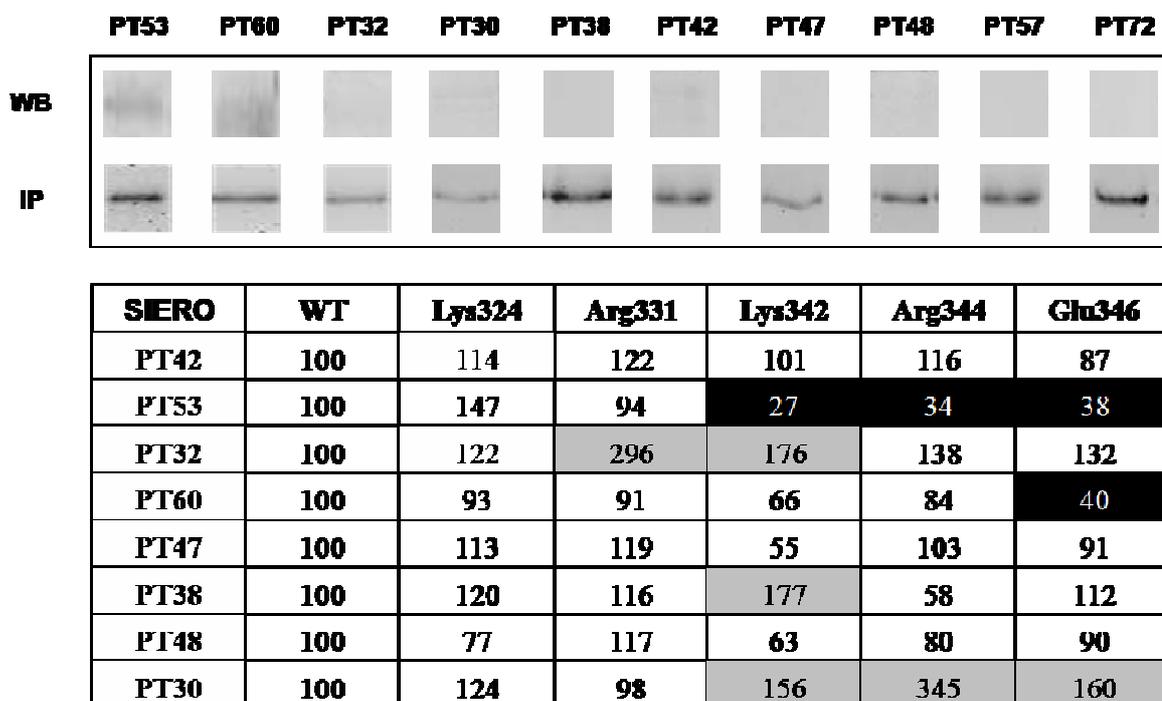


Figura 10: Effetto di singole sostituzioni aminoacidiche sul riconoscimento di CYP2E1 ricombinante umano da parte di 8 sieri di pazienti con CHC e anticorpi anti-CYP2E1 diretti verso epitopi conformazionali. Le intensità delle bande sono state misurate tramite videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come percentuale di reattività residua delle forme mutate rispetto al CYP2E1 wild-type. I quadrati grigi e quelli neri indicano rispettivamente un aumento o una riduzione maggiore del 50%. In alto, alcuni immunoblot relativi alla capacità di alcuni sieri HCV di immunoprecipitare (IP) e legare, in western blotting (WB) il CYP2E1 wild type.

### **Fenomeno del mimetismo molecolare tra RNA polimerasi RNA dipendente di HCV (NS5B) ed il citocromo P4502E1 alla base dello sviluppo di auto-reattività anti-CYP2E1**

La presenza di un fenomeno di mimetismo molecolare, tra le proteine di HCV ed il CYP2D6, è stata proposta come causa della comparsa di auto-anticorpi anti-LKM di tipo 1 diretti verso il CYP2D6 (Ferri et al. 2008; Strassburg et al. 2002; Bogdanos et al. 2008). L'elevata omologia di sequenza presente tra il CYP2E1 ed il CYP2D6 ci ha

spinto a valutare se lo stesso meccanismo potesse essere responsabile anche dello sviluppo di auto-reattività anti-CYP2E1 associata a CHC. L'allineamento di sequenza tra la poliproteina di HCV ed il peptide CYP2E1<sub>324-346</sub>, all'interno del quale sono contenuti la stragrande maggioranza degli aminoacidi in grado di influenzare il legame antigene-anticorpo, ha evidenziato l'esistenza di una buona omologia (load score 21-26) tra le sequenze CYP2E1<sub>324-334</sub>, CYP2E1<sub>335-346</sub> e quelle corrispondenti, rispettivamente, ai peptidi NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub> (Fig.10). In particolare, queste omologie di sequenza sono ben conservate nei differenti genotipi di HCV ad eccezione del genotipo 4a (Fig.11).

CYP2E1 324-346 NS5B 1a 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- ARMILMTHFFSVLIARDQLEQALDCEIYGACYSIEPLDLPPIIQRHLHGLSAFSLHSYSPG	21
CYP2E1 324-346 NS5B 1b 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- ARMILMTHFFSILLAQECLQKALDCQIYGACYSIEPLDLPPIIERLHGLSAFSLHSYSPG	21
CYP2E1 324-346 NS5B 2a 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- ARMVLMTHFFSILMAQDTLDQNLNFEMYCAVYSVSPDLPAIIRLHGLDAFSLHTYTPH	21
CYP2E1 324-346 NS5B 2b 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- VRMVMTHFFSILLAQDTLNQNLNFEMYCAVYSVNPDLPAIIRLHGLDAFSLHTYSYPH	21
CYP2E1 324-346 NS5B 2c 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- VRMVMTHFFSVLMAQDTLDQDLNFEMYCAVYSVSPDLPAIIRLHGLEAFSLHSYSPH	21
CYP2E1 324-346 NS5B 3a 421-480	-----KLHEEIDR-----VIG-----PSRIPAIKDRQE----- VRMVMTHFFSILQSCETLDRPLDFEMYCATYSVTPLDLPPIIERLHGLSAFTLHSYSPV	21
CYP2E1 324-346 NS5B 4a 450-510	-----KLH-----EIDRVIGPSR---IPAIKDRQE----- VTYSITPLDLPPIIQRHLHGLSAFTLHGYSYPHELNRVAGALRKLGVPPPLRAWHRARAVRAK	26

Figura 11: Rappresentazione grafica dell'allineamento di sequenza tra il peptide 324-346 di CYP2E1 umano e il peptide 421-480 di NS5B di diversi genotipi HCV. In colore sono indicati rispettivamente i residui aminoacidi omologhi (nero) o quelli con simili caratteristiche chimico-fisiche (grigio).

Inoltre, confrontando il modello molecolare del frammento NS5B<sub>421-480</sub>, genotipo 1b, l'unico al momento disponibile nella banca dati RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdp/home/home.do>) con quello del CYP2E1<sub>324-346</sub>, è possibile osservare come le similitudini siano evidenti anche a livello della struttura tridimensionale (RMSE=0.062), in modo particolare tra CYP2E1 Pro<sub>335</sub>-Glu<sub>346</sub> e NS5B Pro<sub>456</sub>-Arg<sub>460</sub> (Fig.12).

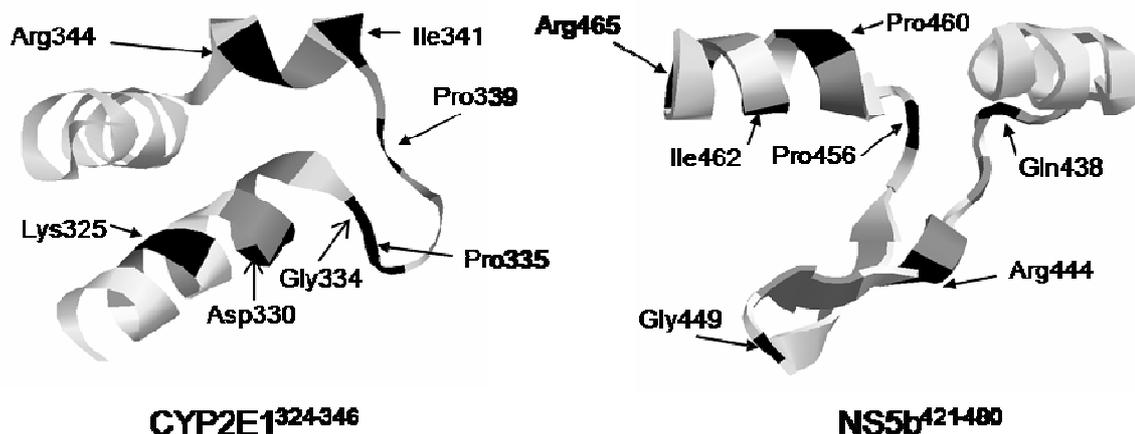


Figura 12: Modelli molecolari dei peptidi selezionati di CYP2E1 umano e NS5B di HCV genotipo 1. In colore sono indicati rispettivamente i residui aminoacidici omologhi (nero) o quelli con simili caratteristiche chimico-fisiche (grigio).

Queste osservazioni ci hanno indotto a verificare se questi peptidi virali siano in grado di cross-reagire con gli autoanticorpi anti-CYP2E1. Siccome, le sequenze di HCV NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub> sono localizzate nella porzione interna della molecola, i due peptidi sono stati clonati, nel vettore pGEX4T-1, ed espressi come proteine coniugate alla GST in cellule di *E. Coli* ceppo DH5 $\alpha$ . La realizzazione di un saggio ELISA, usando come antigeni le proteine GST-NS5B<sub>438-449</sub> e GST-NS5B<sub>456-465</sub> purificate, ha dimostrato come i sieri contenenti autoanticorpi anti-CYP2E1 diretti preferenzialmente verso antigeni conformazionali riconoscano con una maggiore affinità questi peptidi rispetto ai sieri lineari, ai negativi o controlli sani (Fig.13).

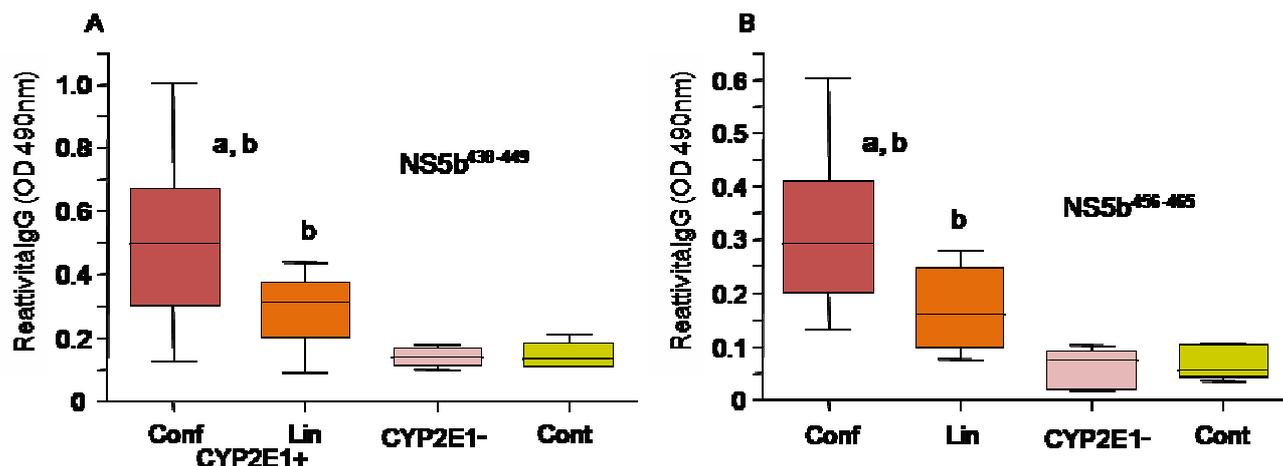


Figura 13: (Pannelli A, B) Valutazione, mediante saggio ELISA, della capacità di riconoscimento delle proteine GST-NS5B438-449 e GST-NS5B456-465 da parte di 20 sieri HCV con IgG dirette, rispettivamente, verso epitopi conformazionali (CYP2E1+Conf) o lineari (CYP2E1+Lin). Sono inoltre stati usati come controlli 5 sieri negativi per IgG anti-CYP2E1 e 5 sieri di soggetti sani. I valori sono espressi come unità di densità ottica a 490nm. Le scatole comprendono i valori tra il 25° e il 75° percentile, le linee in neretto rappresentano le mediane, le linee al di fuori delle scatole si estendono dal 10° al 90° percentile (80% dei valori). Significatività statistica: a)  $p < 0.05$  vs sieri con IgG anti-CYP2E1 lineari; b)  $p < 0.001$  vs controlli o sieri negativi per anti-CYP2E1.

Inoltre, esperimenti di competizione, nei quali alcuni sieri conformazionali sono stati pre-incubati con il CYP2E1 ricombinante umano (0.1nmol/ml), hanno messo in evidenza come la capacità di legare le due proteine virali venga ridotta in maniera analoga a quella di legare il CYP2E1 (Fig.14).

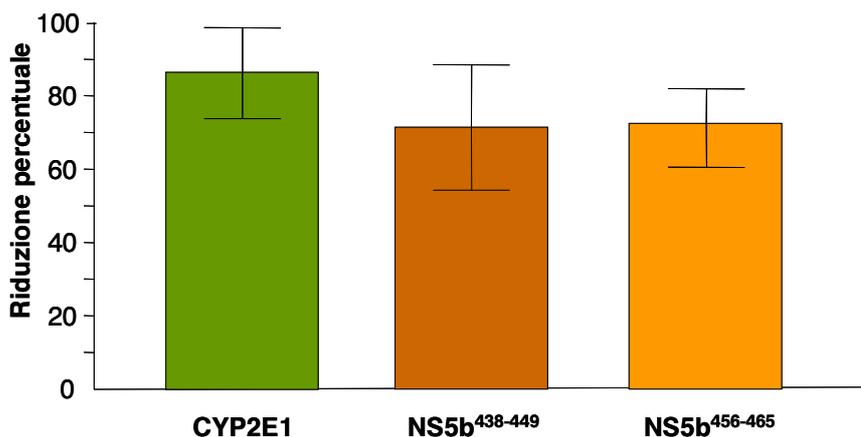


Figura 14: Valutazione della capacità del citocromo P4502E1 di ridurre il riconoscimento dei peptidi virali NS5B<sub>438-449</sub>, NS5B<sub>456-465</sub> e del CYP2E1 stesso da parte di 5 sieri HCV, con IgG anti-CYP2E1 dirette verso antigeni conformazionali. I valori sono espressi come percentuale della reattività basale in ELISA dei sieri verso gli antigeni.

Allo stesso modo dopo aver pre-adsorbito i sieri, rispettivamente, con GST-NS5B<sub>438-449</sub>, GST-NS5B<sub>456-465</sub> o la sola GST(4µg/ml), abbiamo osservato come le due proteine di fusione siano più efficienti della sola GST nel ridurre la capacità di riconoscimento del CYP2E1 in saggi ELISA (Fig.15).

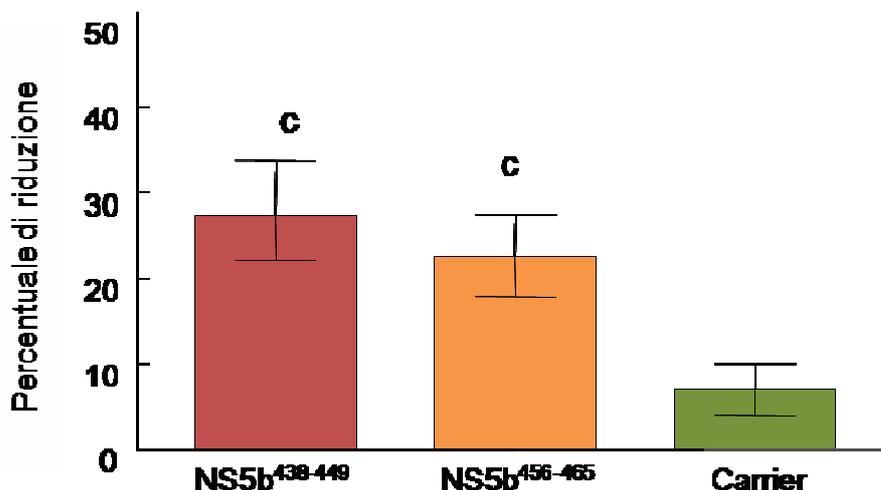


Figura 15: Valutazione della capacità delle proteine di fusione GST-NS5B<sub>438-449</sub> e GST-NS5B<sub>456-465</sub> o del solo GST di ridurre il riconoscimento del CYP2E1 da parte di 5 sieri HCV, con IgG dirette verso antigeni conformazionali del CYP2E1. I valori sono espressi come percentuale della reattività basale dei sieri verso il CYP2E1. Significatività statistica: c)  $p < 0.05$  vs i sieri pre-adsorbiti con la sola proteina carrier GST.

Al contrario non si osserva alcun effetto se pre-adsorbiamo, con le proteine virali, alcuni sieri contenenti IgG dirette verso epitopi lineari. Ciò conferma l'esistenza di una cross-reattività, da parte delle immunoglobuline anti-CYP2E1 conformazionali, e strutture della proteina NS5B di HCV. Tutti assieme questi risultati vanno a sostegno dell'ipotesi che il mimetismo molecolare, con le proteine dell'HCV, possa effettivamente guidare lo sviluppo di auto-reattività anti-CYP2E1 nella CHC.

**Induzione della perdita della tolleranza verso il CYP2E1 nel topo mediante immunizzazione con i peptidi virali NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub>**

Per verificare se realmente le omologie di sequenza e strutturali, riscontrate a livello dei peptidi CYP2E1<sub>324-334</sub>, CYP2E1<sub>335-346</sub> e, rispettivamente, NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub>, siano in grado di indurre perdita della tolleranza verso il citocromo P450E1, abbiamo deciso di realizzare esperimenti di immunizzazione. Nello specifico, topi maschi di ceppo FVB, sono stati immunizzati, rispettivamente, con le proteine ricombinanti GST-NS5B<sub>438-449</sub>, GST-NS5B<sub>456-465</sub> o con la sola GST (100µg). Una volta sacrificati gli animali e prelevato il sangue, è stata valutata la capacità delle IgG, presenti nel siero dei topi, di cross-reagire con il CYP2E1 umano. In particolare, abbiamo osservato che a differenza di quelli trattati con la sola GST, i topi immunizzati con l'uno o l'altro peptide sviluppano anticorpi capaci di riconoscere il CYP2E1 in western blot (Fig.16). La specificità dell'interazione tra antigene-anticorpi è stata confermata in esperimenti di immunoprecipitazione, in cui abbiamo osservato che i sieri sono in grado di legare il CYP2E1 ricombinante umano con la stessa efficienza di un siero diretto verso il CYP2E1 (Fig.16). Queste osservazioni confermano l'ipotesi del coinvolgimento di fenomeni di mimetismo molecolare nell'insorgenza dell'auto-reattività anti-CYP2E1.

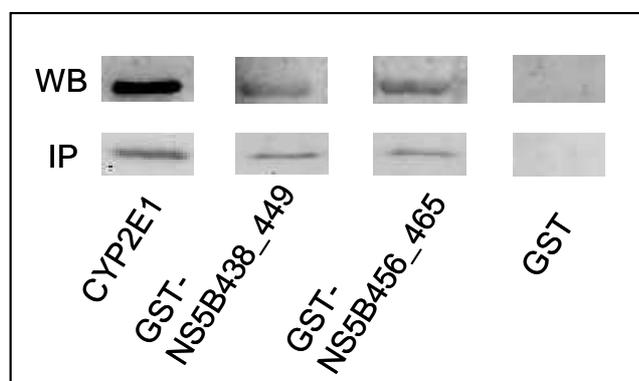


Figura 16: Valutazione della capacità di riconoscimento del CYP2E1 ricombinante umano, rispettivamente, da parte di sieri di topi immunizzati ed di un siero policlonale anti-CYP2E1 usato come controllo, in esperimenti di western blotting (WB) ed immunoprecipitazione (IP).

## DISCUSSIONE

Diversi membri della superfamiglia del citocromo P450 sono frequentemente bersaglio di risposte auto-immuni associate a varie patologie epatiche (Strassburg et al. 2002; Vergani et al. 2007). Infatti gli anticorpi LKM-1 che sono caratteristici delle epatiti autoimmuni di tipo 2 riconoscono CYP2D6, mentre la presenza di anticorpi anti-CYP2C9 ed anti-CYP1A2 è frequente nelle epatiti indotte da farmaci quali acido tienilico ed idralazina (Beaune et al. 1994; Robin et al. 1996). Inoltre, anticorpi anti-CYP2E1 sono stati descritti in associazione all'epatite indotta da alotano (Bourdi et al. 1996), al danno epatico causato dai refrigeranti idroclorofluorocarburi (Hoet et al. 1997), all'epatite idiosincronica indotta da anestetici (Njoko et al. 2006) ed all'epatopatia alcolica in stadio avanzato (Vidali et al. 2003). In aggiunta, nel corso dell'epatite cronica C si assiste allo sviluppo di autoanticorpi diretti verso il CYP2D6, ma anche verso altre isoforme del citocromo P450, quali CYP2A6 (Dalekos et al. 2003), CYP3A4 e CYP2E1 (Miyakawa et al. 2001).

Ad oggi, tuttavia, la possibile implicazione di reazioni auto-immuni anti-CYPs nel mediare l'insorgenza di danno epatico è stata studiata in dettaglio solo nel caso dell'auto-reattività anti-CYP2D6. I dati disponibili dimostrano che sieri positivi per gli autoanticorpi anti-LKM-1 provenienti sia da pazienti con epatite AIH tipo 2 che da soggetti infetti con HCV riconoscono il CYP2D6 espresso sul lato esterno della membrana plasmatica degli epatociti (Muratori et al. 2000), indicando un potenziale coinvolgimento delle IgG anti-CYP2D6 nell'induzione di citotossicità anticorpo-dipendente. A ciò va aggiunto, che inducendo sperimentalmente la perdita della tolleranza verso il CYP2D6 attraverso l'infezione di topi con un adenovirus Ad5 ricombinante che codifica per lo stesso citocromo, si osserva la produzione di IgG anti-CYP2D6 che riconoscono lo stesso epitopo legato dagli autoanticorpi anti-LKM-1

umani e l'insorgenza di danno epatico (Holdener et al. 2008). In fine, è stato dimostrato che nei pazienti con AIH di tipo 2 la reattività anti-CYP2D6 di linfociti T correla con la severità del danno epatico (Ma et al. 2006; Longhi et al. 2007).

Come si è già detto, lo sviluppo di reazioni autoimmuni caratterizzate dalla presenza di auto-anticorpi non-organo specifici come anticorpi anti-nucleo (ANA), anti-muscolo liscio (SMA) ed in minor misura di anticorpi anti-LKM-1 è di frequente riscontro nei soggetti affetti da epatite cronica C (Strassburg et al. 2002; Ferri et al. 2008). In questo scenario, gli autoanticorpi anti-CYP2E1 si aggiungono alla lista delle immunoglobuline associate all'infezione cronica da virus C. Tali anticorpi sono del tutto indipendenti dall'autoreattività anti-CYP2D6 e la loro comparsa non è correlata ne con il genere o l'età dei pazienti, ne tanto meno con il genotipo del HCV infettante (Vidali et al. 2007). Inoltre, la prevalenza di IgG anti-CYP2E1 non è significativamente diversa se confrontiamo tra loro pazienti con CHC astemi o consumatori abituali di alcol. Quest'ultima osservazione può sembrare paradossale, dal momento che anche un consumo alcolico moderato è in grado di indurre l'espressione del CYP2E1 (Liangpunsakul et al. 2005). Tuttavia occorre considerare che l'induzione del citocromo P450 2E1 in risposta all'alcol è soggetta ad un'ampia variabilità inter-individuale (Dupont et al. 1998; Oneta et al. 2002) per cui il suo effetto sullo sviluppo di auto-reattività specifica può non essere significativo. Nei pazienti con CHC analizzati in questo studio la valutazione della presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 tramite saggio ELISA ha messo in evidenza una prevalenza pari al 38%. Questo valore è in accordo con i dati ottenuti precedentemente con la stessa metodica in due altre casistiche di soggetti infetti da HCV analizzati al momento della diagnosi (prevalenza del 40%)(Vidali et al. 2007) o allo stadio terminale della malattia al momento del trapianto epatico (prevalenza del

41%) (Rigamonti et al. 2009). Questi valori sono però circa 10 volte superiori a quelli originariamente riportati da Miyakawa e colleghi (2001) che mediante analisi in western blotting, avevano osservato frequenze tra il 4% e il 6% dei , rispettivamente, pazienti con CHC LKM-1 positivi e negativi (Miyakawa et al. 2001). Le differenze che emergono tra i nostri dati e quelli pubblicati da Miyakawa trovano una spiegazione nel fatto che, l'analisi in western blotting sottostima la presenza degli autoanticorpi anti-CYP2E1, in quanto non evidenzia quelli diretti verso gli epitopi conformazionali, che sono prevalenti e la cui reattività viene perduta a seguito della denaturazione proteica. Infatti, se prendiamo in considerazione tra i sieri utilizzati in questo studio quelli che mostrano esclusivamente un riconoscimento di epitopi lineari (Fig. 3) otteniamo una percentuale di soggetti positivi per l'auto-reattività anti-CYP2E1 pari al 7% e del tutto paragonabile a quella descritta da Miyakawa et al. (2001). A questo proposito dobbiamo ricordare come anche gli autoanticorpi anti-LKM-1 associati con l'infezione cronica C presentino un riconoscimento preferenziale di epitopi conformazionali a carico di CYP2D6 (Yamamoto et al. 1993).

Nonostante che l'auto-reattività anti-CYP2E1 in corso CHC abbia una prevalenza molto maggiore di quella degli anticorpi anti-LKM-1, un lavoro precedente condotto nel nostro laboratorio non aveva riscontrato una significativa associazione tra la presenza dei suddetti anticorpi ed un aumento delle transaminasi o dell'entità delle danno epatico (Vidali et al. 2007). In questo studio era solamente emerso che i pazienti con epatite all'interfaccia periportale/perisetale moderata o grave (score>1) mostravano titoli di IgG anti-CYP2E1 significativamente superiori rispetto a quelli con lesioni di minore gravità (score ≤1) (Vidali et al. 2007). In contrasto con questi dati, successive osservazioni avevano invece dimostrato che in soggetti con cirrosi indotta da HCV sottoposti a trapianto epatico sia la presenza di auto-reattività anti-CYP2E1

pre-trapianto che la persistenza della stessa post-trapianto erano fattori di rischio indipendenti per una maggiore estensione delle lesioni necro-infiammatorie (grading  $<9$ ) in corso di recidiva post-trapianto dell'epatite C (Rigamonti et al. 2009). L'apparente discrepanza osservata tra questi risultati può essere spiegata sulla base dei dati riportati in questa tesi. Infatti, abbiamo dimostrato come solo la presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 che riconoscono prevalentemente epitopi conformazionali e non una reattività generalizzata verso CYP2E1 sia associata ad un'aumentata prevalenza di grading istologico  $\geq 4$  ad indicare una maggiore gravità delle lesioni necro-infiammatorie. Inoltre, dai nostri risultati è emerso come questi anticorpi siano, insieme all'età, un predittore indipendente per un grading  $\geq 4$ . A supporto del possibile ruolo patogenetico di anticorpi conformazionali anti-CYP2E1 vi sono le osservazioni che tanto le IgG anti-CYP2E1 associate all'epatite indotta da alcol quanto quelle identificate in corso di recidiva post-trapianto di CHC mostrano una predominante reattività verso epitopi conformazionali (Vidali et al 2004; Rigamonti et al. 2009). Nei pazienti esaminati in questo studio la presenza di IgG anti-CYP2E1 correla con la severità della fibrosi. Tuttavia, all'analisi multivariata la stretta associazione tra la reattività anti-CYP2E1 ed il grading di necro-infiammazione, fa sì che solo quest'ultimo risulti essere un predittore indipendente della fibrosi. Complessivamente, questi risultati indicano che nel corso di CHC la perdita della tolleranza verso antigeni conformazionali del CYP2E1 contribuisce al danno necro-infiammatorio, che è, a sua volta, associato con la progressione verso la fibrosi. Tuttavia, i meccanismi attraverso cui l'auto-reattività anti-CYP2E1 contribuisca alla genesi del danno epatico non sono ancora stati del tutto chiariti.

Evidenze sperimentali suggeriscono che, la presenza del CYP2E1 sulla membrana plasmatica degli epatociti, lo rende accessibile legame con anticorpi in grado di

indurre reazione di citotossicità (Clot et al. 1997). Inoltre esperimenti di microscopia confocale hanno confermato come gli autoanticorpi anti-CYP2E1 siano in grado di legare il CYP2E1 espresso sulla superficie esterna della membrana plasmatica di epatociti di ratto (Vidali et al. 2007). La caratterizzazione della specificità antigenica degli anticorpi anti-CYP2E1 di tipo conformazionale associati ad epatite C ha dimostrato la loro capacità di riconoscere prevalentemente un area compresa tra gli aminoacidi Lys324 e Glu346. Questa struttura antigenica è situata sulla superficie della molecola a livello della giustapposizione tra le eliche J e J' e verosimilmente contiene almeno due epitopi conformazionali situati rispettivamente fra Lys324 ed Arg331 e fra Lys342 e Glu346 (Fig. 8). E' interessante notare come la specificità per l'epitopo Lys342-Glu346 sia evidente anche nella maggior parte dei soggetti nelle fasi terminali dell'epatite cronica ad indicare la possibile importanza nel determinare l'evoluzione della malattia. La struttura antigenica di CYP2E1 riconosciuta dagli autoanticorpi dei pazienti con CHC si sovrappone parzialmente a quella che era stata precedentemente identificata come il principale bersaglio degli autoanticorpi anti-CYP2E1 associati all'epatite indotta da alotano (Vidali et al. 2004). Tuttavia, a differenza di questi ultimi, gli autoanticorpi anti-CYP2E1 associati alla CHC mostrano una maggiore variabilità nella risposta alle singole sostituzioni aminoacidiche indicando una più spiccata eterogeneità policlonale. Inoltre, i sieri dei pazienti CHC non mostrano un'affinità rilevante verso un epitopo localizzato a livello dell'elica G, tra Lys243 e Lys251, che invece rappresenta un bersaglio delle IgG anti-CYP2E1 nei sieri dei pazienti con epatite da alotano (Vidali et al. 2004). Tali differenze possono essere spiegate sulla base del diverso meccanismo che porta alla perdita della tolleranza immunitaria nei confronti di CYP2E1 nell'epatite indotta da alotano rispetto alla CHC. (Loeper et al. 1993). Va inoltre ricordato che le eliche J, K e L dei citocromi CYP2C9 e CYP3A4 rappresentano il sito di legame per gli anticorpi

conformazionali associati, rispettivamente, all'epatite indotta dall'acido tienilico (Lecoeur, 1996) ed a reazioni di ipersensibilità ai farmaci anti-convulsivanti aromatici (Leeder, 1996). In aggiunta, l'allineamento di sequenza, tra le isoforme del citocromo P450 2D6 e 2E1, dimostra come la sequenza dell'antigene da noi identificato CYP2E1<sub>324-346</sub> sia adiacente alla sequenza CYP2D6<sub>316-327</sub> che rappresenta un bersaglio chiave degli autoanticorpi anti-LKM-1 (Ma et al. 2002). Questo suggerisce la possibilità che le eliche J, K e L possano rappresentare una importante area antigenica in diverse isoforme di citocromo P450.

La simulazione strutturale, basata sulla interazione del CYP2E1 con la membrana lipidica, indica che l'area contenente le eliche J, J' e K'' è localizzata sulla porzione esterna della molecola ed è ben accessibile al legame con gli anticorpi (Vidali et al. 2004; Neve et al. 2003). In accordo con questi risultati noi abbiamo dimostrato tramite esperimenti di citofluorimetria a flusso, che le IgG dirette verso gli epitopi conformazionali di CYP2E1 presenti nei sieri dei pazienti con CHC sono in grado di legare la superficie degli epatociti di ratto in maniera del tutto paragonabile ad un siero policlonale anti-CYP2E1. Ciò conferma che gli epitopi conformazionali in CYP2E1<sub>324-346</sub> sono accessibili al riconoscimento da parte delle immunoglobuline che potrebbero mediare danno cellulare attraverso l'attivazione del complemento o con un meccanismo di citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC). Queste evidenze sono in accordo con la capacità degli anticorpi associati con l'epatite indotta da alotano di legare CYP2E1 espresso sulla membrana plasmatica degli epatociti (Eliasson et al. 1996). Quindi, come nel caso degli anticorpi LKM-1 (Vergani et al. 2007), il riconoscimento di siti antigenici sulla porzione extracitoplasmatica del CYP2E1 può rendere conto di un incremento della severità del danno epatico nei pazienti CHC portatori di IgG anti-CYP2E1 conformazionali. Al momento, sono in

corso ulteriori studi volti alla comprensione dei meccanismi molecolari attraverso cui autoanticorpi, anti-CYP2E1 conformazionali possano contribuire al danno epatico in corso di epatite C. Tuttavia, non possiamo escludere che la presenza di specifici autoanticorpi anti-CYP2E1 possa essere associata ad una risposta cellulare mediata dai linfociti T. Infatti, recenti acquisizioni, nella AIH di tipo 2, indicano l'esistenza di un certo grado di sovrapposizione tra gli epitopi riconosciuti dalle cellule B e quelli che costituiscono il bersaglio delle cellule T CD4+ e CD8+ (Ma et al. 2006; Longhi et al. 2007). Inoltre, in un modello murino di cirrosi biliare primitiva è stato mostrato che le cellule B auto-reattive hanno un ruolo critico nell'indurre i linfociti T alla perdita della tolleranza nei riguardi di piruvato deidrogenasi (Robe et al. 2005).

Le ricerche riguardanti i meccanismi attraverso cui l'infezione da HCV promuova l'insorgenza di reazioni auto-immuni si sono sinora concentrate su due principali meccanismi: i) la peculiare abilità dell'HCV di stimolare l'attivazione dei linfociti B; ii) fenomeni di mimetismo molecolare tra specifiche proteine virali e proteine degli epatociti (Ferri et al. 2008; Strassburg et al. 2002; Vergani et al. 2007). Il termine mimetismo molecolare indica la presenza di omologie di sequenza o di struttura molecolare fra costituenti di micro-organismi (virus, batteri o funghi) e strutture dell'organismo per cui lo sviluppo di reazioni immuni nei confronti di agenti infettivi porta alla stimolazione di linfociti T che riconoscono specifici antigeni self. Fenomeni di mimetismo molecolare con antigeni virali sono attualmente riconosciuti come un importante fattore alla base di numerose manifestazioni di autoimmunità (Munz et al. 2009). In particolare, l'esistenza di mimetismo molecolare tra il CYP2D6 e diverse proteine virali, incluse E1, NS3, NS5A ed NS5B è stato dimostrato nel caso degli autoanticorpi anti-LKM-1 (Manns et al. 1991; Marceau et al. 2005) come pure nello sviluppo di cellule T auto-reattive dirette verso vari antigeni in CYP2D6, CYP2A6 e

CYP2A7 (Strassburg et al. 2002; Kammer et al. 1999). La possibilità che un fenomeno analogo potesse essere alla base dello sviluppo di autoanticorpi anti-CYP2E1 è emersa dall'osservazione che la sequenza CYP2E1<sub>1324-346</sub> mostra una buona omologia con quella di due peptidi situati nella proteina HCV-NS5B (NS5B<sub>438-449</sub> e NS5B<sub>456-465</sub>) nota anche come RNA polimerasi RNA-dipendente. Le due sequenze e, particolarmente NS5B<sub>456-465</sub>, appaiono essere ben conservate nei diversi genotipi di HCV eccetto il genotipo 4. Una conferma della presenza di reazioni crociate tra CYP2E1 e proteina NS5B è venuta dall'osservazione che i peptidi ricombinanti GST-NS5B<sub>438-449</sub> ed GST-NS5B<sub>456-465</sub> sono riconosciuti preferenzialmente dalle IgG anti-CYP2E1 conformazionali contenute nei sieri CHC e che tali peptidi competono con il CYP2E1 umano per il legame con i suddetti anticorpi. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'immunizzazione di topi, con i peptidi derivati da NS5B, è sufficiente ad indurre lo sviluppo di IgG capaci di cross-reagire con il CYP2E1 ricombinante. Nel loro complesso queste osservazioni indicano che il mimetismo molecolare tra antigeni derivati da NS5B e CYP2E1 possa portare all'attivazione di cloni di cellule B capaci di produrre anticorpi verso specifiche strutture conformazionali del citocromo stesso. E' interessante notare come la cross-reattività, tra la sequenza CYP2D6<sub>254-288</sub> e quelle delle proteine HCV-NS3 (serino-proteasi ed elicasi) e HCV-NS5A (fosfo-proteina) sia già stata proposta come meccanismo per spiegare l'origine degli anticorpi conformazionali anti-LKM-1 associati alla CHC (Marceau et al. 2005). Per altro, epitopi immuno-dominanti nelle stesse proteine non strutturali NS3, NS4, NS5 di HCV sono il bersaglio delle risposte mediate da linfociti T citotossici che caratterizzano l'eradicazione dell'infezione da HCV (Cramp et al. 2000; Schulze zur Wiesch et al. 2005). Questo suggerisce l'ipotesi che in pazienti con epatite cronica C una insufficiente risposta delle cellule T verso gli antigeni delle proteine non strutturali di HCV possa stimolare una attivazione delle

cellule B verso gli stessi antigeni e lo sviluppo tramite fenomeni di mimetismo molecolare di risposte auto-reative nei confronti di varie isoforme di molecole del citocromo P450.

Il fatto che due peptidi distinti, derivati da NS5B, siano riconosciuti dagli autoanticorpi anti-CYP2E1 conformazionali conferma che l'area antigenica CYP2E1<sub>324-346</sub> possa contenere almeno due epitopi separati capaci di indurre una risposta anticorpale di tipo policlonale (Fig. 8). Inoltre, la stretta prossimità di questi epitopi con il loop di connessione tra le eliche K' e L dove sono localizzate Lys420 e Phe421 (Fig. 8) può spiegare il perché le mutazioni di tali amino acidi interferiscono solo parzialmente con il riconoscimento del CYP2E1 da parte di alcuni sieri. Sorprendentemente, i sieri CHC legano efficientemente il peptide NS5B<sub>438-449</sub> che mostra una minor similarità strutturale con la propria sequenza omologa (CYP2E1<sub>324-334</sub>) (Fig.12). Questa incongruenza può essere spiegata ipotizzando che quando il peptide NS5B<sub>438-449</sub> non è racchiuso all'interno della propria molecola, possa acquisire una conformazione ad  $\alpha$ -elica simile a quella del peptide CYP2E1<sub>324-334</sub>.

In conclusione, i nostri risultati dimostrano che in un sottogruppo di pazienti con infezione cronica da HCV fenomeni di mimetismo molecolare stimolato dalla proteina NS5B di HCV possano determinare lo sviluppo di reazioni auto-immuni verso epitopi conformazionali del CYP2E1. Abbiamo inoltre dimostrato come la presenza di autoanticorpi conformazionali anti-CYP2E1 nei pazienti con persistenza dell'infezione da HCV sia un fattore di rischio per una maggior prevalenza di lesioni necro-infiammatorie severe. Ciò suggerisce che in alcuni pazienti con epatite cronica C fenomeni autoimmunitari partecipano all'evoluzione della malattia. Se queste ultime osservazioni saranno confermate da studi prospettici condotti su casistiche più ampie è possibile ipotizzare l'impiego di test per la valutazione di anticorpi conformazionali

anti-CYP2E1 per identificare soggetti con epatite C con un più alto rischio di progressione della malattia.

## BIBLIOGRAFIA

**Agrati C**, D'Offizi G, Narciso P, Abrignani S, Ippolito G, Colizzi V, Poccia F. Vdelta 1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gamma delta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons. *Mol Med* 2001; **7**:11-19.

**Alberti A**, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P, Ruol A. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* 1992 Sep 19; **340**(8821):697-8.

**Allison ME**, Wreghitt T, Palmer CR, Alexander GJ. Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in cirrhotic population. *J Hepatol* 1994; **21**: 1135-1139.

**Alter HJ**, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975; **2**(7940):838-41.

**Alter MJ** Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995; **15**:5-14.

**Alter MJ** Epidemiology of Hepatitis C. *Hepatology* 1997; **26**: 62S-5S.

**Alter MJ** The Epidemiology of acute and chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1997; **1**(3):559-68.

**Alter MJ**, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; **341**(8): 556-62.

**Alvarez F**, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 1999; **31**(5):929-38.

**An J**, Muoio DM, Shiota M, et al. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med* 2004; **10**:268-74.

**Asselah T**, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 2006; **55**(1):123-30.

**Bantel H** and Schulze-Osthoff K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ* 2003; **10**(Suppl 1): S48-S58.

**Barnes HJ.** Maximizing expression of eukaryotic cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 1996;**272**:3-14.

**Barrera JM,** Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP, del Valle Onorato M, Rodes J, Ordinas A. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 1995 Mar; **21**(3):639-44.

**Bartenschlager R,** Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 2004;**63**:71-180.

**Baskin-Bey ES** and Gores GJ. Caspase-8 death-receptor signaling, and hepatocarcinogenesis: the Fas and the furious. *Gastroenterology* 2005; **129**: 1790-1792.

**Bataller R** et al. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2005; **126**: 529-540.

**Baumann-Antczak A,** Wedlock N, Bednarek J, Kiso Y, Krishnan H, Fowler S, Smith BR, Furmaniak J. Autoimmune Addison's disease and 21-hydroxylase. *Lancet* 1992; **340**: 429-30.

**Beaune P,** Pessayre D, Dansette P, Mansuy D, Manns M. Autoantibodies against cytochromes P450: role in human diseases. *Adv Pharmacol* 1994; **30**:199-245.

**Beaune PH,** Bourdi M. Autoantibodies against cytochromes P-450 in drug-induced autoimmune hepatitis. *Ann NY Acad Sci* 1993; **685**:641-5.

**Bellentani S** and Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos Study. *J Hepatol* 2001; **35**(4): 531-7.

**Benhamou Y,** Bochet M, Di Martino V, Charlotte F, Azria F, Coutellier A, Vidaud M, Bricaire F, Opolon P, Katlama C, Poynard T. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multiviric group. *Hepatology* 1999; **30**(4): 1054-8.

**Berenguer M,** Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayón M, Córdoba J, Herola A, Ascher N, Mir J, Berenguer J, Wright TL. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000;**32**(4): 673-84.

**Bertoletti A** and Maini MK. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr Opin Microbiol* 2000; **3**: 387-392.

**Bjoro K,** Frøland SS, Yun Z, Samdal HH, Haaland T. Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *N Engl J Med.* 1994;**331**(24):1607-11.

**Bogdanos DP**, Choudhuri K, Vergani D. Molecular mimicry and autoimmune liver disease : virtuous intentions, malign consequences. *Liver* 2001; **21**: 225-232.

**Bogdanos DP**, Dalekos GN Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s. *Curr Med Chem* 2008;**15**(22):2285-92.

**Bogdanos DP**, Lenzi M, Okamoto M, Rigopoulou EI, Muratori P, Ma Y, et al. Multiple viral/self immunological cross-reactivity in liver kidney microsomal antibody positive hepatitis C virus infected patients is associated with the possession of HLA B51. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; **17**: 83-92.

**Bogdanos DP**, McFarlane IG. Cytochrome P450 2A6 meets P450 2D6: an enigma of viral infections and autoimmunity. *J Hepatol.* 2003;**39**(5):860-3.

**Boitier E**, Beaune P. Cytochromes P450 as targets to autoantibodies in immune mediated diseases. *Mol Aspects Med* 1999; **20**:84-137.

**Bortolotti F**, Vajro P, Balli F, Giacchino R, Crivellaro C, Barbera C, et al. Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996; **25**: 614-20.

**Bourdi M**, Chen W, Peter RM, Martin JL, Buters JTM, Nelson SD, et al. Human cytochrome P450 2E1 is a major autoantigen associated with halothane hepatitis. *Chem Res Toxicol* 1996; **9**: 1159-1166.

**Bourdi M**, Tinel M, Beaune PH, Pessayre D. Interactions of dihydralazine with cytochromes P4501A: a possible explanation for the appearance of anti-cytochrome P4501A2 autoantibodies. *Mol Pharmacol.* 1994;**45**(6):1287-95.

**Bowen DG** and Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005; **436**: 946-952.

**Cacoub P**, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, Loustaud-Ratti V, Yamamoto AM, Camproux AC, Hausfater P, Musset L, Veyssier P, Raguin G, Piette JC. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Medicine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatitis C. *Medicine* (Baltimore) 2000; **79**(1): 47-56.

**Canbay A**, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003;**38**(5):1188-98.

**Canbay A**, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004;**39**(2):273-8.

**Cassani F**, Cataleta M, Valentini P, Muratori P, Giostra F, Francesconi R, et al. Serum antibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. *Hepatology* 1997; **26**: 561-6.

**Charlton M** Hepatitis C infection in liver transplantation. *Am J Transplant* 2001; **1**(3) 197-203.

**Charlton M**, Seaberg E, Wiesner R, Everhart J, Zetterman R, Lake J, Detre K, Hoofnagle J. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1998 Sep; **28**(3):823-30.

**Chen SL**, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; **3**(2):47-52. Epub 2006 Apr 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**(4902):359-62.

**Clemente MG**, Meloni A, Obermayer-Straub P, Frau F, Manns MP, De Virgiliis S. Two cytochromes P450 are major hepatocellular autoantigens in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Gastroenterology* 1998 ; **114**(2):324-8.

**Clemente MG**, Obermayer-Straub P, Meloni A, Strassburg CP, Arangino V, Tukey RH, De Virgiliis S, Manns MP. Cytochrome P450 1A2 is a hepatic autoantigen in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; **82**(5):1353-61.

**Clot P**, Parola M, Bellomo G, Dianzani U, Carini R, Tabone M, Aricò S, Ingelman-Sundberg M, and Albano E. Plasma membrane hydroxyethyl radical adducts cause antibody-dependent cytotoxicity in rat hepatocytes exposed to alcohol. *Gastroenterol* 1997; **113**: 265-276.

**Colombo M** Natural history and pathogenesis of hepatitis c virus related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999; **31** S(1):25-30.

**Coon MJ**. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; **45**: 1-25.

**Corrao G**, Arico S, Russo R, Carle F, Galatola G, Torchio PF, Moiraghi AR, di Orio F, de la Pierre M. Alcohol consumption and non-cirrhotic chronic hepatitis: a case-control study. *Int J Epidemiol.* 1991; **20**(4):1037-42.

**Cox AL**, Mosbrugger T, Mao Q, Liu Z, Wang XH, Yang HC, Sidney J, Sette A, Pardoll D, Thomas DL, Ray SC. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 2005; **201**: 1741-1752.

**Cramp ME**, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis C virus-specific T cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterol* 2000; **118**:346-355.

**Czaja AJ**, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Immunologic features and HLA associations in chronic viral hepatitis. *Gastroenterology* 1995; **108**: 157-64.

**Czaja AJ**, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Significance of human leukocyte antigens DR3 and DR4 in chronic viral hepatitis. *Dig Dis Sci* 1995; **40**: 2098-2106.

**D'Souza R**, Sabin CA, and Foster GR. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**(7): 1509-15.

**Dalekos GN**, Makri E, Loges S, Obermayer-Straub P, Zachou K, Tsikrikas T, Schmidt E, Papadamou G, Manns MP. Increased incidence of anti-LKM autoantibodies in a consecutive cohort of hepatitis C patients from central Greece. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002;**14**(1):35-42.

**Dalekos GN**, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S, Loges S, Schmidt, Gershwin ME, Manns MP. Cytochrome P450 2A6: a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003; **39**: 800-806.

**Dalekos GN**, Wedemeyer H, Obermayer-Straub P, Kayser A, Barut A, Frank H, Manns MP. Epitope mapping of cytochrome P4502D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C during alpha-interferon treatment. *J Hepatol*. 1999;**30**(3):366-75.

**Dalekos GN**, Zachou K, Liaskos C, Gatselis N. Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med*. 2002;**13**(5):293-303.

**Davis GL**, Albright JE, Cook SF, Rosemberg DM. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl* 2003; **9**:331-8.

**Deignan T**, Curry MP, Doherty DG, Golden-Mason L, Volkov Y, Norris S, Nolan N, Traynor O, McEntee G, Hegarty JE, O'Farrelly C. Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 2002; **37**: 101-108.

**Dempsey PW**, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996; **271**: 348-50.

**Di Bisceglie AM** Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; Sep; **26**(3 Suppl 1):34S-38S.

**Di Bisceglie AM**, Goodman ZD, Ishak KG, Hoofnagle JH, Melpolder JJ, Alter HJ. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology*. 1991 Dec;**14**(6):969-74.

**Di Martino V**, Rufat P, Boyer N, Renard P, Degos F, Martinot-Peignoux M, Matheron S, Le Moing V, Vachon F, Degott C, Valla D, Marcellin P. The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long term retrospective cohort study. *Hepatology* 2001; **34**(6): 1193-9.

**Dickson RC**. Clinical manifestations of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1997; **1**: 569-585.

**Ding X**, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; **43**: 149.

**Dupont I**, Lucas D, Clot P, Ménez C, Albano E. Cytochrome P4502E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics. *J Hepatology* 1998; **28**: 564-571.

**Durante-Mangoni E**, Wang R, Shaulov A, He Q, Nasser I, Afdhal N, Koziel MJ, Exley MA. Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resident proinflammatory CD1d-reactive cells. *J Immunol* 2004; **173**: 2159-2166.

**Eliasson E**, Kenna JG. Cytochrome P450 2E1 is a cell surface autoantigen in halothane hepatitis. *Mol Pharmacol* 1996;**50**:573-582.

**Exley MA** and Koziel MJ. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology* 2004; **40**: 1033-1040.

**Fartoux L**, Poujol-Robert A, Guechot J, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2005; **54**: 1003-1008.

**Fattovich G**, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997 Feb;**112**(2):463-72.

**Fearon DT**, Carrol MC. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 392-422.

**Feinstone SM**, KapiKian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; **292**: 767-70.

**Ferri C**, Mascia MT. Cryoglobulinemic vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2006; **18**: 54-63.

**Ferri S**, Muratori L, Lenzi M, Granito A, Bianchi FB, Vergani D. HCV and autoimmunity. *Curr Pharm Des* 2008;**14**(17):1678-85.

**Frese M**, Schwärzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002; **35**: 694-703.

**Fu YX**, Roark CE, Kelly K, Drevets D, Campbell P, O'Brien R, Born W. Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by gamma delta T cells. *J Immunol* 1994; **153**: 3101-3115.

**Garcia-Buey L**, Garcia-Monzon C, Rodriguez S, Borque MJ, Garcia-Sanchez A, Iglesias R, et al. Latent autoimmune hepatitis triggered during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1770-7.

**Gebre-Medhin G**, Husebye ES, Gustafsson J, Winqvist O, Goksøyr A, Rorsman F, Kämpe O. Cytochrome P450IA2 and aromatic L-amino acid decarboxylase are hepatic autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *FEBS Lett.* 1997;**412**(3):439-45.

**Gillam EM**, Guo Z, Guengerich FP. Expression of modified human cytochrome P450 2E1 in Escherichia coli, purification, and spectral and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys.* 1994;**312**(1):59-66.

**Giostra F**, Manzin A, Lenzi M, et al. Low hepatitis C viremia levels in patients with anti-liver/kidney microsomal antibody type 1 positive chronic hepatitis. *J Hepatol* 1996; **25**: 433-438.

**Giostra F**, Manzin A, Lenzi M, Francesconi R, Solforosi L, Manotti P, et al. Low hepatitis C viremia levels in patients with anti-liver/kidney microsomal antibody type 1 positive chronic hepatitis. *J Hepatol* 1996; **25**: 433-8.

**Golden-Mason L** and Rosen HR. Natural killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies? *Liver transpl* 2006; **12**: 363-372.

**Gong G**, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9599-9604.

**Goodnow CC**. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2264-71.

**Grüner NH**, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiari M, Cerny A, Pape GR. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 2000; **181**(5): 1528-36.

**Guidotti LG** and Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 65-91.

**Guidotti LG**, Borrow P, Brown A, McClary H, Koch R, Chisari FV. Noncytotoxic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from hepatocyte. *J Exp Med* 1999; **189**: 1555-1564.

**Hayday A** and Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 233-242.

**Hedlund E**, Gustafsson JA, Warner M. Cytochrome P450 in the brain; a review. *Curr Drug Metab* 2001; **2**: 245.

**Hiscott J**, Lin R, Nakhaei P, Paz S. MasterCARD: a priceless link to innate immunity. *Trends Mol Med* 2006; **12**: 53-56.

**Hoet P**, Graf ML, Bourdi M, Pohl ML, Duray PH, Chen W, et al. Epidemic of liver disease caused by hydrochlorofluorocarbon used as ozone-sparing substitutes of chlorofluoro carbons. *Lancet* 1997; **350**: 556-559.

**Holdener M**, Hintermann E, Bayer M, Rhode A, Rodrigo E, Hintereder G, Johnson EF, Gonzalez FJ, Pfeilschifter J, Manns MP, Herrath MG, Christen U. Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P4502D6 by virus infection. *J Exp Med* 2008; **205**: 1409-1422.

**Hoofnagle JH** Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; Sep; **26**(3 Suppl 1):15S-20S.

**Houghton M**, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991 Aug; **14**(2):381-8.

**Hui JM**, Sud A, Farrel GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression. *Gastroenterology* 2003; **125**: 1695-1704.

**Hwang SJ**, Chu CW, Huang DF, Lan KH, Chan FY, Lee SD. Genetic predispositions for the presence of cryoglobulinemia and serum antibodies in Chinese patients with chronic hepatitis C. *Tissue Antigens* 2002; **59**:31-7.

**Ishak K**, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995; **22**(6):696-9.

**Kagi D** and Hengartner H. Different roles for cytotoxic T cells in the control of infections with cytopathic versus noncytopathic viruses. *Curr Opin Immunol* 1996; **8**:472-477.

**Kammer AR**, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KM, Reichen J, Melief CJ, Cerny A. *J Exp Med* 1999; **190**:169-176.

**Karre K**. How to recognize a foreign submarine. *Immunol Rev* 1997; **155**: 5-9.

**Kawaguchi T**, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, Taniguchi E, Kumemura H, Hanada S, Maeyama M, Baba S, Koga H, Kumashiro R, Ueno T, Ogata H, Yoshimura A, Sata M. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 2004;165:1499-1508.

**Kenna T**, Golden-Mason L, Norris S, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol* 2004; **113**: 56-63.

**Kerkar N**, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, et al. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003; **170**: 1481-9.

**Kim KH**, Hong SP, Kim K, Park MJ, Kim KJ, Cheong J. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;**355**(4):883-8.

**Lanzavecchia, A.** How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J Exp Med* 1995; 181, 1945-8.

**Lechner F**, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 2479-2487.

**Lechner F**, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; **191**(9): 1499-512.

**Lecoeur S**, Andre C, Beaune PH. Tienilic acid-induced autoimmune hepatitis: anti-liver and-Kidney microsomal type 2 autoantibodies recognize a three-site conformational epitope on cytochrome P4502C9. *Mol Pharmacol* 1996;**50**:326-333.

**Leeder JS**, Gaedigk A, Lu X, Cook VA. Epitope mapping studies with human anti-cytochrome P450 3A antibodies. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:234-243.

**Lenzi M**, Bellantani S, Saccoccio G, Muratori P, Masutti F, Muratori L, et al. Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of Dionysos cohort. *Gut* 1999; **45**: 435-41.

**Lesens O**, Deschênes M, Steben M, Bélanger G, Tsoukas CM. Hepatitis C virus is related to progressive liver disease in human immunodeficiency virus-positive hemophiliacs and should be treated as opportunistic infection. *J Infect Dis* 1999; **179**(5): 1254-8.

**Levy S**, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 136-148.

**Liangpunsakul S**, Kolwankar D, Pinto A, Gorski CJ, Hall SD, Chalasani N. Activity of CYP2E1 and CYP3A4 enzymes in adults with moderate alcohol consumption: a comparison with nonalcoholics. *Hepatology* 2005; **41**: 1144-1150.

**Lijima Y**, Kato T, Miyakawa H, Ogino M, Mizuno M, Sugihara K, et al. Effect of interferon therapy on Japanese chronic hepatitis C virus patients with anti-liver/kidney microsome antibody type 1. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; **16**: 782-8.

**Lindenbach BD**, Rice CM. Unraveling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005; **436**: 933-938.

**Liu ZX**, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G. NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection. *J Immunol* 2000; **164**: 6480-6486.

**Ljunggren HG** and Karre K. In search of the "missing self": MHC molecule and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; **11**: 237-244.

**Loeper J**, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Belghiti J, Houssin D, et al. Cytochrome P450 in human hepatocyte plasma membrane : recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology* 1993; **104**: 203-216.

**Longhi MS**, Hussain MJ, Bogdanos DP, Quaglia A, Mieli-Vergani G, Ma Y, Vergani D. Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology* 2007; **46**: 472-484.

**Lunel F** and Cacoub P. Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; **31**(Suppl1): 210-6.

**Lytton SD**, Hellander A, Zhang-Gouillon ZQ, Stokkeland K, Bordone R, Aricò S, Albano E, French SW, Ingelman-Saundberg M. *Mol Pharmacol* 1999; **55**: 223-233.

**Ma Y**, Bogdanos DP, Hussain MJ, Underhill J, Bansal S, Longhi MS, et al. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis C type 2. *Gastroenterology* 2006; **130**: 868-82.

**Ma Y**, Okamoto M, Thomas MG, Bogdanos DP, Lopes AR, Portmann B, et al. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2002; **35**: 658-64.

**Ma Y**, Thomas MG, Okamoto M, Bogdanos DP, Nagl S, Kerkar N, Lopes AR, Muratori L, Lenzi M, Bianchi FB, Mieli-Vergani G, Vergani D. *J Immunol* 2002; **169**: 277-285.

**Manns MP**, Griffin KJ, Quattrochi LC, Sacher M, Thaler H, Tukey RH, Johnson EF. Identification of cytochrome P450IA2 as a human autoantigen. *Arch Biochem Biophys*. 1990;**280**(1):229-32.

**Manns MP**, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1370-8.

**Manns MP**, Obermayer-Straub P. Cytochromes P450 and uridine triphosphate-glucuronosyltransferases: model autoantigens to study drug-induced, virus-induced, and autoimmune liver disease. *Hepatology* 1997;**26**(4):1054-66.

**Marceau G**, Lapierre P, Beland K, Soudeyns H, Alvarez F. LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry? *Hepatology* 2005; **42**: 675-82.

**Marcellin P**. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 1999; **31** S (1):9-16.

**Matsumoto I**, Staub A, Benoist C, Mathis D. Arthritis provoked by linked T- and B-cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 1999; **286**: 1732-5.

**Mattsson L**, Sonnerborg A, Weiland O. Outcome of acute symptomatic non-A, non-B hepatitis: a 13-year follow-up study of hepatitis C virus markers. *Liver* 1993 Oct; **13**(5):274-8.

**Mazzocca A**, Sciammetta SC, Carloni V, Cosmi L, Annunziato F, Harada T, Abrignani S, Pinzani M. Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 up-regulates matrix metalloproteinase-2 in human hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005;**280**:11329-11339.

**McCaughan GW**, George J. Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus Infection. *Gut* 2004; **53**: 318-321.

**Melhem A**, Muhanna N, Bishara A, Alvarez CE, Ilan Y, Bishara T, Horani A, Nassar M, Friedman SL, Safadi R. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol* 2006; **45**: 60-71.

**Meylan E**, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005; **437**:1167-1172.

**Miyakawa H**, Kitazawa E, Kikuchi K, Fujikawa H, Kawaguchi N, Abe K, et al. Immunoreactivity to various human cytochrome P450 proteins of sera from patients with autoimmune hepatitis, chronic hepatitis B, and chronic hepatitis C. *Autoimmunity* 2001; **33**: 23-32.

**Mizutani T**, Shinoda M, Tanaka Y, Kuno T, Hattori A, Usui T, Kuno N, Osaka T. Autoantibodies against CYP2D6 and other drug-metabolizing enzymes in autoimmune hepatitis type 2. *Drug Metab Rev* 2005;**37**(1):235-52.

**Monti V**, Aghemo A, Rumi MG, Donato MF, Del Ninno E, Colombo M. The prevalence, clinical features and response to antiviral therapy of patients with chronic hepatitis C who are seropositive for liver-kidney microsome type 1 antibodies. *Antivir Ther* 2005; **10**: 715-20.

**Moriya K**, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001; **61**:4365-4370.

**Munz C**, Lunemann JD, Teague Getts M, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* 2009;**9**:245-258.

**Muratori L**, Lenzi M, Cataleta M, Giostra F, Cassani F, Ballardini G, et al. Interferon therapy in liver/kidney microsomal antibody type 1-positive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994; **21**: 199-203.

**Muratori L**, Parola M, Ripalti A, Robino G, Muratori P, Bellomo G, et al. Liver/kidney microsomal antibody type targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 2000; **46**: 553-61.

**Muratori P**, Muratori L, Stroffolini T, Pappas G, Terlizzi P, Ferrari R, et al. Prevalence of non-organ specific autoantibodies in HCV-infected subjects in the general population. *Clin Exp Immunol* 2003; **131**: 118-21.

**Naoumov N**. Hepatitis C virus infection in Eastern Europe. *J Hepatol* 1999; **31**: S84-7.

**Napoli J**, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; **24**: 759-765.

**Neuschwander-Tetri BA**, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; **37**:1202-19.

**Neve EP**, Eliasson E, Pronzato MA, Albano E, Marinari U, Ingelman-Sundberg M. Enzyme-specific transport of rat liver cytochrome P450 to the Golgi apparatus. *Arch Biochem Biophys* 1996; **333**: 459-465.

**Neve EPA**, Hidestrand M, Ingelman-Sundberg M. Identification of sequences responsible for intracellular targeting and membrane binding of rat CYP2E1 in yeast. *Biochem* 2003;**43**:14566-14575.

**Nguyen MH**, Whittemore AS, Garcia RT, Tawfeek SA, Ning J, Lam S, Wright TL, Keeffe EB. Role of ethnicity in risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; **2**(9): 820-4.

**Nikolopoulou V**, Skoutelis A, Thomopoulos K, Salsaa B, Zoumbos N. An increased number of circulating gamma/delta TCR+ T cells in patients with chronic viral hepatitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; **10**: 115-118.

**Njoko DB**, Mellerson JL, Talor MV, Kerr DR, Faraday NR, Outshoor I, et al. Role of CYP2E1 immunoglobulin G4 subclass antibodies and complement in the pathogenesis of idiosyncratic drug-induced hepatitis. *Clin Vac Immunol* 2006; **13**: 258-265.

**Nuti S**, Rosa D, Valiante NM, Saletti G, Caratozzolo M, Dellabona P, Barnaba V, Abrignani S. Dynamics of intra-hepatic lymphocyte in chronic hepatitis C: enrichment for Valpha24(+) T cells and rapid elimination of effectors cells by apoptosis. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 3448-3455.

**Omura T**, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem.* 1964 **1**; **239**:2370-8.

**Oneta CM**, Lieber CS, Li J, Ruttiamann S, Schmid B, Lattmann J, et al. Dynamics of cytochrome P4502E1 activity in man: induction by ethanol and disappearance during withdrawal phase. *J Hepatol* 2002; **36**: 47-52.

**Pagliari L**, Peri V, Linea C, Camma C, Giunta M, Magrin S. Natural history of chronic hepatitis C. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999 Jan-Feb; **31**(1):28-44.

**Paradis V**, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, et al. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; **34**: 738-744.

**Penin F**, Dubuisson J, rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; **39**: 5-19.

**Pernollet M**, Jouvin-Marche E, Leroy V, Vigan I, Zarski JP, Marche PN. Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in the peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions. *Clin Exp Immunol* 2002; **130**: 518-525.

**Pileri P**, Uematsu Y, Camapagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; **282**: 938-941.

**Poynard T**, Bedossa P, and Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; **349**(9055): 825-32.

**Radaeva S**, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 2006; **130**: 435-452.

**Ragni MV** and Belle SH. Impact of human immunodeficiency virus infection on progression to end-stage liver disease in individuals with hemophilia and hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2001; **183**(7): 1112-5.

**Rehermann B** and Shin EC. Private aspects of heterologous immunity. *J Exp Med* 2005; **201**: 667-670.

**Rigamonti C**, Vidali M, Donato MF, Sutti S, Occhino G, Ivaldi A, Arosio E, Agnelli F, Rossi G, Colombo M, Albano E. Serum autoantibodies against cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) predict severity of necroinflammation of recurrent hepatitis C. *Am J Transplant* 2009;**9**:601-609.

**Robe AJ**, Kirby JA, Jones DE, Palmer JM. A key role for autoreactive B cells in the breakdown of T-cell tolerance to pyruvate dehydrogenase complex in the mouse. *Hepatology* 2005;**41**:1106-1112.

**Robertson B**, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol*. 1998;**143**(12):2493-503.

**Robin MA**, Maratrat M, Le Roy M, Le Breton FP, Bonierbale E, Dansette P, Ballet F, Mansuy D, Pessayre D. Antigenic targets in tienilic acid hepatitis. Both cytochrome P450 2C11 and 2C11-tienilic acid adducts are transported to the plasma membrane of rat hepatocytes and recognized by human sera. *J Clin Invest* 1996; **98**:1471-80.

**Rockey DC**. Stellate cell/HCV interactions in hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2005; **129**: 2117-2118.

**Rosa D**, Saletti G, De Gregorio E, et al. Activation of naive B lymphocyte via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005; **102**: 18544-18549.

**Ryder SD**, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC; Trent Hepatitis C Study Group. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut* 2004; **53**(3): 451-5.

**Sasaki N**, Matsui A, Momoi M, Tsuda F, Okamoto H. Loss of circulating hepatitis C virus in children who developed a persistent carrier state after mother-to-baby transmission. *Pediatr Res* 1997; **42**(3): 263-7.

**Schulze zur Wiesch J**, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, Wurcel AG, Timm J, Jones AM, Mothe B, Allen TM, McGovern B, Lewis-Ximenez L, Sidney J, Sette A, Chung RT, Walker BD. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 2005;**175**:3603-3613.

**Schuppan D**, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ.* 2003;10 Suppl 1:S59-67.

**Seeff LB**, Buskell-Bales Z, Wright EC, Durako SJ, Alter HJ, Iber FL, Hollinger FB, Gitnick G, Knodell RG, Perrillo RP, 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 Dec 31;**327**(27):1906-11.

**Seth RB**, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-KappaB and IRF3. *Cell* 2005;**122**:669-682.

**Shintani Y**, Fujie H, Miyoshi H, et al. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004;**126**:840-4.

**Shoukry NH**, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghrayeb J, Reimann KA, Walker CM. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2003; **197**:1645-1655.

**Stewart SF**, Jones DE, Vidali M, Haugk B, Burt AD, Albano E and Day CP. *J Hepatol* 2004; **40**(S1):176.

**Strassburg CP**, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis.* 2002;**22**(4):339-52.

**Strassburg CP**, Obermayer-Straub P, Manns MP. Autoimmunity in liver diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2000; **18**: 127-39.

**Strassburg CP**, Vogel A, Manns MP. Autoimmunity and hepatitis C. *Autoimmun Rev* 2003; **2**:322-331.

**Sugimura T**, Obermayer-Straub P, Kayser A, Braun S, Loges S, Alex B, et al. A major CYP2D6 autoepitope in autoimmune hepatitis type 2 and chronic hepatitis C in three-dimensional structure homologous to other cytochrome P450 autoantigens. *Autoimmunity* 2002; **35**: 501-13.

**Takahashi M**, Yamada G, Miyamoto R, Doi T, Endo H, Tsuji T. Natural course of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1993 Feb;**88**(2):240-3.

**Tay CH** and Welsh RM. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* 1997; **71**: 267-275.

**Thimme R**, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; **194**: 1395-1406.

**Thomas DL** and Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005; **9**:383-398.

**Thomas DL**, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, Nolt K, Nelson KE, Strathdee SA, Johnson L, Laeyendecker O, Boitnott J, Wilson LE, Vlahov D. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *Jama* 2000; **284**(4):450-6.

**Tillmann HL**, Manns MP, Rudolph KL. Merging models of hepatitis C virus pathogenesis. *Semin Liver Dis.* 2005;**25**(1):84-92. Review. Erratum in: *Semin Liver Dis.* 2005 Aug;**25**(3):378.

**Todros L**, Saracco G, Durazzo M, Abate ML, Touscoz G, Scaglione L, et al. Efficacy and safety of interferon alfa therapy in chronic hepatitis C with autoantibodies to liver/kidney microsomes. *Hepatology* 1995; **22**: 1374-8.

**Tran A**, Yang G, Doglio A, Ticchioni M, Laffont C, Durant J, Bernard JL, Gugenheim J, Saint-Paul MC, Bernard A, Rampal P, Benzaken S. Phenotyping of intrahepatic and peripheral blood lymphocyte in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1997; **42**: 2495-2500.

**Trépo C**, Pradat P. Hepatitis C virus infection in Western Europe. *J Hepatol* 1999; **31**: S80-3

**Tseng CT**, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR. Characterization of liver T-cell receptor gammadelta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections. *Hepatology* 2001; **33**: 1312-1320.

**Uibo R**, Aavik E, Peterson P, Perheentupa J, Aranko S, Pelkonen R, Krohn KJ. Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450scc, P450c17, and P450c21 in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **78**: 323-8.

**Urbani S**, Amadei B, Fisicaro P, Pilli M, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. Heterologous T cell Immunity in severe hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2005; **201**: 675-680.

**Vento S**, Cainelli F. Does hepatitis C virus cause severe liver disease only in people who drink alcohol? *Lancet Infect Dis* 2002 May;**2**(5):303-9.

**Vergani D**, Mieli-Vergani G. The impact of autoimmunità on hepatocytes. *Sem Liver Dis.* 2007; **27**:140-151.

**Vidali M**, Hidestrand M, Eliasson E, Mottaran E, Reale E, Rolla R, et al. Use of molecular simulation for mapping conformational CYP2E1 epitopes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 50949-50955.

**Vidali M**, Occhino G, Ivaldi A, Serino R, Moia S, Alchera E, Carini R, Rigamonti C, Albano E. Detection of auto-antibodies against cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007; **46**: 605-612.

**Vidali M**, Stewart SF, Rolla R, Daly AK, Chen Y, Mottaran E, et al. Genetic and epigenetic factors in autoimmune reactions toward cytochrome P4502E1 in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2003; **37**: 277-285.

**Vogt M**, Lang T, Frösner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, Wiebecke B, Langer B, Meisner H, Hess J. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999; **341**(12): 866-70.

**Wack A**, Soldaini E, Tseng C, Nuti S, Klimpel G, Abrignani S. Bindin of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 2001;**31**:166-175.

**Waris G**, Felmlee DJ, Negro F, Siddiqui A. Hepatitis C Virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress. *J Virol* 2007; **81**: 8122-8130.

**Wasley A** and Alter MJ Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000; **20**(1):1-16.

**Waterhouse NJ**, Clarke CJ, Sedelies KA, Teng MW, Trapani JA. Cytotoxic lymphocytes; instigators of dramatic target cell death. *Biochem Pharmacol* 2004;**68**: 1033-1040.

**Weiner AJ**, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 Apr 15;**89**(8):3468-72.

**Wiley TE**, McCarthy M, Breidi L, McCarthy M, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* 1998; **28**(3):805-9.

**Winqvist O**, Karlsson FA, Kampe O. 21-Hydroxylase, a major autoantigen in idiopathic Addison's disease. *Lancet* 1992; **339**: 1559-62.

**Wise M**, Bialek S, Finelli L, Bell BP, Sorvillo F. Changing trends in hepatitis C-related mortality in the United States, 1995-2004. *Hepatology* 2008; **47**: 1128-35.

**Wu DF**, Ceberdaum AI. Precence of functionally active cytochrome P-450IIE1 in plasma membrane of rat hepatocytes. *Hepatol* 1992; **15**: 515-524.

**Yamamoto AM**, Cresteil D, Homberg JC, Alvarez F. Characterization of anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM1) from hepatitis C virus-positive and negative sera. *Gastroenterology* 1993; **104**: 1762-1767.

**Yano M**, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J, Okuda K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1996 Jun;**23**(6):1334-40.

**Yonekura K**. Liver infiltrating CD56 positive T lymphocyte in hepatitis C virus infection. *Liver* 2000; **20**: 357-365.

**Yoon EJ** and Hu KQ. Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis. *Int J Med Sci* 2006; **3**: 53-56.

**Zachou K**, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis*. 2004 ;**1**(1):2.

**Zignego AL**, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzetti M, Foschi M, Maggi E, Romagnani S, Gentilini P, Br  chot C. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol*. 1992;**15**(3):382-6.

**Zinegno AL**, Giannelli F, Marocchi ME, Mazzocca A, Ferri C, Giannini C, Monti M, Caini P, Villa GL, Laffi G, Gentilini P. T(14;18) translocation in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2000; **31**: 474-479.