



Università degli Studi di Roma  
"TOR VERGATA"

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE  
(XIX CICLO)

**Analisi dell'interazione fra la proteina non  
strutturale 5A del virus dell'epatite C e le  
proteine cellulari**

**Candidata:** Dott.ssa Marta Romani

**Docente guida:** Prof. Mauro Piacentini

*A Pipo,*

*“.....voglio solo dormirti addosso.....”*

# INDICE

<b>Summary</b> .....Pag.	6
<b>Premessa</b> .....Pag.	10
<b>1.Introduzione</b> .....Pag.	13
1.1 Un po' di storia.....	13
1.2 Organizzazione del genoma virale.....	14
1.3 Proteine virali.....	16
1.4 Ciclo vitale del virus.....	19
1.4.1 Adesione ed ingresso.....	20
1.4.2 Traduzione e maturazione della poliproteina.....	22
1.4.3 Replicazione virale .....	25
1.4.4 Produzione e rilascio dei nuovi virioni.....	29
1.5 Sistemi modello per lo studio della replicazione virale.....	30
1.5.1 Virus correlati.....	30
1.5.2 Modelli animali.....	31
1.5.3 Modelli murini.....	31
1.5.4 Repliconi.....	32
1.5.5 Replicazione completa del virus dell'epatite C in cellule in coltura.....	37
1.6 Interazioni virus-ospite.....	37
1.6.1 Alterazione della proliferazione.....	41
1.6.2 Alterazione di altre funzioni cellulari.....	44
1.6.3 Alterazione delle vie di trasduzione dell'IFN.....	45
1.6.4 Proteine VAP e HCV.....	52
1.7 Stress del reticolo endoplasmatico (ER Stress).....	54
1.7.1 HCV e ER stress.....	60
1.7.2 HCV, ER stress e ROS .....	61
<b>2. Scopo del lavoro</b> .....Pag.	65
<b>3. Materiale e Metodi</b> .....	68
3.1 Chimici e reagenti.....	68
3.2 Procedure per il clonaggio .....	68
3.2.1 PCR (reazione a catena della polimerasi) .....	68

3.2.2 Inserimento nel replicone di HCV di un doppio <i>tag</i> (HA-Flag) nella sequenza che codifica per la proteina virale NS5A.....	69
3.2.3 Annealing e fosforilazione di oligo.....	70
3.2.4 Trascrizione <i>in vitro</i> (MEGAscript Protocol).....	71
3.2.5 Elettroporazione di RNA in cellule di epatoma umano Huh7.....	72
3.2.6 Digestione del DNA con enzimi di restrizione.....	72
3.2.7 Gel di agarosio .....	73
3.2.8 Estrazione del DNA dal gel di agarosio per elettrodiluizione.....	74
3.2.9 Purificazione del DNA tramite estrazione fenolo/cloroformio/alcool isoamilico e precipitazione.....	74
3.2.10 Reazione di ligasi.....	75
3.2.11 Plasmidi utilizzati.....	75
3.2.12 Trasformazione di cellule procariotiche competenti per elettroporazione.....	76
3.2.13 Procedura di purificazione del DNA plasmidico su piccola scala (MINI-PREP) .....	76
3.2.14 Procedura di purificazione del DNA plasmidico su larga scala (MAXI-PREP) .....	77
3.2.15 Preparazione cellule procariotiche competenti.....	78
3.3 Procedure per l'analisi dell'espressione genica .....	79
3.3.1 Estrazione di RNA da cellule.....	79
3.3.2 Trascrizione inversa (Reverse Transcription System – Promega).....	79
3.3.2.1 PCR con GoTaq (Promega).....	80
3.3.3 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS- PAGE) .....	81
3.3.4 Saggio Bradford per determinare la concentrazione proteica di un campione.....	82
3.3.5 Western Blot (WB) .....	82
3.3.6 Immunofluorescenza indiretta (IF).....	83
3.3.7 Immunoprecipitazione (IP) .....	84
3.3.8 “Tandem Affinity Purification System” (TAP) .....	86
3.3.9 Infezione virale .....	89
3.3.10 Colorazione gel di poliacrilammide con Sypro Ruby TM.....	90
3.3.11 “Small Interference RNA” (si-RNA).....	91

3.4 Cellule utilizzate .....	91
3.4.1 Terreni di coltura e soluzioni utilizzate per mantenere le cellule in coltura .....	91
3.5 Anticorpi utilizzati .....	92
3.6 Proteomica .....	93
3.6.1 Separazione ed isolamento di proteine.....	94
3.6.2 Acquisizione di informazioni sulla composizione peptidica delle proteine.....	94
3.6.3 Utilizzazione di database.....	97
3.6.4 Digestione in gel di poliacrilammide.....	99
<b>4. Risultati</b> .....Pag.	101
4.1 Clonaggio della proteina virale NS5A fusa con il TAP-tag nel vettore di espressione pLPCX.....	101
4.2 Espressione delle proteine virali in cellule di mammifero tramite infezione virale .....	104
4.3 Identificazione di proteine cellulari che interagiscono con la proteina non strutturale 5A di HCV tramite esperimenti di <i>Tandem Affinity Purification</i> .....	105
4.4 L'overespressione della proteina cellulare Grp78 riduce la sintesi delle proteine virale .....	108
4.5 Grp78 è coinvolto nell'inibizione di HCV indotta da stress del reticolo.....	113
4.6 Inserimento delle sequenze che codificano per i due tag (HA e Flag) nel replicone di HCV .....	115
4.7 Identificazione di proteine cellulari che interagiscono con la proteina non strutturale 5A di HCV tramite esperimenti di doppia immunoprecipitazione .....	118
<b>5. Discussione</b> .....Pag.	122
<b>6. Bibliografia</b> .....Pag.	129
<b>7. Ringraziamenti</b> .....	155

## Summary

Hepatitis C virus (HCV) is a major public health problem. Nearly 3 % of the world's population are HCV-infected (Alter H.; 1999). The 80 % of seropositive individuals develop a chronic infection, which causes, in one third of the cases, liver cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma. For these reasons, HCV infection is today the main reason for liver transplantation worldwide (Lauer G.M. *et al.*, 2001). The current treatment for chronic HCV is  $\alpha$ -interferon (IFN- $\alpha$ ), in combination with the nucleoside analogue ribavirin. However, half of the infected individuals with chronic disease do not achieve sustained clearance of hepatitis C virus. Whereas treatment with IFN- $\alpha$  alone achieved only modest success, the addition of the broad-spectrum antiviral agent ribavirin greatly improved responses. Since HCV isolation in 1989 (Choo Q. *et al.*, 1989), the elucidation of the biology of this pathogen has been a major goal of researchers in the hepatology field.

HCV is classified within the *Flaviviridae* family as the sole member of a distinct genus called hepacivirus. It is a positive stranded RNA virus of approximately 9.6Kb, packaged into an enveloped particle. The genome carries a single "open reading frame" (ORF) encoding a polyprotein that is proteolytically cleaved, by cellular and viral proteases, in at least 10 proteins: Core (C) - E1 - E2 - p7 - NS2 - NS3 - NS4A - NS4B - NS5A - NS5B (Bartenschlage R. and Lohmann V., 2000; Grakoui A. *et al.*, 1993a). The ORF is flanked by 5'- and 3'-non-translated regions (NTR), containing conserved RNA structures essential for the translation and replication of HCV (Thomson B.J. and Finch R.G., 2005). The first cleavage products of the polyprotein are the structural proteins: core protein (C), forming the major constituent of the nucleocapsid (Yasui *et al.*, 1998) and the highly glycosylated trans-membrane envelope proteins E1 and E2. The structural proteins C, E1 and E2 are released by host proteases and directed to the endoplasmic reticulum (ER) - Golgi complex (Grakoui A. *et al.*, 1993a; Martire G. *et al.*, 2001).

The non-structural (NS) proteins are processed by two distinct viral protease activities (NS2-NS3 and NS3-NS4A) (Grakoui A. *et al.*, 1993b; Hijikata M. *et al.*, 1993); and participate to the formation of the viral replication complex. Besides its proteolytic activity, NS3 functions also as NTPase/helicase (Tai C.L. *et al.*, 1996; Kim D.W. *et al.*, 1995). NS4B is an integral membrane protein that has a direct role in the reorganization of

cellular membranes in a structure, indicated as a membranous web, necessary for viral replication (Egger D. *et al.*, 2002, Gosert R. *et al.*, 2003). NS5B has been identified as the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Behrens S.E. *et al.*, 1996; Lohmann V *et al.*, 1997; Yamashita T. *et al.*, 1998). In contrast, the role of NS5A, a highly phosphorylated protein, in viral replication remains to be fully elucidated (Asabe S. *et al.*, 1997; Kaneko T. *et al.*, 1994; Tanji *et al.*, 1995).

The study of the viral life cycle has long been hampered by the lack of efficient cell culture systems, in fact because HCV does not efficiently replicate in cell lines *in vitro*. The development of HCV replicons, subgenomic HCV RNAs selected for their ability to replicate in Huh7 hepatoma cells, has been a fundamental advance to perform studies on the virus life cycle. In particular, it allows to determine the function(s) of individual HCV proteins during viral replication and antiviral response inhibition (Lohmann V. *et al.*, 1999; Ikeda M. *et al.*, 2002). Very recently, using a HCV isolated from a patient with fulminant hepatitis, the replicon technology has finally allowed to establish of a replicon able to produce viral particles infectious for both cultured cells and chimpanzees (Wakita T. *et al.*, 2005; Zhong J. *et al.*, 2005; Lindenbach B.D. *et al.*, 2005).

Since HCV is a relative small virus, in order to accomplish genome replication and formation of new viral particle, it needs to interact with and subvert the cellular machinery for its own purpose. A large number protein-protein interactions has been observed between HCV and host cells. However to date, most of them are only descriptive and their functions in HCV life cycle remain to be characterized (Tellinghuisen T.L. and Rice C.M.; 2002).

NS5A protein of HCV has been shown to interact with a variety of cellular proteins implicated in different cellular pathways, however its role in HCV life cycle and pathogenesis is not yet clear. To gain further insight into the function of NS5A, I have attempted to identify NS5A interacting proteins coupling “*Tandem Affinity Purification*” (TAP) technology and proteomic analysis (Rigaut G. *et al.*, 1999). In hepatoma Huh7 cells, two cellular proteins were isolated, the glucose-regulated protein 78 (Grp78), and BIN1.

Grp78, a master regulator of ER functions, is responsible for; (I) maintaining the permeability barrier of the ER during protein translocation; (II) directing protein folding and assembly; (III) targeting misfolded proteins for retrograde translocation; (IV) contributing to ER calcium stores and (V) sensing conditions of in ER stress (Linda M.H., 2004).

BIN1 (Bridging Integrator-1) is a proapoptotic factor, widely expressed in normal cells, implicated in different functions as (I) tumor suppression; (II) cell death processes in malignant human cells; (III) cell cycle control and (IV) membrane vesicle trafficking.

A Huh7 cell line carrying a subgenomic HCV replicon was used to investigate whether the identified proteins play a role in HCV replication. To this aim, Grp78 and BIN1 expression levels in HCV replicon cells were either increased or decreased by ectopically over-expression or small RNA interference (si-RNA). No significant alterations of HCV replication were observed when BIN1 levels were modulated, whereas up-regulation of Grp78 expression caused a strong decrease in HCV proteins expression. Interestingly, alteration of HCV proteins levels was not due to a decreased amount of viral RNA, indicating that Grp78-mediated HCV inhibition occurs at translational or post translational level. Furthermore, I found that ER stress induced by tunicamycin, which leads to Grp78 expression, decreased HCV proteins level in a Grp78-dependent manner. These data demonstrate that an antiviral response could be activated by the ER stress during HCV infection and Grp78 could play a direct role inhibiting HCV protein expression.

In order to study NS5A protein-protein interactions in a more physiological, I generated a modified version of the HCV replicon in which two *tags* (HA and Flag) have been inserted into the NS5A coding sequence. This model allowed the expression of NS5A together with the other NS viral proteins in the context of viral replication. A HCV NS5A HA-Flag replicon Huh7 cell line was established by RNA electroporation and selection for G418 resistance (Rep60 NS5A HA-Flag).

Immunofluorescence analysis showed that NS5A localizes differently when expresses alone or together with the other HCV non-structural proteins. Its localization results in fact more restricted and definite when the viral protein is together with the other NS proteins.

Since it is known that HCV replication occurs in association with endoplasmic reticulum (ER) (Hardy R.W. *et al.*, 2003), proteins extract from this cell compartment were used for NS5A immunoprecipitation assays.

ER-enriched proteins fractions were extracted from Huh7 cells, either an unmodified NS5A replicon (Rep60), or the NS5A-tagged replicon (Rep60 NS5A HA-Flag), and immunoprecipitated using anti-HA and anti-flag mAbs. Several specific bands were isolated from Rep60 NS5A HA-Flag protein extracts. The number of the isolated protein bands are significantly increased to those obtained using the TAP system, thus indicating that, as



expected, in a viral replication environment NS5A is involved in a higher complexity of interactions. However, only part of these proteins have been identified until now. Among them I found BIN1, thus confirming that this interaction is specific and it is not a consequence of the solely NS5A overexpression. More interestingly, the VAPs proteins has been identified as interactors of NS5A.

The VAPs proteins are ubiquitously expressed in human tissues; noted also as vesicle-associated membrane protein (VAMP), have been already interestingly shown to interact with NS5A (Tu H. *et al.*, 1999, Gao L. *et al.*, 2004, Hamamoti I. *et al.*, 2005). These cellular proteins have been described to be involved in vesicle transport; including the regulation of vesicle transport in the ER/Golgi pathway.

Although the role of VAPs in the HCV replication needs to be investigated, it is tempting to speculate that these proteins could preserve the replication complex of HCV in association with cellular membranes. In fact Hamamoti I. and colleagues have suggested that VAP-B plays an important role in the sequestration of NS5A and NS5B in the HCV RNA replication complex; the immunodepletion of VAP-B could suppress the replication of HCV RNA in a cell-free replication assay (Hamamoti I. *et al.*, 2005).

This interaction between HCV and hVAPs, shown through immunoprecipitation by using of modified replicon (Rep60 NS5A HA-Flag), permits me to work in more physiological condition and to invest a more real situation. In conclusion is possible then maintain that this approach is better then tandem affinity purification method.

Moreover, all together, these results could help to better understand the intracellular life cycle of HCV.

## Premessa

Il virus dell'epatite C (HCV), identificato negli anni '70, ma clonato solo nel 1989, è un virus a RNA a singolo filamento, appartenente alla famiglia dei *Flaviviridae*.

HCV rappresenta il maggior agente eziologico delle epatiti non-A non-B.

Alla fine di questo secolo circa 170 milioni di persone, pari al 3% della popolazione mondiale, risultavano infettate da questo virus.

L'introduzione nel 1990 di controlli accurati sul sangue destinato alle trasfusioni, la maggior causa di trasmissione del virus, ha ridotto sensibilmente il rischio di trasmissione ad esse associato (Alter H.J., 1999). Il virus può essere trasmesso anche per via sessuale, con lo scambio di siringhe infette, da madre a feto e con un'efficienza molto bassa attraverso la saliva.

L'infezione da HCV può essere diagnosticata durante la fase acuta dell'infezione. Manifestazioni cliniche possono sopraggiungere 7-8 settimane dopo l'esposizione all'agente virale, ma possono anche intercorrere tempi più lunghi; fino a 26 settimane.

La maggior parte delle persone infettate comunque, non mostrano alcun sintomo o solo sintomi lievi. Si incontrano solo raramente invece casi di epatiti fulminanti.

Il problema principale legato all'infezione da HCV è rappresentato però dall'alta frequenza con la quale il virus cronicizza. Circa l'80% delle persone infettate da HCV infatti sviluppano un'epatite cronica che, nel 20-40% dei casi può portare a cirrosi epatica e nel 4% ad epatocarcinoma; tanto che attualmente tale patologia rappresenta la maggior causa di trapianto di fegato negli Stati Uniti (Lauer G.M. *et al.*, 2001).

Qualora l'infezione acuta evolva in un'infezione cronica, la "clearance" spontanea della viremia è molto difficile e di conseguenza molto rara. Come già detto in precedenza inoltre, circa il 20% dei pazienti sviluppano cirrosi epatica. Il lasso di tempo che intercorre fra l'infezione cronica e la cirrosi è altamente variabile e può arrivare a raggiungere anche i 20 anni dopo l'infezione. Alcuni fattori, quali l'alcool o la co-infezione con il virus dell'immunodeficienza umano di tipo 1 (HIV-1) o con il virus dell'epatite B (HBV), possono accelerare il processo. Il rischio di sviluppare epatocarcinoma può occorrere solo raramente anche in assenza di cirrosi (Fig.1).

La risposta da parte dei linfociti T citotossici in pazienti affetti da infezione cronica sembra insufficiente a contenere la viremia e l'evoluzione genetica del virus, che varia continuamente. Sembra però che questa stessa risposta dell'ospite possa provocare danni epatici collaterali, forse in seguito al rilascio di citochine infiammatorie (Lauer G.M. *et al.*, 2001). Sarebbe quindi proprio il tentativo di “distruggere” il virus a causare i danni più gravi al fegato e non il virus di per sé o la sua replicazione all'interno delle cellule epatiche.

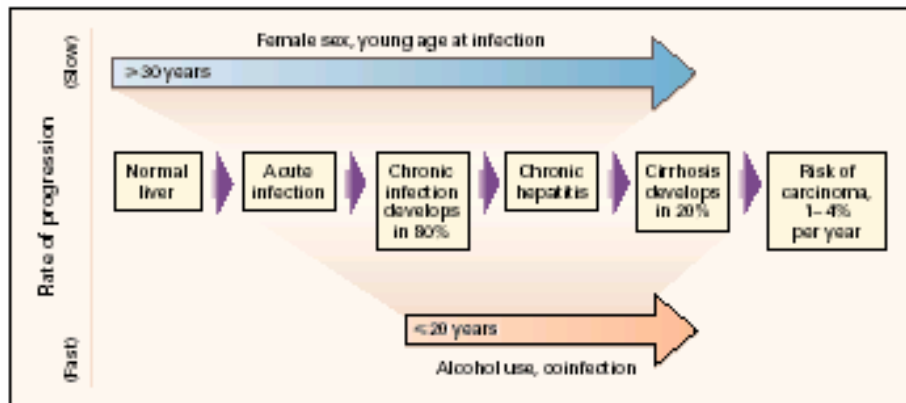


Figura 1:

Storia naturale dell'infezione da HCV

Il corso dell'infezione varia sensibilmente da persona a persona.

Dall'infezione cronica all'insorgenza di cirrosi o epatocarcinoma possono intercorrere più di trent'anni. Questo intervallo di tempo diminuisce se si fa uso di alcool o se si è già infettati da altri virus, quali HIV-1 (virus dell'immunodeficienza umano di tipo I) o HBV (virus dell'epatite B).

Una volta progredita in cirrosi, il rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare si aggira intorno all'1-4% per anno.

(Lauer G.M. *et al.*, 2001.)

In aggiunta a danni epatici poi, ci possono essere importanti manifestazioni extra-epatiche dell'infezione. Molte di queste sindromi sono associate con la capacità di HCV di replicarsi in cellule mononucleate del sistema periferico (PBMC) (Fournier C. *et al.*, 1998; Cribier B. *et al.*, 1995). Tra queste sindromi le più frequenti sono certamente le crioglobulinemie; affezioni conseguenti all'abnorme aumento nel siero di proteine anticorpali

che presentano una solubilità dipendente dalla temperatura (crioglobuline) (Lauer G.M. *et al.*, 2001).

A tutt'oggi la sola terapia possibile per il trattamento dell'epatite C è rappresentata da alte dosi di interferone di tipo I- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) da solo o in combinazione con un analogo nucleosidico della guanosina, la ribavirina; solo il 35-40% dei pazienti però sembrano rispondere positivamente al trattamento, che può causare in alcuni casi anche gravi effetti collaterali (Lavanchy D. *et al.*, 1999). Inoltre la risposta al trattamento sembra strettamente legata al genotipo virale.

Un importante passo avanti nella cura di questa patologia è stato fatto con lo sviluppo di molecole di interferone modificate dall'aggiunta covalente di una molecola di glicole polietilene (Peg-IFN). Questi "interferoni pegilati" hanno infatti una emivita molto più lunga all'interno dell'organismo e questo risulta in una maggiore attività del farmaco. Con l'utilizzo di queste molecole modificate la risposta positiva nei pazienti è salita a circa il 54-56% (Feld J. e Hoofnagle J., 2005).

La necessità quindi di sviluppare nuove e più efficaci terapie antivirali, unita alle ancora limitate informazioni che si hanno sulla biologia molecolare del virus e sulla patogenesi, spingono verso un accurato studio del virus e della patologia ad esso associata.

# 1. Introduzione

## 1.1 Un po' di storia

Intorno al 1970 venne dimostrato che solo il 25% dei casi di epatite associata a trasfusione (TAH) erano causati dal virus dell'epatite B (HBV) e che nessuno era dovuto al virus dell'epatite A (HAV), entrambi già noti fin dagli anni '60. Di conseguenza, circa il 75% dei casi di epatite associati a trasfusione vennero classificati come epatite non-A non-B (NANBH).

Solo nel 1978 si riuscì a trasmettere NANBH attraverso il sangue da pazienti con epatite associata a trasfusione a scimpanzé. Questo risultato dimostrò chiaramente che la malattia era causata da un agente trasmissibile (Alter H.J. *et al.*, 1978; Tabor E. *et al.*, 1978).

Negli anni '80 vennero ottenute ulteriori informazioni su NANBH; si arrivò a determinare la taglia del virus (He L.F. *et al.*, 1987) e venne dimostrato che si trattava di un virus fornito di un rivestimento lipidico (Feinstone S.M. *et al.*, 1983). L'identificazione dell'agente eziologico dell'epatite non-A non-B ed il suo successivo clonaggio arrivarono però solo nel 1989 (Choo Q.L. *et al.*, 1989). Choo Q.L. e collaboratori costruirono una libreria di DNA complementare (cDNA) partendo dal plasma di uno scimpanzé infettato e dallo "screening" di questa libreria con il siero di un paziente con NANBH isolarono un clone di cDNA derivato da una molecola di RNA di circa mille nucleotidi. Nel giro di un anno fu sequenziato l'intero genoma virale e l'agente responsabile dell'NANBH fu rinominato virus dell'epatite C (HCV) (Tab.1).

Tenendo conto dell'affinità strutturale e molecolare di HCV con i virus della famiglia dei *Flaviviridae*, il "nuovo" virus fu classificato in un genere a parte, Hepacivirus, all'interno di questa famiglia (Alter H.J., 1999).

In base ad analisi di sequenza, il virus dell'epatite C viene classificato in almeno sei genotipi diversi all'interno dei quali esistono molti sottotipi (Marrone A. e Sallie R., 1996; Okamoto H. *et al.*, 1992). Una delle caratteristiche più importanti di HCV è infatti la rapida generazione di mutanti. Anche nei pazienti infettati dal virus non esiste una singola specie virale, ma un insieme di varianti che nel complesso vengono definite come "quasispecie". La produzione di un numero di mutanti così elevato è principalmente dovuta all'alto tasso di errore della polimerasi virale, che si aggira intorno a  $10^{-4}$ .

<p><b>1960:</b> 1967; classificazione di due diversi tipi di epatite.</p> <p><b>1970:</b> 1973; identificazione epatite A. 1974; scoperta che circa il 75% delle epatiti associate a trasfusione sono causate da NANBH. 1978; trasmissione di NANBH ad uno scimpanzé.</p> <p><b>1980:</b> 1983; scoperta che il virus NANBH possiede un rivestimento lipidico. 1987; scoperta che il virus NANBH ha un diametro di circa 30-60 nm. 1989; HCV viene clonato, sequenziato e classificato. 1989; inizio di controlli accurati sul sangue destinato alle trasfusioni; saggi anti-HCV.</p>
---

Tabella 1: Date di interesse storico nella scoperta del virus dell'epatite C (HCV)

## 1.2 Organizzazione del genoma virale

Il genoma virale è costituito da una molecola di RNA a singolo filamento con polarità positiva di circa 9.6Kb, contenuto in un capsidico proteico circondato da un rivestimento lipidico.

Sul genoma virale si possono distinguere tre diverse regioni;

- una regione al 5' non tradotta (5'NTR) di 340 nucleotidi, che contiene il sito di legame per i ribosomi (IRES);
- una regione centrale, che codifica per una singola poliproteina di circa 3000 aminoacidi (aa);
- una regione al 3' non tradotta (3'NTR);

(Bartenschlager R. e Lohmann V., 2001) (Fig.1.1).

La regione non tradotta al 5' è necessaria per la replicazione e per la traduzione dell'RNA virale (Friebe P. *et al.*, 2001; Wang C. *et al.*, 1993).

Per la replicazione sono sufficienti i 125 nucleotidi (nt) terminali della sequenza, ma l'efficienza aumenta se la 5' NTR è completa.

La traduzione dipende dall'IRES interno alla regione (40-340 nt), che permette il legame diretto dei ribosomi in prossimità del codone di inizio della regione centrale codificante (ORF; "*Open Reading Frame*"). I primi 40 nt non sono necessari per la funzione dell'IRES.

La traduzione virale richiede quindi diversi fattori cellulari di inizio traduzione (eIF2 e eIF3) per formare il complesso ribosomiale 48s (Hong J. *et al.*, 2004).

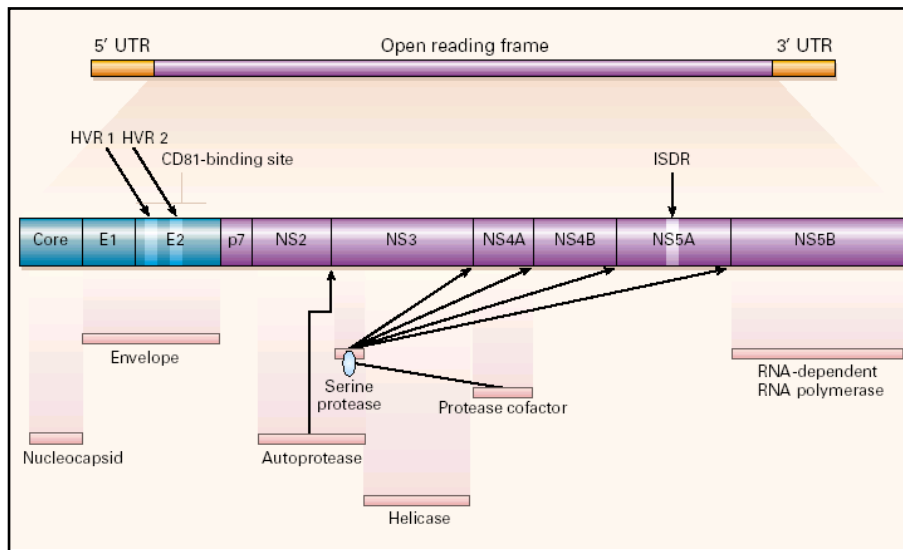


Figura 1.1:

Genoma di HCV e poliproteina prodotta dalla sua traduzione

Il genoma virale è costituito da una molecola di RNA di 9.6Kb divisa come descritto nel testo. La poliproteina tradotta viene successivamente maturata da proteasi virali e cellulari in un minimo di 10 prodotti. La regione amino-terminale della proteina codifica per le proteine strutturali core, E1 ed E2; mentre la regione carbossi-terminale dà vita alle proteine non strutturali (NS2-5B).

HVR1 e HVR2 (*“Hypervariable Region 1 e 2”*) indicano regioni all’interno di E2 che mostrano un’elevata variabilità; viene anche indicato il sito di legame per CD81, l’eventuale recettore o corecettore di HCV.

ISDR (*“IFN Sensitivity Determining Region”*), interna ad NS5A, rappresenta la regione che determina la sensibilità all’IFN.

(Lauer G.M. *et al.*, 2001)

Una predizione al computer della struttura dell’IRES rivela 4 distinti domini a RNA. Il primo ed il quarto dominio non dovrebbero essere essenziali per la funzione, il terzo dominio sarebbe quello centrale ed il secondo ne aumenterebbe l’efficienza.

La regione non tradotta al 3’ è invece necessaria unicamente per la replicazione. E’ costituita da una sequenza tripartita divisa in:

- 1) una regione variabile di 40 nt;
- 2) un poli (U/UC) di lunghezza variabile;
- 3) una regione altamente conservata di 98 nt

(Friebe P. e Bartenschlager R., 2002).

La regione variabile di 40 nucleotidi segue il codone di stop e non è essenziale per la replicazione. Mutanti deleti di questa regione replicano comunque, anche se con un'efficienza ridotta.

Il poli (U/UC) può avere lunghezza variabile. La lunghezza minima richiesta per la replicazione è di 26 residui. Se questa regione viene sostituita con altri omopolimeri la replicazione virale si arresta.

La regione altamente conservata di 98 nucleotidi è indispensabile per la replicazione di HCV *in vivo*. Infatti qualunque mutazione in questa regione fa sì che non avvenga la replicazione virale (Friebe P. e Bartenschlager R., 2002; Kolykhalov A. *et al.*, 1996; Kolykhalov A. *et al.*, 2000).

### 1.3 Proteine virali

La regione centrale codifica per una singola poliproteina di circa 3000 aminoacidi (aa) che viene successivamente maturata da proteasi cellulari e virali in un minimo di dieci prodotti, alcuni dei quali possono subire modificazioni a livello traduzionale o post-traduzionale (Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000 e referenze all'interno).

Recentemente però è stato osservato che tramite lo slittamento della cornice di lettura durante la traduzione, è possibile il rilascio di un undicesimo peptide di 17 KDa chiamato F (Xu Z. *et al.*, 2001). La sua sequenza codificante si sovrapporrebbe a quella della proteina core. L'inizio di traduzione della nuova proteina dovrebbe essere all'interno di uno dei primi codoni della sequenza di core. Lo slittamento della cornice di lettura è probabilmente causato da una sequenza ricca in adenine (A). Sebbene la proteina F sia stata identificata all'interno del genotipo 1a di HCV, si ritiene che la sua espressione non sia limitata a tale genotipo, ma che la sua lunghezza possa essere invece specifica del genotipo stesso. La funzione di questa proteina non è chiara, potrebbe giocare un ruolo nel ciclo vitale di HCV, ma non risulta comunque essenziale per la replicazione.

La porzione amino-terminale della poliproteina codifica per le proteine strutturali del virus; core (C), E1 e E2, che costituiscono la particella virale (Fig.1.1). La proteina core è il maggior costituente del nucleocapside (Yasui K. *et al.*, 1998), mentre E1 ed E2, proteine altamente glicosilate



rispettivamente di 21 KDa e 40 KDa, costituiscono il rivestimento del virus. Core è una proteina basica di circa 20 KDa. E' la prima proteina tradotta dall'RNA virale e rilasciata da proteasi cellulari non ancora identificate. Non si sa ancora con certezza se l'estremità 5' della sequenza che codifica per la proteina faccia o meno parte dell'IRES.

Esistono diversi prodotti del gene che codifica per la proteina del nucleocapside (Lo S-Y. *et al.*, 1995). I maggiori sono p21 (191 aa) e p19 (173 aa), localizzati entrambi sul reticolo endoplasmatico; in minor quantità si trova p16 (151 aa), localizzato essenzialmente nel nucleo. Si è ipotizzato che i diversi prodotti, tenuto conto anche delle diverse localizzazioni, possano avere diverse funzioni.

E1 ed E2 sono entrambe rilasciate dalla poliproteina grazie a proteasi cellulari non ancora identificate, come la proteina core. Essendo proteine altamente glicosilate è possibile che siano ritenute sulle membrane del reticolo endoplasmatico, come descritto da più lavori (Duvet S. *et al.*, 1998; Cocquette L. *et al.*, 1999).

Inoltre, Pavio N. e collaboratori hanno descritto una forma non glicosilata della proteina E2 (E2-p38), localizzata principalmente nel citoplasma, contrariamente alla forma glicosilata, significativamente meno stabile e degradata attraverso la via del proteasoma (Pavio N. *et al.*, 2002). Essendo già nota l'interazione fra E2 e la protein chinasi R (PKR) (Taylor D. *et al.*, 1999), ed essendo stata dimostrata l'interazione della chinasi anche con la forma citoplasmatica p38, si ritiene che sia proprio questa variante di E2 ad interagire con la PKR nel compartimento citoplasmatico (Pavio N. *et al.*, 2002).

La porzione carbossi-terminale della poliproteina invece codifica per le proteine non strutturali di HCV (proteine NS) 2 – 5B, richieste per la replicazione del virus (Fig.1.1).

NS2, circa 24 KDa, ed il dominio amino-terminale di NS3, costituiscono una delle due proteasi virali; NS3, circa 69 KDa, è l'altra proteasi virale, ma ha anche funzione di elicasi ed attività ATPasica (Rosenberg S., 2001).

NS4A, una piccola proteina che pesa meno di 6 KDa, funziona come cofattore per NS3, sia per la sua attività proteasica che elicasica; NS4B e NS5A hanno ancora funzione non nota.

NS4B è una proteina altamente idrofobica di circa 28 KDa rilasciata dall'ultimo evento di maturazione della poliproteina. Essendo NS4B una proteina integrale di membrana si ipotizza che possa avere un ruolo diretto nella riorganizzazione delle membrane cellulari per formare strutture utilizzate da HCV per replicare (Egger D. *et al.*, 2002).

NS5A è una fosfoproteina di circa 50 KDa. E' stato ampiamente dimostrato che per la sua iperfosforilazione, dalla forma fosforilata p56 a quella iperfosforilata p58, è necessaria l'espressione *in cis* di altre proteine non strutturali del virus quali; NS2, NS3, NS4A ed NS4B (Tanji Y. *et al.*, 1995b; Asabe S. *et al.*, 1997; Liu Q. *et al.*, 1999; Kock J.O. *et al.*, 1999).

La fosforilazione di NS5A sembra avvenire quando la proteina è parte di una poliproteina NS3-5A, e non quando è invece espressa da sola (Kock J.O. *et al.*, 1999). Questa osservazione avvalorerebbe l'ipotesi di un ruolo importante nel processo per le altre proteine virali non strutturali.

Ulteriori lavori parlano però di una fosforilazione seguente la maturazione della poliproteina e osservano che NS5A viene fosforilata a livello basale anche in assenza delle altre proteine virali (Tanji Y. *et al.*, 1995b). Questo comporterebbe la capacità della proteina di autofosforilarsi o di essere fosforilata da proteine cellulari, come sostengono altri dati (Reed K.E. *et al.*, 1997).

La fosforilazione di NS5A avviene inizialmente a livello di alcune serine (Ser), così come l'iperfosforilazione (Ser2197-Ser2201-Ser2204), anche se diverse da quelle già fosforilate in p56. Sebbene la funzione di questa proteina sia ancora sconosciuta, diversi studi hanno identificato molte interazioni fra NS5A ed alcune proteine cellulari. La proteina virale è inoltre coinvolta nell'alterazione di diverse vie di trasduzione del segnale, compresa quella dell'IFN; anche se la maggior parte dei dati ottenuti rimangono ancora privi di significato.

Anche NS5A, così come NS4B, è descritto colocalizzare con l'RNA virale all'interno di strutture membranose presenti nel citoplasma, chiamate "*membranous web*". La replicazione virale sembra avvenire all'interno di frazioni di membrane resistenti ai detergenti note come "*lipid rafts*" (Egger D. *et al.*, 2002; Mottola *et al.*, 2002). La localizzazione sulle membrane della proteina non strutturale 5A sembra dovuta alla presenza nella sua regione N-terminale di un' $\alpha$ -elica anfipatica, necessaria e sufficiente per il legame alle membrane stesse (Brass V. *et al.*, 2002; Elazar M. *et al.*, 2003).

Quindi, sebbene su NS5A siano disponibili tante informazioni, poco o nulla si sa sulla sua effettiva funzione. Sicuramente interferisce con la risposta del virus all'IFN, come vedremo meglio in seguito, e molto probabilmente ha anche un ruolo importante nella patogenesi virale. Un lavoro di Giménez-Barcons M. e collaboratori (Giménez-Barcons M. *et al.*, 2001) mostra infatti come in pazienti affetti da epatite C che abbiano sviluppato epatocarcinoma vi sia un numero di aminoacidi mutati in NS5A,

circa il 60%, molto più elevato che nei pazienti HCV positivi che non presentano neoplasie epatiche (circa il 6%).

L'ipotesi che NS5A sia importante per il virus e per l'infezione è anche avvalorata dall'osservazione che molti "repliconi" mutati, subgenomi selezionabili generati dal genoma virale modificato che sembrano avere un'efficienza di replicazione di molto superiore a quella di HCV (vedi Sistemi modello), hanno accumulato mutazioni nella regione che codifica per questa proteina virale (Blight K.J. *et al.*, 2000).

NS5B, una proteina di circa 65 KDa, è l'RNA polimerasi RNA dipendente codificata dal virus.

Oltre queste proteine ne esiste un'altra di circa 7 KDa, denominata p7, codificata dalla regione fra E2 e NS2, con funzione ancora sconosciuta. E' una proteina altamente idrofobica che attraversa la membrana per due volte e sembra localizzarsi sul reticolo endoplasmatico, come le proteine del rivestimento (Carrere-Kremer S. *et al.*, 2002).

#### 1.4 Ciclo vitale del virus

HCV è in grado di replicare principalmente in cellule epatiche, ma la replicazione virale può avvenire anche in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), se pur con minor efficienza (Cribier B. *et al.*, 1995; Fournier C. *et al.*, 1998).

Non avendo avuto a disposizione fino a pochi anni fa' un efficiente modello *in vitro* per lo studio della replicazione virale e non essendo disponibile un modello animale facilmente gestibile per lo studio *in vivo*, le attuali conoscenze dei meccanismi molecolari della replicazione di HCV si basano principalmente sulle analogie con i virus correlati.

Un probabile schema delle diverse fasi dell'infezione è il seguente (Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000):

- 1) adesione e penetrazione della particella virale all'interno della cellula ospite, seguita dal rilascio del genoma virale nel citoplasma;
- 2) traduzione della molecola di RNA virale a polarità positiva e maturazione della poliproteina tradotta;
- 3) formazione del complesso replicativo associato alle membrane intracellulari;
- 4) produzione di una nuova progenie virale di RNA a polarità positiva attraverso un intermedio a polarità negativa;

- 5) impacchettamento dei nuovi genomi in nuove particelle virali;
- 6) rilascio della progenie virale (Fig.1.2).

#### 1.4.1 Adesione ed ingresso

La prima fase del ciclo vitale del virus è quindi l'attacco della particella virale alla cellula ospite.

Questa fase richiede un'interazione specifica fra un recettore sulla superficie della cellula bersaglio ed una proteina esposta sulla particella virale.

Presumibilmente i componenti chiave per l'attacco e la penetrazione di HCV sono le due proteine di rivestimento E1 ed E2.

Su E1 sono per ora disponibili poche informazioni; si ipotizza un suo ruolo nella fusione delle membrane durante l'ingresso del virus nella cellula ospite (Flint M. *et al.*, 1999b), dal momento che E2 da solo non è capace di mediare la fusione cellulare.

E' stata inoltre descritta una sua interazione sia con core (Lo S-Y. *et al.*, 1996) che con NS5A (Flajolet M. *et al.*, 2000). Core ed E1 interagirebbero attraverso le sequenze carbossi-terminali. Si ipotizza che l'interazione possa servire per reclutare core sul reticolo endoplasmatico dove E1 viene ritenuta in seguito alla sua maturazione. L'interazione con la proteina a funzione non nota NS5A rimane ancora da chiarire.

Su E2 si possiedono invece più informazioni; diversi studi hanno identificato CD81 come recettore per il virus dell'epatite C, dimostrando una sua stretta interazione proprio con E2 (Pileri P. *et al.*, 1998; Flint M. *et al.*, 1999a; Flint M. *et al.*, 1999b).

CD81 (TAPA-1) è un membro della famiglia delle tetraspanine, proteine che attraversano quattro volte la membrana; è costituito da due domini extracellulari (EC) chiamati EC1 ed EC2. E' espressa sulla superficie di diverse cellule ed è coinvolta in diversi processi biologici. Influenza l'adesione, la morfologia, l'attivazione, la proliferazione ed il differenziamento delle cellule B, T e di altri tipi cellulari. E' anche coinvolta nella motilità e nella formazione di metastasi, nell'attivazione cellulare e nella trasduzione del segnale. CD81 si associa fisicamente e funzionalmente con diverse integrine (Levy S. *et al.*, 1998).

E' stato ipotizzato che il legame di E2 a CD81 possa dipendere principalmente dal dominio EC2 e visto che la denaturazione a caldo

(100°C) distrugge l'interazione, il legame potrebbe essere dipendente dallo stato conformazionale delle due molecole. Un'ipotesi è che E2 possa cambiare conformazione nel legare CD81 e che questa modificazione conformazionale in qualche modo possa facilitare l'ingresso del virus nella cellula ospite.

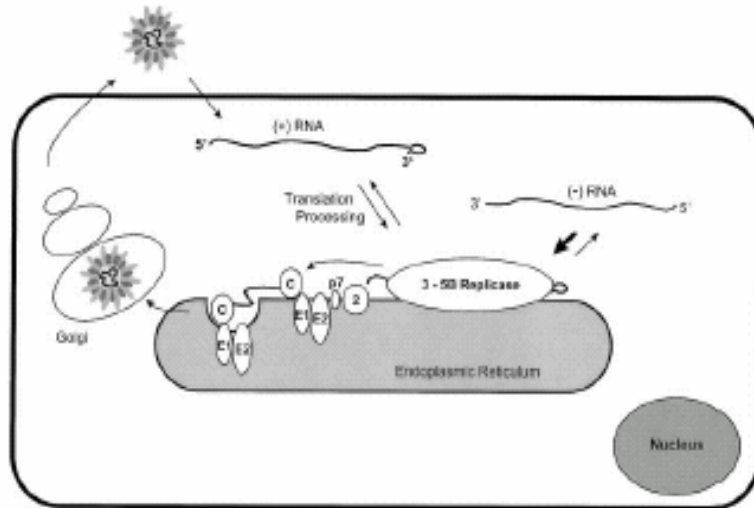


Figura 1.2:

Ipotetico modello di replicazione del virus dell'epatite C

Dopo essere entrato nella cellula ospite, il virus libera il proprio genoma (RNA +) nel citoplasma. La molecola di RNA viene quindi tradotta dando vita alla poliproteina. La poliproteina successivamente viene maturata da proteasi virali e cellulari producendo le proteine virali che rimangono associate con le membrane del reticolo endoplasmatico.

La replicazione avviene attraverso un intermedio RNA a polarità negativa (RNA -). Molto probabilmente la replicasi virale (NS5B) si associa alle altre proteine non strutturali formando un complesso (NS3-5B) proprio sul reticolo endoplasmatico. L'assemblaggio delle nuove particelle virali avviene dall'interazione delle molecole di RNA neosintetizzate con le proteine strutturali (Core "C", E1 ed E2) che le racchiudono dentro il capsido. Il rivestimento lipidico viene acquisito dalla gemmazione attraverso la membrana del reticolo. Il rilascio avviene in seguito al passaggio attraverso l'apparato del Golgi.

(Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000)

Flint M. e collaboratori hanno inoltre dimostrato che E2 lega CD81 umano e di scimpanzé, ma non quello di ratto, e che il legame avviene solo con CD81 e non con altri membri della famiglia delle tetraspanine (Flint M.

*et al.*, 1999a). Queste osservazioni potrebbero avvalorare l'ipotesi che CD81 sia il recettore specifico di HCV, poiché il virus infetta principalmente l'uomo e lo scimpanzé. Un problema fondamentale però, che in parte si contrappone a questa ipotesi, è rappresentato dal fatto che CD81 è espresso, come ricordato in precedenza, in molti tipi diversi di cellule, mentre HCV ha al contrario un elevato epatotropismo.

Questi problemi hanno portato negli ultimi anni a ricercare molecole alternative espresse sulla superficie cellulare capaci di interagire con E2, e che possano spiegare anche un legame di HCV indipendente da CD81. Recentemente è stata descritta l'interazione di E2 con SRBI umano in cellule epatiche HepG2 (Scarselli E. *et al.*, 2002). SRBI, un recettore "scavenger" di classe B tipo I, appartiene alla superfamiglia CD36, che include proteine espresse sulla superficie cellulare che legano lipoproteine chimicamente modificate e molti altri tipi di ligando. Potrebbe anche essere coinvolta nei processi di detossificazione della cellula. L'ipotesi che possa essere SRBI il recettore cercato è inoltre supportata dall'osservazione che E2 non lega SRBI di topo e che questo recettore è altamente espresso negli epatociti, cellule bersaglio primarie del virus. In aggiunta è stata comunque dimostrata la capacità di SRBI di internalizzare i suoi ligandi naturali, lipoproteine ad alta densità (HDL) (Scarselli E. *et al.*, 2002).

Oltre al legame di E2 con CD81 o con SRBI, è stato anche descritto il legame di HCV, così come di altri membri della famiglia dei *Flaviviridae*, con recettori lipoproteici a bassa densità (LDL receptors) (Agnello V. *et al.*, 1999). E' stata osservata infatti una diretta correlazione fra il livello delle proteine recettoriali LDL espresse sulla superficie cellulare e il numero di cellule positive all'infezione di HCV trovate.

Non è stato comunque dimostrato in nessun caso se il legame di E2 con CD81 o con SRBI o il legame di HCV a recettori LDL portino ad infezioni produttive.

#### 1.4.2 Traduzione e maturazione della poliproteina

Una volta all'interno della cellula ospite il genoma virale viene direttamente tradotto, dal momento che HCV è costituito da un filamento di RNA a polarità positiva che può funzionare come RNA messaggero (mRNA) (Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000).

Il genoma virale non possiede però un "cappuccio" ("CAP", guanina metilata) per dirigere la traduzione; questa non segue quindi un meccanismo

CAP-dipendente, ma è mediata da una sequenza interna che permette l'ingresso dei ribosomi (IRES). L'IRES consente il legame diretto dei ribosomi in prossimità del codone d'inizio della regione codificante. Questa sequenza si trova all'inizio dell'RNA virale fra i nucleotidi 40 e 355 e si ritiene che formi quattro domini strutturali importanti per la sua funzione. Sequenze a monte di AUG sono inoltre indispensabili per la funzionalità dell'IRES (Wang C. *et al.*, 1993; Friebe P. *et al.*, 2001).

L'IRES lega in modo specifico la subunità 40s del ribosoma e richiede i fattori di inizio eIF2 ed eIF3 per formare il complesso ribosomiale 48s, ma non il complesso eIF4 (eIF4G- eIF4E- eIF4GB- eIF4A) (Spahn C. *et al.*, 2001; Hong Ji *et al.*, 2004). L'attività dell'IRES di HCV è influenzata da diversi fattori; primo fra tutti la regione 3' terminale del genoma virale (Ito T. *et al.*, 1998). Questa regione, denominata "X-tail", sembra aumentare l'efficienza di traduzione IRES-dipendente, con un meccanismo che rimane ancora da chiarire. Inoltre molti fattori cellulari sembrano legare l'IRES di HCV e, in diversi casi, stimolarne l'attività. Per esempio, diverse ribonucleoproteine nucleari eterogenee (hnRNP) quali la proteina legante tratti poli-pirimidinici (PTB o hnRNP I) o la hnRNP L, sono mostrate interagire con l'IRES virale (Kaminski A. *et al.*, 1995; Hahn B. *et al.*, 1998; Ali N. e Siddiqui A., 1995).

La richiesta da parte dell'IRES di fattori cellulari potrebbe anche spiegare la dipendenza di HCV dal ciclo cellulare della cellula ospite (Pietschmann T., 2001).

Inoltre NS4B, così come NS4A, inibisce la sintesi proteica cellulare e sopprime la traduzione di HCV dipendente dall'IRES (Kato J. *et al.*, 2002). Partendo dall'IRES quindi, viene sintetizzata una poliproteina che è poi traslocata al reticolo endoplasmatico rugoso e maturata da proteasi cellulari e virali (Grakoui A. *et al.*, 1993a; Hijikata M. *et al.*, 1991). La porzione carbossi-terminale della poliproteina viene attaccata da proteasi cellulari non ancora identificate. Il taglio proteolitico da parte di questi enzimi rilascia le proteine strutturali del virus. Il rilascio delle proteine non strutturali avviene invece ad opera di proteasi virali (Hijikata M. *et al.*, 1993a, Hijikata M. *et al.*, 1993b, Grakoui A. *et al.*, 1993a, 1993b).

Dalla maturazione della poliproteina vengono rilasciati almeno dieci prodotti, due dei quali costituiscono appunto le due proteasi del virus; NS2/NS3 e NS3.

Il ruolo di NS2/(amino-terminale)NS3 sembra limitato al taglio autoproteolitico *in cis* della giunzione fra NS2 e NS3 (Reed K. *et al.*, 1995). Non è ancora chiara la natura di questa proteasi virale. Poiché l'attività viene

inibita da chelanti, quali l'EDTA, è stato suggerito che possa essere una metalloproteasi (Hijikata M. *et al.*, 1993a). D'altra parte, altre prove suggeriscono che NS2/NS3 sia una cistein-proteasi (Gorbalenya A. e Snijder E.J., 1998).

Nell'ambito della replicazione virale di HCV NS2 non sembra invece essere indispensabile (Lohmann V. *et al.*, 1999), anche se viene descritta una sua partecipazione nella fosforilazione di NS5A (Liu Q. *et al.*, 1999). Inoltre è stata osservata l'interazione di NS2 con NS4A (Flajolet M. *et al.*, 2000), ma il ruolo di questa associazione rimane ancora da chiarire.

NS3 funziona da proteasi insieme ad NS2, come già descritto, ma la sua porzione amino-terminale (circa 180 aa) svolge anche da sola la funzione di serinproteasi (Failla C. *et al.*, 1994; Failla C. *et al.*, 1995; Tomei L. *et al.*, 1996). L'attività proteasica di NS3 permette il rilascio di tutte le proteine non strutturali a valle della stessa (Manabe S. *et al.*, 1994; Tomei L. *et al.*, 1993), seguendo l'ordine non obbligatorio, ma molto comune: NS3/4A → NS5A/B → NS4A/B → NS4B/5A (Bartenschlager R. *et al.*, 1994). E' stata osservata anche la richiesta di fattori cellulari dell'ospite necessari per la maturazione della poliproteina virale. Un esempio è rappresentato da una "chaperonina cellulare" (HSP90) necessaria per l'attività di NS2/NS3 (Waxman L. *et al.*, 2001). L'associazione fisica fra HSP90 e la proteasi virale potrebbe essere finalizzata al raggiungimento del ripiegamento ottimale dell'enzima o al posizionamento del sito di taglio rispetto all'enzima stesso.

Sebbene NS3 possa da sola svolgere la funzione di proteasi virale, diversi studi indicano che NS4A ne aumenta l'efficienza e la stabilità (Tanji Y. *et al.*, 1995a; Wolk B. *et al.*, 2000; Lin C. *et al.*, 1997). Non si conosce tuttavia il meccanismo grazie al quale NS4A svolge la funzione di cofattore, ma si ipotizza che possa avere diversi ruoli; come facilitare la localizzazione di NS3 ancorandola al reticolo endoplasmatico, stabilizzare NS3 o permetterne il giusto ripiegamento (Bartenschlager R. *et al.*, 1995; Wolk B. *et al.*, 2000). Si pensa che NS4A possa funzionare come regolatore allosterico, facilitando e stabilizzando una giusta conformazione dell'enzima virale.

NS4A svolge la funzione di cofattore anche per l'attività elicastica di NS3, aumentandone l'efficienza (Howe A.J. *et al.*, 1999).

La porzione carbossi-terminale di NS3 (circa 500 aa) codifica infatti per l'attività elicastica e ATPasica della proteina (Tai C.L. *et al.*, 1996; Kim D.W. *et al.*, 1995).

Per NS4A sono state osservate diverse interazioni con le altre proteine non strutturali, quali NS2, NS4B e NS5A (Lin C. *et al.*, 1997; Flajolet M. *et*



*al.*, 2000). Molto probabilmente la formazione del complesso NS4B5A con NS4A è richiesta per la maturazione di 4B/5A.

La maturazione della poliproteina porta al rilascio anche di altre proteine non strutturali, quali NS4B, NS5A ed NS5B. Mentre di NS5B è nota la funzione, come vedremo meglio in seguito, alle altre due non è stato ancora attribuito un ruolo nel ciclo vitale di HCV. Si sa però che NS4B è un peptide altamente idrofobico che si localizza sul reticolo endoplasmatico insieme ad altre proteine virali (Hugle T. *et al.*, 2001). L'associazione con le membrane del reticolo avviene contemporaneamente alla traduzione (Fig.1.3).

Alcuni studi parlano genericamente di membrane resistenti ai detergenti (Shi S.T. *et al.*, 2003), altri di *lipid rafts*, proponendo modelli nei quali sarebbero le proteine cellulari VAP-33, che interagiscono con le proteine virali NS4B (Tu H. *et al.*, 1999), NS5A ed NS5B (Gao L. *et al.*, 2004; Hamamoto I. *et al.*, 2005) a permettere il suddetto legame (Aizaki H. *et al.*, 2004). Sembra comunque ormai chiaro che il ciclo vitale del virus dell'epatite C avviene sì nel citoplasma cellulare, ma in associazione con membrane.

Una volta prodotte tutte le proteine virali, HCV può replicarsi.

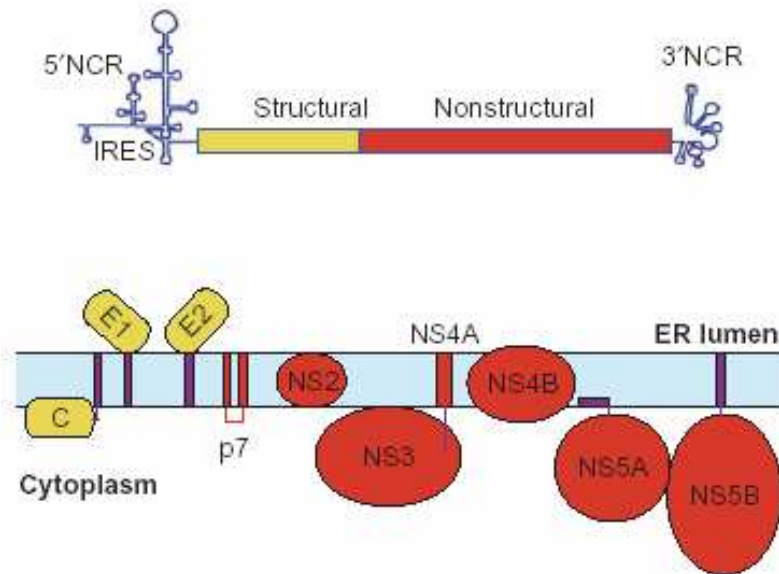
#### 1.4.3 Replicazione virale

La replicazione del genoma virale avviene nel citoplasma e procede attraverso un intermedio a RNA a polarità negativa che funziona come stampo per produrre nuove molecole di RNA a polarità positiva.

L'RNA a polarità positiva può poi funzionare ulteriormente come mRNA ed essere tradotto dando vita ad altre proteine virali, può venir usato come substrato per la polimerasi virale ed essere replicato o, nella fase tardiva dell'infezione, quando si è raggiunto un numero sufficiente di proteine strutturali, essere incapsidato in nuove particelle virali e rilasciato (Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000).

NS5B è il componente chiave della replicazione virale, è stata infatti scoperta essere l'RNA polimerasi RNA dipendente codificata dal virus.

L'enzima ha la tipica struttura “*dita-palmo-pollice*” (“*fingers-palm-thumb*”) delle polimerasi (Lesburg C.A. *et al.*, 1999).



*Figura 1.3:*  
Rappresentazione schematica del genoma virale e dell'associazione delle proteine, strutturali e non, alle membrane del reticolo endoplasmatico  
 (Tardif K.D. *et al.*, 2005)

I singoli eventi che determinano la replicazione virale sono ancora quasi del tutto sconosciuti, ma è ovvio ritenere che NS5B giochi un ruolo principale.

L'enzima può iniziare *in vitro* la sintesi “*de novo*” dell'RNA virale, sembra quindi necessario e sufficiente per la replicazione virale; mostra inoltre una spiccata preferenza per il GTP rispetto all'ATP come nucleotide iniziale (Zhong W. *et al.*, 2000). E' poi stata dimostrata un'interazione specifica fra NS5B e il 3' dell'RNA virale, che risulta necessario per la replicazione del virus. NS5B può legare per di più un templatato a DNA oltre che a RNA, sebbene con un'efficienza molto ridotta (Cheng J.C. *et al.*, 1999).

Anche se *in vitro* NS5B non necessita per svolgere la sua funzione di altri fattori virali o cellulari (Lohmann V. *et al.*, 1997), è ormai opinione comune che l'enzima *in vivo* formi insieme alle altre proteine virali ed a proteine

cellulari un complesso replicativo associato con le membrane del reticolo endoplasmatico (Lin C. *et al.*, 1997; Shmidt-Mende J. *et al.*, 2001). A sostegno di questa ipotesi sono state osservate diverse interazioni fra la polimerasi virale e le altre proteine di HCV.

Molti studi indicano che la maggior parte, se non tutte le proteine virali formano con NS5B un complesso di replicazione associato con le membrane intracellulari, come abbiamo visto in precedenza, e che questo complesso, molto probabilmente, contenga anche proteine cellulari (Ishido S. *et al.*, 1998; Lohmann V. *et al.*, 1997; Shmidt-Mende J. *et al.*, 2001; Piccininni S. *et al.*, 2002).

Sono state infatti descritte diverse interazioni fra le proteine virali, soprattutto fra le proteine non strutturali, quali:

NS2 – 4A (Flajolet M. *et al.*, 2000),  
NS3 – 4A (Wolk B. *et al.*, 2000 ; Ishido S. *et al.*, 1998 ),  
NS3 – 4B (Piccininni S. *et al.*, 2002),  
NS3 – 5B (Ishido S. *et al.*, 1998),  
NS4A – 4B – 5A (Lin C. *et al.*, 1997),  
NS5A – 5B (Shirota Y. *et al.*, 2002).

Questi sono solo alcuni esempi delle interazioni osservate, altre ancora infatti sono state descritte, anche fra proteine strutturali e non strutturali, quali per esempio la proteina core (Flajolet M. *et al.*, 2000; Uchida M. *et al.*, 2002). Si è inoltre osservato come NS3 sia un componente essenziale del complesso replicativo (Kolykhalov A. *et al.*, 2000), importante per esempio nel modulare il riconoscimento da parte di NS5B del template (Piccininni S. *et al.*, 2002); che NS5A modula l'attività di NS5B (Shirota Y. *et al.*, 2002), e che NS4B funziona come regolatore negativo del complesso NS3/5B (Piccininni S. *et al.*, 2002). Inoltre in un recente studio condotto da Shimakami T. e collaboratori si è messo in evidenza come l'interazione fra NS5A ed NS5B, già descritta in precedenza, sia indispensabile per la replicazione virale; mutazioni che portano all'abolizione di questa interazione infatti sopprimono la replicazione di HCV (Shimakami T. *et al.*, 2004).

Infine bisogna ricordare che NS5B, come le RNA polimerasi in genere, ha un elevato tasso di errore, ed è sicuramente una delle cause primarie dell'enorme variabilità caratteristica del virus dell'epatite C (Okamoto H. *et al.*, 1992; Marrone A. e Sallie R., 1996).

Oltre ad NS5B quindi, anche altre proteine non strutturali del virus sono importanti per il processo di replicazione.

La porzione carbossi-terminale di NS3 (circa 500 aa) codifica inoltre per l'attività elicastica e ATPasica della proteina (Tai C-L. *et al.*, 1996; Kim D.W. *et al.*, 1995). Possedendo attività elicastica NS3 risulta indispensabile non solo per la traduzione e maturazione della poliproteina virale, ma anche per la replicazione. L'elicasi virale può funzionare su diversi substrati quali;

singolo filamento 3' – 5',

singolo filamento 3' – 3',

ma non su un singolo filamento 5' o su un doppio filamento (Tai C.L. *et al.*, 1996). E' stato poi dimostrato che può legare e funzionare anche su un singolo filamento di DNA, ma non su un doppio filamento RNA/DNA (Gwack Y. *et al.*, 1996). Svolgerebbe la sua attività seguendo la direzione 3' → 5'. Per la sua attività elicastica necessita di ATP, Mg<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup> (Kim D.W. *et al.*, 1995). Non si sa bene se l'elicasi funzioni come monomero o oligomero. La maggioranza degli studi strutturali parlano di un enzima monomero (Rosenberg S., 2001), d'altra parte uno studio suggerisce al contrario che l'enzima sia un dimerico (Cho H.S. *et al.*, 1998).

L'importanza di NS3 nella replicazione virale è suggerita anche dall'interazione della proteina con la polimerasi NS5B (Ishido S. *et al.*, 1998); NS3 modula infatti, come già ricordato, il riconoscimento del template da parte della RdRp (Piccininni S. *et al.*, 2002).

L'associazione di NS4B con le membrane del reticolo endoplasmatico inoltre ha fatto ipotizzare che questa proteina, della quale ancora non è nota la funzione, faccia parte del complesso di replicazione virale e che possa proprio lei stessa essere responsabile della ritenzione del complesso sulle membrane cellulari. Tale ipotesi viene ulteriormente avvalorata dall'osservazione che solo il precursore NS4A/B, quando espresso in cellule, altera il trasporto cellulare dal reticolo al Golgi ed altera la funzione e la struttura dell'apparato secretorio dell'ospite (Fig.1.3) (Konan K.V. *et al.*, 2003).

In aggiunta alle proteine virali anche componenti cellulari sono probabilmente coinvolti nella sintesi del genoma virale. Candidati possibili sono le ribonucleoproteine nucleari eterogenee (hnRNP) I e C, che interagiscono in modo specifico con la regione 3' non-tradotta, che ricordiamo essere indispensabile per la replicazione virale (Chung R.T. e Kaplan L.M., 1999, Gontarek R. *et al.*, 1999). Un altro candidato è la gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi (GAPDH), che lega la sequenza poliU nella 3' NTR (Petrik J. *et al.*, 1999).

Come abbiamo già ricordato inoltre sia la porzione 5' terminale che la 3' terminale del genoma virale sono indispensabili per la replicazione.

Mutazioni in determinate regioni all'interno di queste sequenze diminuiscono l'efficienza di replicazione o ne determinano un blocco completo (Friebe P. *et al.*, 2002; Kolykhalov A. *et al.*, 2000).

La replicazione di HCV è quindi guidata dalla polimerasi virale che gioca un ruolo centrale, ma verosimilmente questa si associa a proteine virali e non nel formare un complesso macchinario di replicazione.

#### 1.4.4 Produzione e rilascio dei nuovi virioni

Con il proseguire della replicazione vengono prodotte un numero elevato di copie dell'RNA virale e dalla traduzione di queste anche una quantità sufficiente di proteine per poter formare i nuovi virioni. L'assemblaggio delle particelle virali di HCV non è mai stato studiato dettagliatamente. Un possibile approccio è stato la produzione di particelle virus-simili (VLPs) esprimendo le proteine strutturali in sistemi eterologhi; ma per HCV questa tecnica ha presentato diverse difficoltà (Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000).

Molto probabilmente la formazione delle particelle virali inizia con l'interazione della proteina core con l'RNA del virus (Shimoike T. *et al.*, 1999).

La proteina core ha varie funzioni, sia nel ciclo replicativo del virus sia come modulatore di processi cellulari all'interno della cellula ospite. Nel ciclo replicativo di HCV core sembra intervenire per permettere l'incapsidamento dei nuovi genomi legando l'RNA virale in 5' NTR e bloccandone la traduzione (Shimoike T. *et al.*, 1999). È stato dimostrato che core lega in maniera preferenziale la sequenza 5' del genoma di HCV. Questo legame non solo dovrebbe servire all'impacchettamento del genoma, ma sembra anche reprimere la traduzione IRES-dipendente, dal momento che non c'è più necessità di produrre altre proteine virali.

Non è noto che tipo di complesso formi la proteina con l'RNA virale, ma è stato osservato che sia *in vitro* che *in vivo* core interagisce con sé stessa attraverso la porzione amino-terminale, formando omodimeri (Matsumoto M. *et al.*, 1996). Queste interazioni potrebbero essere necessarie per l'assemblaggio e la formazione delle nuove particelle virali.

L'acquisizione del rivestimento lipidico potrebbe invece avvenire dal "budding" attraverso le membrane del reticolo endoplasmatico dove sono ritenute E1 ed E2 (Duvet S. *et al.*, 1998; Cocquette L. *et al.*, 1999).

Sembra inoltre interagire con la proteina E1 (Lo S.Y. *et al.*, 1996). L'interazione con E1, che avviene attraverso le sequenze carbossi-terminali, servirebbe, come già detto, per reclutare core sul reticolo endoplasmatico dove E1 viene ritenuta in seguito alla sua maturazione.

Sebbene per anni non sia stato possibile avere a disposizione un sistema per lo studio della formazione e del rilascio della progenie virale, come vedremo meglio in seguito nel 2005 si è messo appunto un sistema che supporta la replicazione del genoma completo di HCV *in vitro* permettendo la formazione di una progenie di particelle virali (Lindenbach B.D. *et al.*, 2005; Wakita T. *et al.*, 2005; Zhong J. *et al.*, 2005).

### 1.5 Sistemi modello per lo studio della replicazione virale

Come abbiamo già accennato, HCV si replica principalmente in epatociti e con minor efficienza e in minor misura nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) (Fournier C. *et al.*, 1998; Cribier B. *et al.*, 1995).

Lo studio della biologia cellulare del virus e della replicazione virale è stato, fino a pochi anni fa, è stato limitato dalla mancanza di un modello cellulare di replicazione del virus. Fino ad allora, l'unico modo per studiare il virus dell'epatite C era rappresentato da:

- virus correlati;
- modelli animali;
- modelli murini.

#### 1.5.1 Virus correlati

HCV appartiene alla famiglia dei *Flaviviridae* ed è strettamente correlato con i pestivirus, come il virus della diarrea bovina e con il virus dell'epatite G (Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000). Poche sono le identità di sequenza a livello del genoma fra questi virus e HCV, ma molte sono le somiglianze a livello organizzativo del genoma. Lo studio quindi di questi virus correlati potrebbe aiutare per esempio a chiarire come HCV si replichi all'interno della cellula ospite. Bisogna però tener presente che, a parte queste somiglianze, esistono comunque differenze sostanziali che non possono essere trascurate.

### 1.5.2 Modelli animali

Il solo animale capace di sostenere la replicazione del virus dell'epatite C ed essere quindi infettato è lo scimpanzé (Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000). Il vantaggio di utilizzare questo modello è chiaro; l'animale infatti è altamente simile geneticamente all'uomo (circa il 98.5%). Sullo scimpanzé sono stati condotti tutti gli studi sull'epatite A e B, poiché tutti e cinque i principali virus delle epatiti (A-B-C-D-E) sono in grado di infettarlo; ed anche i primi approcci e le prime scoperte su HCV sono state permesse dall'uso di questo animale. Un altro vantaggio che deriva dall'uso dello scimpanzé come modello animale per l'infezione da HCV deriva dal fatto che la progressione della malattia segue un decorso clinico molto simile a quello osservato nei pazienti. Sia l'uomo che lo scimpanzé infatti passano per una fase acuta della malattia, nella quale si osservano elevati livelli di aminotrasferasi nel siero. La fase acuta porta allo sviluppo di una risposta immune. Inoltre in entrambi l'infezione tende a persistere nel tempo e a cronicizzare provocando evidenti danni epatici. Uno scimpanzé infettato cronicamente inoltre, ha sviluppato epatocarcinoma, come avviene non di rado nell'uomo.

Questo modello però presenta anche diversi limiti. Il suo utilizzo e il suo mantenimento richiedono elevati costi e mezzi, inoltre ragioni etiche ne limitano l'uso (Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000; Grakoui A. *et al.*, 2001).

Altri mammiferi, quali per esempio la tupaia e la marmotta, sembrano permissivi all'infezione da HCV, ma vengono comunque poco utilizzati (Grakoui A. *et al.*, 2001).

### 1.5.3 Modelli murini

Per modelli murini si intende sia l'uso di topi transgenici, sia l'uso di topi immunosoppressi trapiantati con cellule di fegato umano infettato da HCV.

Poiché HCV non infetta il topo e non si replica in esso, questo non può rappresentare un modello di infezione da epatite C; ma d'altra parte rappresenta un modello utile perché possiede diversi geni omologhi a geni umani e soprattutto perché il suo genoma può venire agevolmente manipolato. Inoltre il suo utilizzo è sicuramente meno problematico rispetto a quello dei primati.

Sono stati sviluppati diversi modelli di topi transgenici per poter esaminare i potenziali effetti patogeni delle proteine virali, quali per esempio la proteina strutturale core (Moriya K. *et al.*, 1998), o le glicoproteine E1 ed E2 (Koike K. *et al.*, 1995) sugli epatociti. Alcuni di questi esperimenti hanno per esempio dimostrato che la proteina core induce epatocarcinoma se espressa in topi transgenici.

Un'ulteriore possibilità è rappresentata dal trapianto di cellule di fegato umano o di cellule mononucleate del sangue periferico infettate dal virus in topi immunocompromessi (Grakoui A. *et al.*, 2001). Anche se gli epatociti primari infettati e trapiantati in topo non sostengono in modo ottimale lo sviluppo e la replicazione di HCV, attraverso il trapianto xenogenico è possibile fare in modo che gli epatociti mantengano *in vivo* una serie di interazioni con le altre cellule del fegato e ricevano una serie di fattori di crescita che ne permettono lo svolgimento di tutte le principali funzioni; cosa che naturalmente risulta impossibile *in vitro*. La costruzione di un simile modello quindi, non è finalizzata tanto allo studio del decorso dell'infezione o della replicazione virale, ma principalmente al mantenimento delle funzioni caratteristiche degli epatociti. Questo permette di studiare la risposta dell'ospite al virus in un contesto fisiologico.

#### 1.5.4 Repliconi

L'utilizzo dei modelli sopra citati ha permesso di avanzare nella conoscenza del virus, dell'infezione e della patogenesi virale; ma il problema fondamentale continuava ad essere la mancanza di un sistema modello per lo studio *in vitro* della replicazione virale. HCV infatti si replica in colture cellulari con un'efficienza molto bassa. La replicazione virale, determinata tramite tecniche di RT-PCR per quantificare l'intermedio di replicazione con polarità negativa, risulta sempre estremamente bassa.

*In vitro* diverse linee cellulari epatiche e cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) vengono infettate dal virus, ma HCV all'interno delle cellule replica sempre molto lentamente e poco efficientemente. Nelle migliori condizioni possibili, la replicazione di HCV viene determinata intorno a  $10^4$  equivalenti genomici rilasciati da  $10^6$  cellule in coltura (Bartenschlager R e Lohmann V., 2000).

Questo problema ha costituito per diversi anni il maggior limite allo studio di HCV, ma è stato risolto dalla messa a punto di un sistema che permette la riproduzione degli eventi di replicazione virale *in vitro*



(Lohmann V. *et al.*, 1999). Questo sistema si basa sulla costruzione di subgenomi selezionabili, chiamati “repliconi”, generati dal genoma virale modificato, che sembrano avere un’efficienza di replicazione di molto superiore a quella di HCV.

Nel 1999 quindi, per aggirare molti dei problemi incontrati nel far replicare HCV in coltura, è stato sviluppato questo sistema di coltura cellulare alternativo basato sulla replicazione stabile di subgenomi selezionabili a RNA chiamati appunto repliconi (Lohmann V. *et al.*, 1999). Queste molecole sono derivate dal genoma virale del virus dell’epatite C di genotipo 1b, ottenuto dal fegato di un paziente cronico sottoposto a trapianto. Il genoma ha subito poi le seguenti modificazioni:

- delezione della regione che codifica per le proteine strutturali da core a p7 e spesso anche per NS2, non indispensabile per la replicazione di HCV;
- inserzione di un gene che codifica per la neomicina fosfotrasferasi (Neo) che conferisce alla cellula resistenza contro l’antibiotico G418;
- inserzione dell’IRES del virus dell’encefalomiocardite (EMCV) fra il gene Neo e la regione che codifica per le proteine virali non strutturali (Fig.1.4).

Il replicone risulta quindi bicistronico, poiché la traduzione del primo cistron (neo) è diretta dall’IRES di HCV, mentre quella del secondo cistron (NS(2)3 – 5B) dall’IRES di EMCV. Andando a trasfettare queste molecole in cellule di epatoma umano Huh7, e selezionando con G418, si ottenevano però solo un basso numero di colonie, che contenevano, come si vide da successive analisi, RNA di HCV capaci di replicazione autonoma. La presenza dei repliconi poteva essere individuata anche per Northern-blot e le proteine virali potevano essere trovate esclusivamente nel citoplasma, in stretta associazione con le membrane del reticolo endoplasmatico, che venne quindi ipotizzato essere il sito di replicazione dell’RNA virale, come avveniva per molti virus a RNA a polarità positiva (Lohmann V. *et al.*, 1999).

Nelle linee cellulari che supportano la replicazione del replicone non sono stati osservati segni di citopatogenicità legati appunto alla replicazione di queste molecole (Pietshmann T. *et al.*, 2001). Le cellule continuano a crescere senza evidenti alterazioni a livello cellulare e morfologico. In cellule continuamente passate e tenute in selezione i repliconi possono mantenersi stabili per più di due anni, ma se la selezione viene interrotta, per quanto i repliconi si mantengano comunque per alcuni mesi, diminuisce gradualmente l’efficienza di replicazione. Inoltre, in cellule confluenti, i livelli di replicone sono bassi, come se la replicazione e/o la traduzione

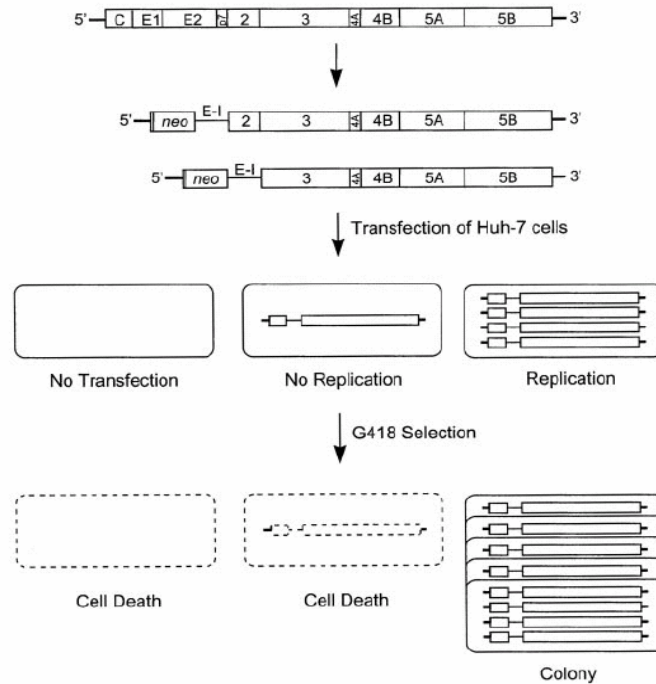


Figura 1.4:

Rappresentazione schematica del metodo usato per stabilire linee cellulari all'interno delle quali si replica il replicone

La struttura del genoma di HCV è schematizzata nella parte alta della figura; al di sotto è riportata l'organizzazione dei subgenomi virali derivati dal genoma di HCV, chiamati appunto repliconi. Queste molecole sono derivate dal genoma virale del virus dell'epatite C di genotipo 1b che ha subito le seguenti modificazioni:

- delezione della regione che codifica per le proteine strutturali da core (C) a p7 e spesso anche per NS2 (uno dei due esempi);
- inserzione di un gene che codifica per la neomicina fosfotrasferasi (neo) che conferisce alla cellula resistenza contro l'antibiotico G418;
- inserzione dell'IRES del virus dell'encefalomiocardite (E-I) fra il gene neo e la regione che codifica per le proteine virali non strutturali.

Il replicone risulta quindi bicistronico.

Il replicone viene poi trasfettato in cellule di epatoma umano Huh7 e le cellule tenute in selezione con G418. Solo le cellule nelle quali il replicone si replica sopravvivono, per la presenza al loro interno del prodotto del gene neo.

(R. Bartenschlager e V. Lohmann, 2000)

dipendessero da fattori cellulari che variano nei diversi momenti della crescita cellulare (Pietschmann T. *et al.*, 2001).

Sebbene i repliconi si replichino comunque ad un livello più elevato rispetto al genoma virale completo, si ottiene solo un basso numero di cloni dopo trasfezione e selezione (Blight K.J. *et al.*, 2000).

Il sequenziamento di questi cloni resistenti mostra l'accumulo di mutazioni adattative che aumentano il livello di replicazione tanto da conferire resistenza alla G418 nelle cellule trasfettate. Vennero trovate mutazioni in diverse regioni, nella regione che codifica per NS3, per NS5B, ma la maggior parte delle mutazioni adattative si trovavano nella regione che codifica per la proteina NS5A (Fig.1.5). Una di queste mutazioni, una delezione, venne identificata nella regione che è mostrata interagire con la PKR (Gale M.J. *et al.*, 1997; Gale M.J. *et al.*, 1998).

Queste alterazioni del genoma interne ad NS5A incrementano la traduzione fino a circa ventimila volte (Blight K.J. *et al.*, 2000), ma il livello di adattamento varia significativamente al variare delle mutazioni.

Non è ancora chiaro il perché queste mutazioni determinino un miglior adattamento ed una replicazione più efficiente delle molecole; e d'altronde se nel caso di NS3 o NS5B le mutazioni potrebbero modulare l'attività degli enzimi virali ed alterare la replicazione, per NS5A, la cui funzione è ancora sconosciuta, tutto è ancora del tutto speculativo. Sicuramente il fatto che mutazioni in questa regione siano adattative può far ipotizzare una funzione importante per la proteina nel ciclo vitale di HCV.

La possibilità comunque di avere a disposizione queste molecole ha permesso fino ad oggi di poter studiare *in vitro* la replicazione di HCV. In questo modo è stato possibile osservare nel complesso di tutte le proteine virali non strutturali quelle interazioni fra proteine che fino ad oggi potevano essere osservate solo singolarmente, ed è inoltre stato possibile valutare e tentare diverse terapie antivirali. Si è visto infatti che la replicazione dei repliconi è sensibile all'IFN- $\alpha$ , che ne determina una riduzione di circa 10 volte (Guo J.T. *et al.*, 2001), e che repliconi adattati sono comunque sensibili all'IFN- $\alpha$  (Blight K.J. *et al.*, 2000).

E' vero d'altronde che la mancanza della porzione del genoma virale che codifica per le proteine strutturali in questi subgenomi e quindi la mancanza delle stesse proteine, potrebbe costituire un problema, poiché anch'esse potrebbero essere coinvolte nella risposta all'IFN- $\alpha$ , come è stato ampiamente mostrato per E2 (Taylor D. *et al.*, 1999).

Un altro importante fattore da tener presente è rappresentato dal fatto che solo cellule Huh7 supportano con elevata efficienza la replicazione dei repliconi, mentre le altre linee cellulari, comprese quelle permissive per HCV, quali per esempio HepG2 o PH5CH, non ne sono capaci, o ne sono

capaci solo limitatamente. Questo potrebbe dipendere, come già detto, da fattori presenti nelle cellule ospiti importanti per il virus, che differiscono fra Huh7 e le altre linee cellulari (Pietshmann T. *et al.*, 2001).

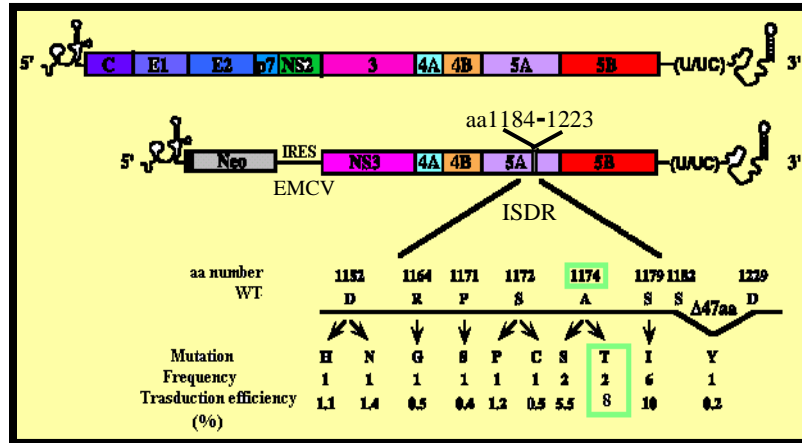


Figura 1.5:

Schematizzazione delle mutazioni “adattative” spontanee che possono avvenire nel replicone: frequenza relativa ed efficienza di replicazione

Nella parte alta della figura è riportata la struttura del genoma di HCV e del subgenoma (replicone) costruito a partire da questo. Viene messa in evidenza la regione ISDR (“regione che determina la sensibilità all’IFN”) interna ad NS5A.

Nella parte bassa sono riportate le mutazioni più frequenti nella regione che codifica per la proteina virale NS5A con la relativa posizione, frequenza ed efficienza di traduzione (%).

Si ritiene che questa proteina della quale non è stata ancora definita la funzione sia importante per la replicazione di HCV, anche perché molte mutazioni che rendono il replicone “adattato” cadono proprio nella regione che codifica per NS5A.

Viene evidenziata da una cornice verde la mutazione che caratterizza il replicone che ho utilizzato nel mio lavoro di tesi.

(Modificata da Blight K.J. *et al.*, 2000)

Un altro enigma è l’osservazione che solo repliconi costruiti a partire dal genotipo virale 1b risultano funzionali, e non lo sono invece repliconi costruiti da altri genotipi, quali per esempio 1a (Blight K.J. *et al.*, 2000). Il perché non è ancora chiaro, ma evidenzia una dipendenza del successo del lavoro dal genotipo prescelto.

### 1.5.5 Replicazione completa del virus dell'epatite C in cellule in coltura

Solo nel 2005 è stato possibile superare anche l'ultimo scoglio rappresentato dall'assenza di replicazione virale completa in cellule in coltura. Certo, la costruzione dei repliconi ha permesso negli ultimi anni un enorme passo avanti nello studio e nelle conoscenze relative al virus dell'epatite C, ma la possibilità di avere a disposizione oggi un modello di infezione completa, con produzione di progenie virale, permette un grandissimo avanzamento e pone nuove domande alle quali sarà forse possibile dare ora una risposta.

Contemporaneamente Wakita T. e Lindenbach B.D. ed i rispettivi gruppi di ricerca hanno pubblicato lavori nei quali veniva utilizzato un "replicone completo" di HCV, capace di replicare in coltura senza necessità di mutazione adattative e capace di secernere particelle virali infettive (Wakita T. *et al.*, 2005; Lindenbach B.D. *et al.*, 2005).

Il genoma utilizzato è stato isolato da un individuo con epatite fulminante. Questo genoma completo di HCV, appartenente al genotipo virale 2a (FL-JFH), replica efficientemente in cellule Huh7 e non richiede appunto alcuna mutazione. La trasfezione *in vitro* del trascritto completo in cellule Huh7 risulta nella secrezione di particelle virali che sono a loro volta infettive per colture cellulari e per scimpanzé (Wakita T. *et al.*, 2005).

Anche Lindenbach B.D. raggiunge lo stesso risultato utilizzando un genoma completo formato da due diverse porzioni, entrambe di genotipo 2a. Una prima regione core-NS2 viene dal genotipo 2a (J6), mentre la seconda deriva da un replicone già utilizzato in precedenza, anch'esso di genotipo 2a, che replica in cellule in coltura senza bisogno di mutazioni adattative (SRG-JFH1). L'unione di queste due parti risulta in un "replicone completo" (FL-J6/JFH) competente per la replicazione e che produce particelle virali infettive (Lindenbach B.D. *et al.*, 2005).

Adesso si ha quindi a disposizione un modello completo per lo studio del virus dell'epatite C, con la possibilità di infettare cellule Huh7, e di studiare fasi del ciclo vitale di HCV, come l'ingresso o il rilascio delle particelle virali, che era impossibile studiare con l'utilizzo dei repliconi.

### 1.6 Interazioni virus - ospite

Alcune interazioni, quali per esempio quelle di E2 con CD81 o con SRBI, importanti per l'ingresso del virus nella cellula bersaglio, sono state già descritte nei paragrafi precedenti. Qui di seguito ci soffermeremo sulle molte alterazioni da parte di HCV di diverse vie di trasduzione del segnale nella cellula ospite (schema seguente).

Le alterazioni dell'ospite da parte del virus sono essenzialmente finalizzate ad evadere la risposta immune e ad alterare la proliferazione cellulare con la conseguente induzione di tumori. L'evasione della risposta immune è legata principalmente alla possibilità che ha HCV di variare continuamente non permettendo che possa montarsi una risposta immunitaria capace di distruggere il virus. E2 è sicuramente una delle proteine più importanti, insieme a NS5A, nell'evasione del virus dalla risposta immune dell'ospite (Zibert A. *et al.*, 1995; Farci P. *et al.*, 2000). Infatti, E2 contiene una regione ipervariabile chiamata HVR-1 altamente antigenica, verso la quale l'ospite produce anticorpi. Poiché però questa regione è in continuo variare, gli anticorpi prodotti contro HVR-1 al fine di neutralizzare il virus e l'infezione, non danno luogo al risultato desiderato e il virus riesce ad evadere la risposta immunitaria (Farci P. *et al.*, 1996).

Alcuni autori hanno ipotizzato che HCV vari continuamente per adattarsi ai diversi "ambienti" cellulari, e che con il tempo vadano selezionandosi varianti più resistenti; ma al contrario altri ipotizzano che il virus abbia la possibilità di variare perché l'ospite non risponde efficacemente all'infezione e non il contrario, e che lì dove ci sia invece una buona risposta immune dell'ospite, non vengano a generarsi forme varianti o siano comunque molto più limitate (Farci P. *et al.*, 2000 e referenze all'interno).

L'alterazione della cellula ospite e del suo ciclo cellulare possono avere diverse interpretazioni, molto più evidente è invece la finalità legata all'alterazione della via di trasduzione dell'IFN da parte di NS5A e di E2. Interferire con questa via è infatti una delle strategie virali per bloccare la risposta immunitaria da parte dell'ospite.

Schema **INTERAZIONI VIRUS-OSPITE IMPORTANTI PER:**

● **INGRESSO DEL VIRUS NELLA CELLULA OSPITE:**

- **E2** – CD81 (Pileri P. *et al.*, 1998),
- **E2** – LDL<sub>r</sub> (Agnello V. *et al.*, 1999),
- **E2** – SRBI (Scarselli E. *et al.*, 2002).

● **ALTERAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE:**

- **Core** – TNF<sub>r</sub> (Zhu N. *et al.*, 1998).
- **Core** – LTβ<sub>r</sub> (Matsumoto M. *et al.*, 1997).
- **Core** attiva NF-kB inibendo la morte cellulare programmata mediata da Fas e da TNF (Marusawa H. *et al.*, 1999 Ray R.B. *et al.*, 1998),  
ha funzioni trasformanti in collaborazione con l'oncogene Ras (Ray R.B. *et al.*, 1996a; Ray R.B. *et al.*, 1996b), in topi transgenici sembra indurre epatocarcinoma (Moriya K. *et al.*, 1999),  
regola negativamente p53 (Ray R.B. *et al.*, 1997),  
aumenta il livello di espressione della ciclina E (Cho J.W. *et al.*, 2001),  
aumenta la degradazione degli inibitori di NF-kB, IκB-β, aumentando il segnale indotto dalla linfotossina α1β2 o da TNF-α (Li R.Y. *et al.*, 1999).
  
- **NS3** sembra avere la capacità di trasformare cellule NIH3T3 (Sakamuro D. *et al.*, 1995).
  
- **NS5A** – p53 (Majumder M. *et al.*, 2001),
- **NS5A** – SRCAP (Ghosh A.K. *et al.*, 2000),
- **NS5A** regola negativamente p21 (Ghosh A.K. *et al.*, 1999), altera i livelli di calcio (Ca<sup>2+</sup>), provocando stress ossidativo e attivando i fattori trascrizionali STAT3 e NF-kB (Gong G. *et al.*, 2001),
- **NS5A** – PI3K (subunità p85) (He Y. *et al.*, 2002),
- **NS5A** – Bax (Chung Y-L. *et al.*, 2003),
- **NS5A** – TRAF2 - TRADD (Park K.J. *et al.*, 2002; Park K.J. *et al.*, 2003),
- **NS5A** – cdk1 (Arima N. *et al.*, 2001).

● **ALTERAZIONI DI ALTRE FUNZIONI CELLULARI:**

- **NS3** – subunità C della PKA (Borowski P. *et al.*, 1996),
- **NS3** – ELKS- $\delta$  (Hidajat R. *et al.*, 2005),
- **NS3** – ELKS- $\alpha$  (Hidajat R. *et al.*, 2005),
- **NS3** – LMP7 (Khu Y.L. *et al.*, 2004),
- **NS3** – Sm-D1 (Iwai A. *et al.*, 2003).
  
- **NS5A** – apolipoproteina A1 (Shi S. *et al.*, 2002),
- **NS5A** – hVAP-33 SNARE-like protein (Tu H. *et al.*, 1999),
- **NS5A** – hVAP-B (Hamamoti I. *et al.*, 2005),
- **NS5A** – Amphiphysin II (Zech B. *et al.*, 2003),
- **NS5A** – La protein (Spangberg K. *et al.*, 1999),
- **NS5A** –HSP27 (Choi Y.W. *et al.*, 2004).
  
- **NS5B** – hVAP-33 SNARE-like protein (Tu H. *et al.*, 1999),
- **NS5B** – hVAP-B (Hamamoti I. *et al.*, 2005),
- **NS5B** – hPLIC1 (Gao L. *et al.*, 2003),
- **NS5B** –  $\alpha$ -actinina (Lan S. *et al.*, 2003).

● **ALTERAZIONE DELLE VIE DI TRASDUZIONE DELL'IFN :**

- **E2** – PKR indotta dall'IFN (PePHD) (Taylor D. *et al.*, 1999).
  
- **NS3** – TBK1 (Otsuka M. *et al.*, 2005).
  
- **NS5A** – PKR indotta dall'IFN  
(Gale M. *et al.*, 1998; Gale M. *et al.*, 1999),
- **NS5A** – Grb2 (Tan S.L. *et al.*, 1999),
- **NS5A** – IL-8 (Polyak S.J. *et al.*, 2001),
- **NS5A** – Fyn (Macdonald A. *et al.*, 2004),
- **NS5A** – 2'-5' OAS (Taguchi T. *et al.*, 2004).

E' stato infine visto che le proteine virali inibiscono i segnali di traduzione indotti dall'IFN- $\alpha$  (pathway Jak-STAT) (Heim M. *et al.*, 1999).

**INTERAZIONI VIRUS-hnRNP:**

- **Core** – hnRNP K (Hsieh T.Y. *et al.*, 1998).
  
- **IRES HCV** - hnRNP L (Hahn B. *et al.*, 1998),



hnRNP E1 – E2 (Spångberg K. e Schwarz S., 1999),  
PTB (Ali N. e Siddiqui A., 1995),  
- **3’NTR HCV** – PTB (Chung R.T. e Kaplan L.M., 1999),  
hnRNP C (Gontarek R. *et al.*, 1999)

#### 1.6.1 Alterazione della proliferazione

La proteina core, componente principale del nucleocapside, sembra essere la principale responsabile per le alterazioni della proliferazione indotte dal virus. Il suo esatto ruolo nel modulare la proliferazione rimane ancora da definire, essendo stata descritta come una proteina sia con funzione proapoptotica che antiapoptotica.

Come proteina proapoptotica core viene descritta legare il dominio citoplasmatico del recettore della linfotossina  $\beta$  ( $LT\beta_r$ ) e del recettore del fattore di necrosi tumorale ( $TNF_r$ ) all'interno di cellule HeLa, rendendo tali cellule più sensibili alla morte cellulare programmata (Zhu N. *et al.*, 1998). La proteina virale non aumenta il livello dell'RNA messaggero del recettore del TNF o della  $LT\beta$ , per cui si ritiene che possa alterare la sensibilità della cellula verso l'apoptosi.

Un ulteriore ruolo di core come proteina proapoptotica è stato descritto da Ruggeri A. e collaboratori (Ruggeri A. *et al.*, 1997); la proteina virale sembrerebbe aumentare la sensibilità delle cellule alla morte per apoptosi mediata da Fas, senza però alterarne l'espressione.

Al contrario altri dati mostrano una proteina con funzione antiapoptotica; core viene vista attivare NF-kB e quindi inibire la morte cellulare programmata mediata da Fas e da TNF (Marusawa H. *et al.*, 1999; Ray R.B. *et al.*, 1998).

Controverse sono anche le informazioni su un ipotetico ruolo della proteina core nella trasformazione cellulare. La proteina virale viene infatti descritta reprimere l'attività del promotore di p53 in cellule COS-7 e in cellule HeLa (Ray R.B. *et al.*, 1997). Il decremento dell'espressione di p53 causerebbe nelle cellule un aumento dell'instabilità genetica.

Funzioni trasformanti della proteina del nucleocapside sono state osservate anche in fibroblasti primari di embrione di ratto in collaborazione con l'oncogene Ras (Ray R.B. *et al.*, 1996a; Ray R.B. *et al.*, 1996b) o in topi transgenici, dove core sembra indurre epatocarcinoma (Moriya K. *et al.*, 1998).

Al contrario altri lavori mostrano che la proteina core non ha la capacità di trasformare fibroblasti embrionali di ratto in cooperazione con Ras (Chang J. *et al.*, 1998). In realtà core sembra avere la capacità di trasformare le cellule, ma non di immortalizzarle.

Core sembra poi aumentare l'espressione della ciclina E aumentandone la quantità di mRNA, promovendo quindi la proliferazione cellulare (Cho J.W. *et al.*, 2001).

La proteina core interferisce inoltre con diverse vie di trasduzione cellulari. In cellule Huh7 e in cellule HeLa, è stato osservato che la proteina virale aumenta la degradazione degli inibitori di NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\beta$ , aumentando il segnale indotto dalla linfotossina  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 o da TNF- $\alpha$  (You L-R. *et al.*, 1999). Core non sembra alterare il livello di espressione di NF- $\kappa$ B, ma potrebbe interferire sulla sua traslocazione nel nucleo.

Core sembra anche interagire con la porzione citoplasmatica del recettore della LT $\beta$ , coinvolto nella via di trasduzione del segnale di citotossicità (Matsumoto M. *et al.*, 1997; Chen C.M. *et al.*, 1997).

Altre proteine virali in grado di alterare la proliferazione cellulare sono NS3 e NS5A.

NS3 sembra avere la capacità di trasformare cellule NIH3T3 (Sakamuro D. *et al.*, 1995). Da questo lavoro risulta che nella trasformazione può essere coinvolta la regione amino-terminale della proteina virale.

NS5A è mostrata modulare geni che regolano il ciclo cellulare e promuovere la crescita cellulare. Per esempio, regola negativamente p21 promuovendo il passaggio dalla fase G alla fase S del ciclo cellulare. L'inibizione di p21 sarebbe causata da un blocco del suo stesso promotore modulato dalla proteina virale (Ghosh A.K. *et al.*, 1999).

E' stata inoltre dimostrata l'interazione fisica fra NS5A e p53 (Majumder M. *et al.*, 2001). Questo legame, dimostrato con la tecnica del doppio ibrido, permetterebbe ad NS5A di trattenere p53 sulla membrana perinucleare e di modulare così anche p21, attivato da p53. In questo modo NS5A potrebbe mediare la patogenesi virale.

Lo stesso Ghosh A.K. e collaboratori (Ghosh A.K. *et al.*, 1999) hanno osservato che l'introduzione della proteina virale in cellule NIH3T3 promuove la formazione di tumori in topi nudi.

D'altra parte NS5A viene anche descritta alterare il ciclo cellulare agendo sul complesso cdk1/2 – ciclina inibendo la crescita cellulare. NS5A è stato dimostrato appunto interagire *in vivo* ed *in vitro* con cdk1; questa interazione comporterebbe un'inibizione della crescita cellulare ed una conseguente perturbazione del ciclo, che vede incrementare la fase G2/M. La cdk1 è

infatti principalmente richiesta proprio per la transizione dalla fase G2 alla fase M (Arima N. *et al.*, 2001).

NS5A interagisce inoltre con la porzione carbossi-terminale del fattore di trascrizione cellulare SRCAP (Ghosh A.K. *et al.*, 2000). La proteina virale co-precipita con SRCAP endogeno e colocalizza con questo. Poiché in presenza di SRCAP NS5A inibisce p21 più efficientemente, questa interazione potrebbe essere uno dei meccanismi attraverso i quali la proteina di HCV modula la crescita cellulare contribuendo alla patogenesi virale.

Nella cellula NS5A poi altera i livelli di calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), provocando stress ossidativo e attivando i fattori trascrizionali STAT-3 e NF-kB (Gong G. *et al.*, 2001). Si ipotizza che la proteina virale possa indurre stress ossidativo, seguito dal rilascio del  $\text{Ca}^{2+}$ , aumento delle Ras ed attivazione di NF-kB. NF-kB una volta attivato andrebbe ad accendere geni protettivi e/o anti-apoptotici.

NS5A quindi causerebbe ad un aumento del livello dei ROS all'interno della cellula ospite e questo comporterebbe un aumento dei livelli di STAT3. Interagendo e modulando inoltre Fyn, molecola che controlla la fosforilazione di STAT3, NS5A controllerebbe un'eventuale trasformazione neoplastica a carico degli epatociti (Macdonald A. *et al.*, 2004).

Ancora per quanto riguarda la modulazione di NF-kB, in cellule HEK293, l'aumentata espressione di NS5A inibisce l'attivazione di NF-kB indotta da TNF- $\alpha$  e TRAF2, interagendo con TRAF2, ma al contrario non altera la sua attivazione se indotta da MEKK1 e IKK $\beta$ , suggerendo una specifica azione di NS5A per mezzo di TRAF2 stesso (Park K.J. *et al.*, 2002). Sempre nello stesso schema si discute l'interazione di NS5A con TRADD, si ipotizza infatti che si formi nella cellula infettata un complesso ternario NS5A-TRAF2-TRADD che ha come scopo appunto quello di perturbare il ciclo cellulare inibendo il segnale legato a TNF- $\alpha$  e l'attivazione di NF-kB (Park K.J. *et al.*, 2003).

Sempre classificabile come alterazione della proliferazione è stata studiata l'interazione della proteina non strutturale 5A con Bax. In cellule dove viene indotta l'apoptosi NS5A e Bax colocalizzano nel nucleo, cambiando quindi la loro localizzazione e passando dal citosol al nucleo (Chung Y.L. *et al.*, 2003).

Nella patogenesi da HCV è anche molto importante l'alterazione della cascata di trasduzione di AKT. È stata riferita l'interazione di NS5A con la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K); la proteina virale legherebbe la subunità p85 dell'enzima, portando un'aumentata attività di PI3K. Questa modulazione positiva risulterebbe in un aumento di attività proprio di AKT

(He Y. *et al.*, 2002). L'interazione di NS5A con l'enzima promuoverebbe la sopravvivenza cellulare e sembra anche permettere indirettamente l'interazione della proteina di HCV con un'altra proteina cellulare, Gab1 (Grb2-associated binder 1). L'associazione di NS5A con Gab1 sembra infatti indiretta e molto probabilmente dipendente proprio dal legame della proteina con PI3K e non dal legame con Grb2, come si era ipotizzato.

### 1.6.2 Alterazioni di altre funzioni cellulari

NS3 inibisce la fosforilazione mediata da una protein-chinasi (PKA) dipendente da AMP ciclico (cAMP) (Borowski P. *et al.*, 1997). La proteina di HCV lega la subunità C della PKA inibendolo in modo cAMP indipendente. PKA è una protein-chinasi che si localizza normalmente nel citoplasma come tetramero formato da due subunità R e due subunità C. In seguito ad un determinato stimolo cAMP lega le subunità R e le due subunità C migrano nel nucleo per svolgere diverse funzioni. NS3 sembrerebbe bloccare o comunque ritardare questa migrazione nel nucleo delle due subunità, riducendo in tal modo l'attività della PKA.

NS3 sembra anche alterare altre vie cellulari, interagisce per esempio con ELKS- $\delta$  e con la sua variante di splicing ELKS- $\alpha$ , proteine coinvolte nel trasporto intracellulare e nella via secretoria (Hidajat R. *et al.*, 2005).

La proteina virale interagisce inoltre con un componente delle ribonucleoproteine nucleari (snRNP) associate con diverse malattie autoimmuni, Sm-D1 (Iwai A. *et al.*, 2003). Questa interazione, in cellule che sovra-esprimono Sm-D1, comporta un cambio di localizzazione di NS3, che generalmente citoplasmatica, diviene nucleare. La funzione di questa interazione non è nota, così come non è chiara la finalità dell'interazione della stessa proteina di HCV con LMP7, componente dell'immunoproteasoma (Khu Y.L. *et al.*, 2004).

NS5A interagisce con alcune proteine cellulari quali l'apolipoproteina A1, coinvolta nel metabolismo dei trigliceridi (Shi S.T. *et al.*, 2001) e le proteine SNARE-simili h-VAP33 (VAP-A), coinvolte nel trasporto vescicolare (Tu H. *et al.*, 1999).

Anche NS5B interagisce con h-VAP33 (Tu H. *et al.*, 1999) legandone la porzione amino-terminale.

Dopo Tu H. ed i suoi collaboratori altri due lavori descrivono interazioni fra le proteine virali non strutturali e le "proteine associate alle vescicole". Nel 2004 l'interazione fra hVAP-33 e le proteine non strutturali viene

descritta mediare la formazione del complesso di replicazione di HCV su i lipid raft. In questo studio si vede come l'espressione di un dominante negativo della proteina cellulare o la sua modulazione negativa tramite "RNA-interference" in cellule all'interno delle quali replica il replicone di HCV comporta una inibizione dell'associazione delle proteine non strutturali del virus con le membrane resistenti ai detergenti, riducendo i livelli di espressione dello stesso NS5A e dell'RNA di HCV (Gao L. *et al.*, 2004).

Solo un anno più tardi anche l'altra isoforma VAP-B viene vista essere coinvolta nella replicazione virale attraverso la sua interazione con le due proteine NS5A ad NS5B (Hamamoto I. *et al.*, 2005).

Essendo le proteine h-VAP (A e B) associate alla membrana, questa interazione potrebbe essere importante per il legame del complesso di replicazione virale costruito intorno ad NS5B alle membrane cellulari.

Nel lavoro di Hamamoto I. e dei suoi collaboratori viene infatti proposto un modello di interazione fra le proteine NS del virus e le VAP secondo il quale omo- o etero-dimeri delle proteine VAP potrebbero interagire con NS5A e NS5B attraverso due diversi domini. NS4B al contrario potrebbe associarsi direttamente con le membrane resistenti ai detergenti ("lipid raft") ed interagire con NS5A (Hamamoto I. *et al.*, 2005).

NS5A interagisce anche con proteine con diverse attività, e di queste interazioni non è del tutto chiara la funzione. Per esempio è stata descritta la sua interazione con la proteina cellulare amfifisina II (Amph II), e si è visto che questa interazione inibisce la fosforilazione della proteina virale stessa (Zech B. *et al.*, 2003; Masumi A. *et al.*, 2005). Interagisce poi con una proteina, La, che è stata già vista interagire con le regioni non tradotte 5' e 3' del genoma virale (Houshmand H. *et al.*, 2003).

Anche la polimerasi virale, NS5B, è stata descritta interagire con altre proteine cellulari. L'aumento di espressione della proteina ubiquitina-simile hPLIC1, con la quale interagisce, riduce l'emivita della proteina di HCV aumentando la sua poliubiquitinazione. Riducendosi nella cellula la concentrazione della polimerasi del virus dell'epatite C, la sovra-espressione della proteina cellulare hPLIC1 riduce di conseguenza anche l'espressione dell'RNA virale (Gao L. *et al.*, 2003).

Inoltre è stata studiata la sua interazione con l' $\alpha$ -actinina, che risulta essenziale per la replicazione del virus, anche se non se ne conosce la funzione nel ciclo vitale di HCV (Lan S. *et al.*, 2003).

### 1.6.3 Alterazione delle vie di trasduzione dell'IFN

La terapia con l'IFN- $\alpha$ , da solo o in combinazione con un analogo nucleosidico, la ribavirina, è attualmente l'unica terapia possibile per il trattamento dell'epatite C (Bartenschlager R. e Lohmann V., 2000). Purtroppo solo una percentuale bassa dei pazienti trattati rispondono positivamente alla terapia, che presenta inoltre elevata citotossicità. La possibilità di capire se e come le proteine virali possano interferire con l'azione antivirale dell'IFN accende una nuova speranza nella cura di questa malattia.

Gli interferoni costituiscono una famiglia eterogenea di citochine caratterizzate da attività antivirale, antiproliferativa ed immunomodulatoria; tali attività biologiche sono prevalentemente mediate dalla regolazione di geni specifici.

Sono classificati in base alle loro differenti caratteristiche antigeniche in IFN di tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\tau$  e  $\omega$ ) e di tipo II (IFN- $\gamma$ ) (Samuel C.E., 2001 e referenze all'interno).

L'IFN- $\alpha$  quindi, utilizzato come terapia antivirale per il virus dell'epatite C, appartiene agli IFN di tipo I ed è, insieme al  $\beta$ , uno dei meglio caratterizzati. E' prodotto da tutte le cellule dell'organismo in seguito ad infezione virale, al trattamento con RNA a doppio filamento oppure in risposta alla somministrazione di alcune citochine o fattori di crescita.

Gli IFN di tipo I condividono tutti lo stesso recettore. Sia nell'uomo che nel topo sono stati identificati due diversi geni codificanti le subunità recettoriali IFNAR 1 (o IFNAR  $\alpha$ ) e IFNAR 2 (o IFNAR  $\beta$ ).

IFNAR 1 codifica per una glicoproteina di membrana. Il trattamento della cellula con IFN di tipo I induce la fosforilazione di IFNAR 1 a livello di specifici residui di tirosina.

IFNAR 2 codifica nell'uomo per tre diverse isoforme.

Gli IFN attivano più di una via di trasduzione del segnale all'interno della cellula. La principale via di attivazione che porta ad una modulazione dell'espressione genica è rappresentata dalla via Jak/STAT.

Il legame tra l'IFN di tipo I ed il suo recettore (IFNAR) attiva le tirosin chinasi Tyk2 e Jak1 della famiglia delle Jak (acronimo di "*Janus Kinases*") associate alle catene recettoriali, portando alla fosforilazione di IFNAR 1 e IFNAR 2 a livello di specifici residui di tirosina. Alle catene recettoriali dei IFNAR fosforilate in tirosina dalle Jak si associano STAT1 e STAT2 (acronimo di *Signal Transducers and Activators of Transcription*). L'IFN di tipo I promuove la fosforilazione delle proteine STAT1 e STAT2 che una volta fosforilate omo- o eterodimerizzano portando alla formazione dei

fattori trascrizionali ISGF3 (STAT1-STAT2-p48) e GAF (omodimero STAT1). p48 è una proteina non-STAT che appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione IRF (“*Interferon Regulatory Factors*”), e che consente al complesso trascrizionale ISGF3 di legarsi alla sequenza di DNA altamente conservata detta ISRE (“*IFN $\alpha$  Stimulated Response Element*”) (Fig.1.6).

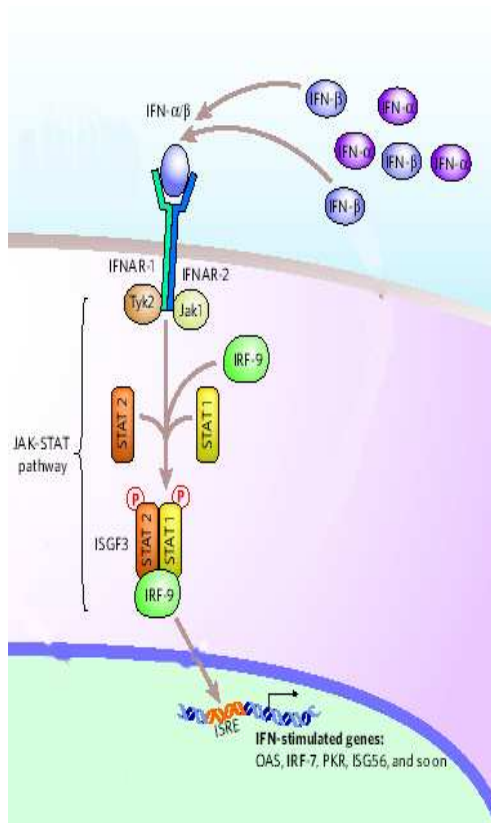


Fig.1.6:

Via di trasduzione dell'IFN di tipo I ( $\alpha/\beta$ )

L'attività biologica dell'IFN inizia con il legame a specifici recettori. Questo determina l'attivazione di tirosin-chinasi ad essi associate (Tyk2 e Jak1 della famiglia delle Jak). Queste chinasi fosforilano fattori di trascrizione della famiglia degli STAT, che quindi possono traslocare nel nucleo, formare omodimeri (STAT1-STAT1) o eterodimeri ISGF3 (STAT1-STAT2-p48) e legarsi a specifici promotori.

Il legame con questi promotori determina la trascrizione di specifici geni bersaglio.

ISRE ; elemento che si trova nei geni trascritti dall'IFN di tipo I.

(Modificata da Gale M.J. e Foy E.M., 2005)

L'IFN è inoltre in grado di attivare direttamente proteine ad azione antivirale. Le più caratterizzate sono:  
 protein chinasi R (PKR);  
 2',5' oligoadenilato sintetasi (OAS);  
 GTPasi Mx.

PKR è una protein-chinasi dipendente da RNA a doppio filamento (dsRNA). Si attiva per autofosforilazione in presenza di dsRNA. Una volta attivata catalizza la fosforilazione di diversi substrati, fra i quali la subunità  $\alpha$  del fattore di allungamento della sintesi eIF (eIF-2 $\alpha$ ). Questa fosforilazione porta all'inibizione di eIF-2 $\alpha$  e al conseguente blocco della sintesi proteica. Questa via rappresenta quindi un modo generico per bloccare la sintesi proteica del virus.

La 2',5' oligoadenilato sintetasi porta alla degradazione di RNA virali. L'OAS catalizza la sintesi di oligomeri adenilici con legame fosfodiesterico 2',5'. Questi si legano alla ribonucleasi L (RNasi L) inattiva attivandola. L'attivazione di questa endoribonucleasi porta alla degradazione dell'RNA virale.

Le proteine MxA e Mx1 della famiglia Mx sono GTPasi attivate dall'IFN di tipo I. Sono sufficienti da sole per bloccare la replicazione virale anche in assenza delle altre proteine indotte dall'IFN  $\alpha/\beta$ . L'attività antivirale delle diverse Mx dipende dalla localizzazione delle stesse proteine e dal virus stesso. Si ritiene che il bersaglio di queste proteine possa essere rappresentato dal nucleocapside virale e che in qualche modo vadano ad inibire la sintesi dell'RNA (Fig.1.7).

HCV ha sviluppato una serie di meccanismi per bloccare l'azione dell'IFN; ad esempio E2 inibisce l'attività della protein chinasi R (PKR) (Taylor D. *et al.*, 1999). Probabilmente l'azione inibitoria svolta da E2 dipende da una sequenza di 12 aa interna alla proteina, quasi identica al sito di fosforilazione della PKR e di eIF-2 $\alpha$ . La scoperta di questa regione, definita PePHD ("PKR - eIF-2 $\alpha$  Phosphorylation Homology Domain") ha fatto ipotizzare che E2 possa funzionare come pseudo-substrato della PKR inibendone così la funzione.

In realtà vi sono altre evidenze che l'inibizione della PKR da parte di E2 non dipende semplicemente dalla competizione con il sito di fosforilazione della chinasi cellulare, ma che vi possano essere altri meccanismi ancora sconosciuti (Taylor D. *et al.*, 2001).

NS5A è descritto in diversi lavori legare la PKR. Questa interazione sembra abolire la fosforilazione di eIF-2 $\alpha$  (Gale M.J. *et al.*, 1999).

Altri lavori ipotizzano invece che NS5A possa inibire la PKR legandosi al suo sito di dimerizzazione (Gale M.J. *et al.*, 1998), ed evitando così la formazione del dimero attivo.



**AZIONE ANTIVIRALE DELL'IFN  $\alpha/\beta$**

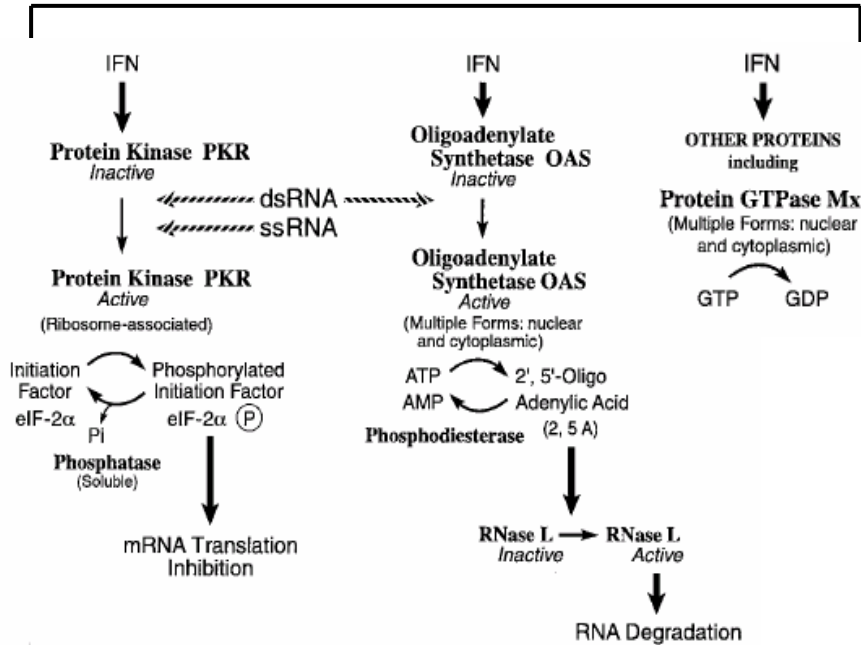


Figura 1.7:

Funzioni delle proteine indotte dall'IFN di tipo I

L'IFN è in grado di attivare direttamente proteine ad azione antivirale. Le più caratterizzate sono: la protein chinasi R (PKR); la 2',5' oligoadenilato sintetasi (OAS); le GTPasi Mx.

La PKR inibisce la traduzione attraverso la fosforilazione del fattore di inizio della sintesi proteica eIF-2 $\alpha$  che viene così inibito; l'RNasi L, attivata dalla 2',5' oligoadenilato sintetasi (OAS), media la degradazione dell'RNA; la famiglia delle GTPasi Mx sembra avere come bersaglio il capsido virale e la sintesi dell'RNA.

(Modificata da Samuel C.E., 2001)

All'interno della proteina di HCV è stata identificata una regione ISDR (regione che determina la risposta all'IFN) che sembra essere importante per la risposta all'IFN.

D'altra parte diversi dati descrivono un'attività antivirale di NS5A indipendente dal legame con la PKR in cellule Huh7. Così secondo alcuni autori (Squadrito G. *et al.*, 1997; Squadrito G. *et al.*, 1999) non vi è una correlazione fra NS5A e la resistenza all'IFN da parte del virus, mentre per altri (Enomoto N. *et al.*, 1995,1996) vi è una correlazione sostanziale.

E' indirettamente legata all'azione dell'IFN l'interazione di NS5A con una proteina adattatrice, detta Grb2, che attiva Sos e la cascata delle MAP chinasi che fosforilano STAT e con il promotore dell'interleuchina 8 (IL-8) (Tan S.L. *et al.*, 1999; Polyak S.J. *et al.*, 2001). Siccome infatti la cascata delle MAP chinasi è importante per l'espressione dei geni dell'IFN, è possibile che NS5A interferisca nella risposta alla terapia antivirale anche tramite questa via. Inoltre un'induzione da parte della proteina virale dell'mRNA dell'IL-8 ed il conseguente aumento della citochina, potrebbe portare ad un blocco dell'IFN- $\alpha$ , già mostrato *in vitro*.

Un recente lavoro indica inoltre che la proteina virale NS5A interagisce con la 2',5' oligoadenilato sintetasi ed inibisce in questo modo l'attività antivirale dell'IFN (Taguchi T. *et al.*, 2004).

Tantissimi sono quindi i dati che farebbero pensare ad una diretta azione della proteina NS5A sulla cascata dell'IFN al fine di bloccarla ed evitare quindi che la cellula ospite "elimini" il virus, ma effettivamente non si è ancora riusciti ad assegnare una specifica funzione alla proteina.

Anche la proteina di HCV NS3 altera d'altra parte l'azione dell'IFN. L'alterazione legata a questa proteina riguarda principalmente i fattori che regolano l'interferone (IRF). In un lavoro pubblicato nel 2003 sulla rivista "Science", Foy E. ed i suoi collaboratori descrivono come la proteina virale possa bloccare la funzione di IRF3 bloccandone la fosforilazione (Foy E. *et al.*, 2003). IRF3 viene infatti attivato nella cellula per la presenza di RNA a doppio filamento (dsRNA) e quindi risulta attivo anche nelle cellule dove replica il virus dell'epatite C; la sua attivazione avviene ad opera di chinasi cellulari (IKK $\epsilon$  e TBK1). Una volta fosforilata IRF3 trasloca nel nucleo ed attiva la cascata dell'interferone. In cellule all'interno delle quali replica HCV non avviene questa fosforilazione/attivazione, proprio a causa di NS3 e del suo cofattore NS4A. Foy E. e colleghi descrivono l'attività proteasica della proteina virale come responsabile della modificazione (Fig.1.8). Molte sono le informazioni che si hanno sull'interferenza della proteina virale nel pathway dell'IFN. In un lavoro viene descritta per esempio la proteolisi specifica di TRIF ("Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ") proprio ad opera di NS3/4A (Li K. *et al.*, 2005; Ferreón J. *et al.*, 2005). Funzionando TRIF come adattatore per IRF3-TLR3, la sua proteolisi potrebbe ridurre l'abbondanza ed inibirne quindi la funzione, inibendo di conseguenza anche l'attivazione del pathway di IRF3. Inoltre NS3 interagisce con TBK1, che abbiamo detto fosforila proprio IRF3. Il legame risulterebbe nell'inibizione dell'associazione fra la chinasi ed IRF3 con il seguente blocco della sua attivazione (Otsuka M. *et al.*, 2005).

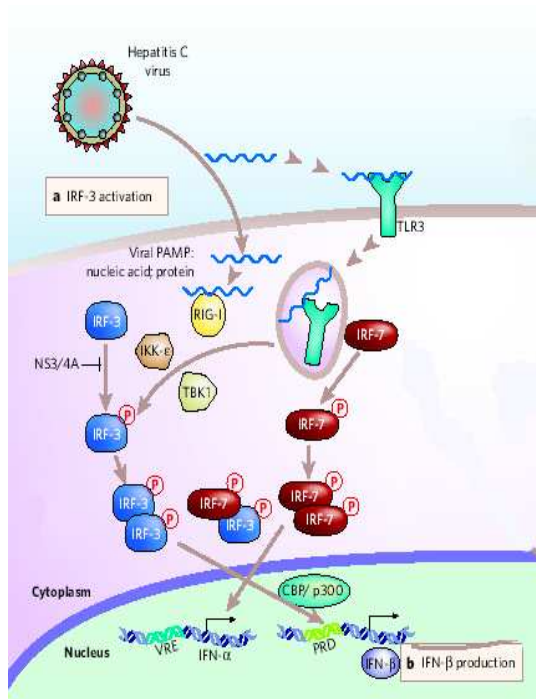


Figura 1.8:

Risposta immune dell'ospite al virus HCV mediato da IRF-3

Quando il virus entra nella cellula la molecola RIG-I si attiva per la presenza di una RNA a doppio filamento. Questo comporta l'attivazione di IRF-3 attraverso le due chinasi (IKK-ε e TBK1). IRF-3 fosforilato è attivo, dimerizza e trasloca nel nucleo, portando alla produzione di IFN-β.

In questo pathway interviene NS3/4A bloccando l'attivazione di IRF-3 tagliando la molecola attraverso la sua attività proteolitica.

(Modificata da Gale M.J. e Foy E.M., 2005)

D'altra parte Breiman A. e collaboratori parlano di un'inibizione a monte della fosforilazione di IRF3, negando un blocco della fosforilazione da parte di IKKε e TBK1. Nello stesso lavoro affermano invece che NS3/4A bloccherebbe TRIF, come già dimostrato precedentemente, e quindi IRF3 come conseguenza (Breiman M. *et al.*, 2005).

Sempre nello stesso ambito si possono collocare i lavori che riguardano l'alterazione del signaling di RIG-I ("Retinoic acid-inducible gene-I"). RIG-I è una proteina citosolica di 925 aminoacidi che contiene una regione amino-terminale CARD ("Caspase Activation and Recruitment Domain") ed a valle una regione DexD/H box elicasi, dominio che lega l'RNA. RIG-I dirige la fosforilazione e quindi l'attivazione di IRF3 proprio in seguito alla presenza nella cellula di dsRNA. Diversi ricercatori descrivono la distruzione del signaling di RIG-I ad opera della proteasi virale NS3/4A (Foy E. *et al.*, 2005; Sumpter R. *et al.*, 2005). Sumpter R. e colleghi propongono un modello nel quale l'RNA a doppio filamento del virus

verrebbe legato dal dominio elicastico di RIG-1; a questo punto il dominio CARD della molecola legherebbe a sua volta un effettore, contenente anch'esso uno stesso dominio CARD e questo porterebbe alla fosforilazione di IRF3 ed alla sua conseguente attivazione. NS3/4A bloccherebbe proprio questa attivazione.

Sembra quindi abbastanza chiaro che la proteina virale NS3/4A in realtà altera la funzione dell'interferone proprio attraverso la sua attività proteasica agendo però a più livelli. Interferisce infatti sia con il pathway mediato da RIG-I sia con quello mediato da TRIF. In entrambi i casi ne risulta comunque un blocco della fosforilazione di IRF3 e della sua fosforilazione (Fig.1.9). E' stato infine visto che le proteine virali inibiscono i segnali di traduzione indotti dall'IFN- $\alpha$  (pathway Jak-STAT) (Heim M. *et al.*, 1999). L'inibizione avviene dopo la fosforilazione di STAT sui residui di tirosina.

Le proteine virali infatti non inibiscono la fosforilazione di STAT e nemmeno la sua traslocazione nel nucleo, ma probabilmente bloccano il legame di STAT al DNA. L'interferenza di HCV con i segnali indotti dall'IFN- $\alpha$  attraverso la via Jak/STAT potrebbe avere un ruolo fondamentale nella resistenza del virus alla terapia con IFN- $\alpha$  osservata in molti pazienti. Potrebbe infatti costituire un'ulteriore strategia tramite la quale il virus sfugge alla risposta immunitaria persistendo all'interno dell'organismo ospite.

#### 1.6.4 Proteine VAP e HCV

Le proteine VAP o VAMP sono proteine associate alle membrane (“*Vesicle-Associated Membrane Protein*”), ubiquitariamente espresse in cellule di mammifero e presenti in diverse membrane cellulari. Nell'uomo sono presenti due diverse isoforme di VAP, VAP-A e VAP-B, codificate da geni separati; mentre VAP-C è una isoforma di splicing di VAP-B. VAP-B mostra un'omologia del 63% con VAP-A (Nishimura Y. *et al.*, 1999). La proteina hVAP-33 (hVAP-A), è stata vista interagire con NS5A e NS5B già nel 1999, *in vivo* e *in vitro*. Le due proteine di HCV interagiscono però con la proteina VAP in due regioni differenti. Mentre infatti NS5A interagisce con la regione “*coiled-coil*” della proteina, NS5B interagisce con la regione N-terminale. Già in questo primo lavoro si era ipotizzato che l'interazione potesse essere sfruttata dal virus per formare il complesso di replicazione delle proteine non strutturali associato alle membrane cellulari (Tu H. *et al.*, 1999).

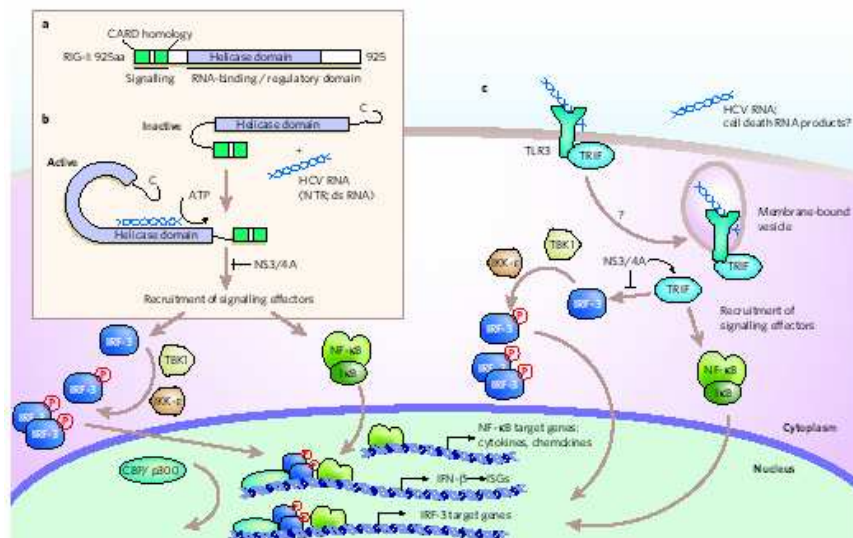


Figura 1.9:

Attivazione di RIG-I e controllo del segnale da parte di NS3/4A

Come descritto nel testo, RIG-I contiene una regione amino-terminale CARD ed a valle una regione DexD/H box elicasi, dominio che lega l'RNA. RIG-I dirige la fosforilazione e quindi l'attivazione di IRF3 proprio in seguito alla presenza nella cellula di ds-RNA. L'RNA a doppio filamento del virus verrebbe legato dal dominio elicastico di RIG-I; a questo punto il dominio CARD della molecola legherebbe a sua volta un effettore, contenente anch'esso uno stesso dominio CARD e questo porterebbe alla fosforilazione di IRF3 ed alla sua conseguente attivazione.

NS3/4A bloccherebbe proprio questa attivazione.

(Modificata da Gale M.J. e Foy E.M., 2005)

Alcuni anni dopo, nel 2004, un altro studio analizzò il meccanismo di associazione delle proteine NS di HCV alle membrane cellulari, dimostrando che benché le proteine non strutturali del virus, analizzate individualmente, siano localizzate nella frazione citosolica, le proteine NS analizzate in presenza delle altre NS, nel complesso del replicone di HCV, sono localizzate principalmente su membrane resistenti ai detergenti. In questo lavoro sono stati analizzati dominanti negativi di hVAP-33 e condotti esperimenti di si-RNA per la stessa proteina VAP.

I risultati dimostrano che si-RNA della proteina hVAP-33 inibiscono l'associazione delle proteine NS di HCV con le membrane resistenti ai

detergenti; e dominanti negativi della stessa hanno lo stesso risultato, portando inoltre alla riduzione dei livelli di espressione della proteina NS5A e dell'RNA virale in cellule all'interno delle quali replica il replicone di HCV. Trovando inoltre, nello stesso lavoro, l'associazione intrinseca esclusiva di NS4B ai *lipid raft*, anche questi autori ipotizzano un modello nel quale HCV legherebbe le hVAP attraverso NS5A ed NS5B per formare il complesso di replicazione virale. In questo modello è importante anche NS4B, che come proteina integrale di membrana legherebbe contemporaneamente NS5A ed NS4A per stabilizzare il complesso (Gao L. *et al.*, 2004).

Infine, nel 2005, anche l'isoforma hVAP-B è stata descritta interagire con NS5A ed NS5B; e la sua delezione risulta nella soppressione della replicazione virale. Il “*knockdown*” dell'endogeno VAP-B tramite si-RNA inoltre provoca una diminuzione dei livelli di espressione di NS5B, ma non di NS5A. Questi risultati indicano che anche hVAP-B, così come hVAP-A è una parte importante del complesso di replicazione virale, portando a formulare un modello molto simile a quello già proposto da Gao L. e collaboratori un anno prima (Fig.1.10) (Hamamoti I. *et al.*, 2005).

### 1.7 Stress del reticolo endoplasmatico (ER Stress)

Se vogliamo definire in generale uno stress, possiamo dire che “lo stress è la risposta di un sistema a qualunque perturbazione del suo normale stato” (Schröder M. e Kaufman R.J., 2005). Nelle cellule eucariotiche il reticolo endoplasmatico (ER) è il primo compartimento nella via secretoria. All'interno di questo organello, che si estende attraverso il citoplasma della cellula ed è contiguo alla membrana nucleare, le proteine vengono sintetizzate, correttamente ripiegate per assumere la giusta conformazione e modificate per renderle infine funzionali. Le proteine ripiegate e modificate correttamente vengono poi traslocate al complesso del Golgi, mentre vengono trattenute nel reticolo quelle non ancora ripiegate correttamente o le proteine che devono essere degradate. L'alterazione di uno qualsiasi di questi processi causa ER stress. La capacità della cellula di sentire, rispondere e risolvere quest'alterazione è essenziale per mantenere appunto il suo “stato normale”, cioè la sua omeostasi (Schröder M. e Kaufman R.J., 2005; Rutkowski D.T. e Kaufman R.J. 2004). Quando la cellula viene esposta ad un qualsiasi stress, una delle conseguenze principali è l'accumulo proprio nel lume del reticolo di proteine non ripiegate correttamente. Proprio

per mantenere la sua omeostasi la cellula attiva due distinte risposte; una è la “*Unfolded Protein Response*”, UPR, la quale porta all’attivazione trascrizionale di geni che codificano per molecole residenti nel reticolo endoplasmatico e che facilitano il corretto ripiegamento delle proteine.

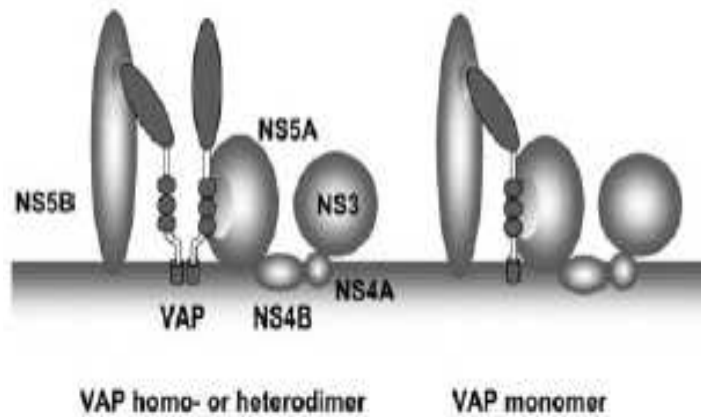


Figura 1.10:

Modello di interazione fra le proteina NS di HCV e le proteine VAP proposto da Hamamoto I. e collaboratori

Le proteine VAP possono interagire con le proteine non strutturali di HCV attraverso la formazione di monomeri o dimeri. L’interazione avviene attraverso il legame con le due proteine virali NS5A ed NS5B, che interagiscono con la stessa proteina VAP, ma in due regioni diverse. NS4B può associarsi invece con i lipid raft ed interagire direttamente con NS5A.

Probabilmente queste interazioni permettono la formazione del complesso di replicazione di HCV e la sua associazione alle membrane del reticolo.

(Hamamoto I. *et al.*, 2005)

Queste molecole, chiamate “*chaperoni*”, quali Bip/Grp78 e Grp94, favoriscono appunto il giusto ripiegamento delle proteine cercando di tamponare l’aumento di proteine non ripiegate. L’altra risposta è invece una radicale e rapida repressione della sintesi proteica, per evitare che vengano sintetizzate altre proteine e che il reticolo venga sovraccaricato in un momento di difficoltà. La repressione della sintesi proteica avviene in risposta allo stress in cellule di mammifero attraverso l’aumento di fosforilazione di eIF2 $\alpha$ . eIF2 $\alpha$  fosforilato interferisce con la formazione del complesso di inizio traduzione bloccando la traduzione stessa. Nelle

condizioni di ER stress eIF2 $\alpha$  viene fosforilato da PKR e PEK/PERK, come vedremo in seguito, reprimendo la sintesi. La fosforilazione di eIF2 $\alpha$  è la sola via nota che regola la soppressione della sintesi proteica in risposta allo stress del reticolo (Iwawaki T. *et al.*, 2001).

L'UPR d'altro canto ha inizio non appena viene compromesso l'equilibrio all'interno del reticolo endoplasmatico. Tre diverse proteine transmembrana residenti nel reticolo sono state identificate come "sensori" della presenza di ER stress: IRE1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ), una chinasi ed endoribonucleasi, la chinasi PERK ed il fattore di trascrizione ATF6 ( $\alpha$  e  $\beta$ ). IRE1 e PERK, attivate in seguito a stress, omodimerizzano, si autofosforilano e quindi si attivano, mentre ATF6 trasloca nel Golgi, dove viene tagliato dalle due proteasi S1P e S2P generando un fattore di trascrizione attivo (Fig.1.11).

L'effetto combinato dell'attivazione di tutte e tre queste molecole comporta una regolazione positiva di geni che codificano per chaperoni e per proteine coinvolte nella degradazione ed una regolazione negativa della sintesi proteica e del conseguente afflusso di proteine nascenti all'interno del reticolo.

L'attivazione di tutti e tre i componenti dell'UPR dipende dalla dissociazione dalle stesse di una quarta molecola, enormemente abbondante nel lume del reticolo, Grp78/Bip (Rutkowski D.T. e Kaufman R.J. 2004 e referenze all'interno). Bip è una ATPasi, membro della famiglia delle "*heat shock 70 protein family*". In cellule non stressate IRE1, ATF6 e PERK sono ritenute nel lume del reticolo da Bip, che si associa al loro dominio luminale. Bip d'altra parte è anche il principale chaperone della cellula, si associa quindi anche con le proteine di nuova sintesi per permetterne il giusto ripiegamento (Zhang K. e Kaufman R.J., 2004). In una cellula non stressata Bip è in continuo equilibrio tra il legame alle proteine da ripiegare ed il legame ai sensori di stress. Se però un qualsiasi stress porta all'aumento delle proteine non ripiegate correttamente, l'equilibrio si sposta, la maggior parte di Bip si trova legato alle proteine che devono essere ripiegate ed i sensori, IRE1, ATF6 e PERK sono liberi e possono attivarsi. Come abbiamo detto IRE1 e PERK sono liberi di omodimerizzare e quindi autofosforilarsi, mentre ATF6 è libero di transitare al complesso del Golgi e lì essere tagliato dalle sue due proteasi. Data l'importanza di Bip nella regolazione dell'attivazione dell'UPR, sembra abbastanza ragionevole che la sua attività possa essere a sua volta regolata dalla modificazione della sua attività ATPasica (Rutkowski D.T. e Kaufman R.J. 2004 e referenze all'interno). A tal proposito è stata identificata una "proteina associata a Bip" (BAP) che



potrebbe stimolare l'idrolisi dell'ATP e quindi modulare il rilascio di Bip in diverse condizioni (Chung K.T. *et al.*, 2002).

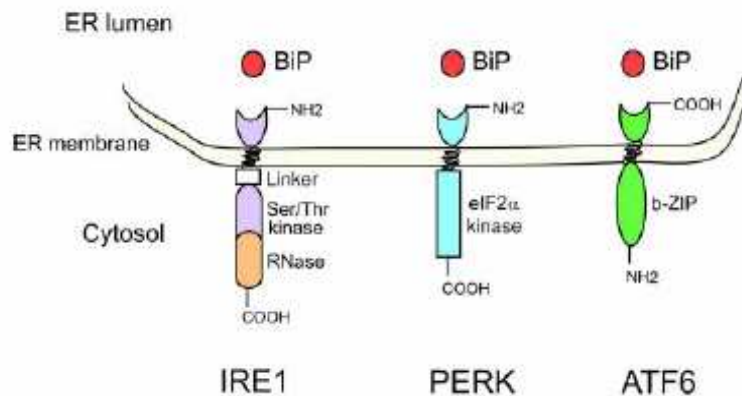


Figura 1.11:

Legame di Bip ai tra sensori transmembrana IRE1, PERK e ATF6

Legando le regioni delle tre proteine all'interno del lume del reticolo la proteina Bip mantiene le proteine legate alla membrana e quindi inattive. (Zhang K. e Kaufman R.J., 2004)

Benchè IRE1, PERK e ATF6 siano tutte attivate simultaneamente dalla dissociazione di Bip, ognuna delle vie da questi attivate è temporalmente distinta. Questo permette che diverse parti della stessa UPR siano regolate ognuna da diverse molecole (Rutkowski D.T. e Kaufman R.J. 2004). Dopo l'esposizione allo stress la via attivata più rapidamente è la repressione della sintesi proteica mediata da PERK (Fig.1.12-B). Poiché eIF2 $\alpha$  è diretto substrato della chinasi, la sua fosforilazione avviene immediatamente e blocca in tempi molto rapidi la traduzione cellulare (Novoa I. *et al.*, 2003).

Anche il taglio proteolitico di ATF6 e quindi la sua attivazione avvengono rapidamente dopo l'avvenuto stress, ma l'espressione dei geni sotto il suo controllo richiede comunque la traslocazione nucleare del suo dominio citoplasmatico attivato, l'induzione della trascrizione e la sintesi, quindi tempi più lunghi. Siccome l'attivazione di ATF6 porta all'induzione di molti geni per chaperoni, quali per esempio lo stesso Bip e Grp94, questo aumenta le capacità del reticolo di ripiegamento delle proteine e quindi il ristabilimento dell'omeostasi. Seguendo il blocco della sintesi operato da

eIF2 $\alpha$  questo può essere visto in un certo modo come il secondo stadio della risposta UPR (Fig.1.12-A) (Okada T. *et al.*, 2002).

Durante l'UPR la trascrizione è anche regolata positivamente da ATF4, un fattore trascrizionale membro della “*cAMP response-element-binding (CREB) family*”. ATF4 richiede per la sua traduzione la fosforilazione di eIF2 $\alpha$ . Questo fattore trascrizionale infatti contiene al suo 5' non-tradotto delle ORF che in condizioni normali non ne permettono la traduzione, ma che in presenza di eIF2 $\alpha$  fosforilato vengono “bypassate” permettendo la produzione di ATF4 (Hardin H.P. *et al.*, 2000a e 2000b). Anche i geni attivati da ATF4 sono importanti per il recupero dell'equilibrio in una cellula colpita da stress.

Anche l'attivazione di IRE1 porta ad induzione trascrizionale, ma il pieno avviamento di questa via avviene comunque successivamente all'attivazione di ATF4 e ATF6. Infatti il substrato di IRE1, l'mRNA di *XBPI*, è espresso solo a livelli molto bassi in cellule non stressate, ed aumenta in conseguenza dello stress del reticolo proprio grazie ad ATF6. Questo comporta un sostanziale ritardo di questa ultima risposta rispetto alle altre due. Avendo a disposizione il suo substrato IRE1 può tagliare per splicing l'mRNA di *XBPI* e portare all'attivazione di tutta una serie di geni. Non si hanno molte informazioni su questi geni, ma certamente comportano un aumento della degradazione di proteine nascenti non ripiegate correttamente presenti all'interno del reticolo (Yoshida H. *et al.*, 2003). La degradazione proteica potrebbe quindi rappresentare il terzo stadio della risposta UPR, seguente al blocco della traduzione ed all'aumento della sintesi di chaperoni (Rutkowski D.T. e Kaufman R.J. 2004) (Fig.1.12).

Come qualsiasi via di traduzione anche la risposta UPR necessita di meccanismi di controllo (“*feedback*”), positivi e negativi, per evitare una iperattivazione o un anticipato spegnimento. Uno dei feedback negativi interessa la via di PERK ed in particolare è mediato da due molecole distinte; GADD34 e p58<sup>IPK</sup>.

GADD34, membro della famiglia di geni indotti da danno al DNA e arresto della crescita cellulare, richiede l'attivazione della chinasi PERK per essere regolato positivamente; molto probabilmente la sua espressione è sotto il controllo di ATF4. GADD34 si associa con la protein fosfatasi-1 (PP1), che defosforila eIF2 $\alpha$ . L'attivazione quindi di GADD34 permette a PP1 di defosforilare eIF2 $\alpha$ , che una volta defosforilato è di nuovo attivo nel permettere la sintesi proteica. Inoltre GADD34 è anche richiesto per l'espressione di numerosi chaperoni in risposta allo stress del reticolo (Rutkowski D.T. e Kaufman R.J. 2004 e referenze all'interno).

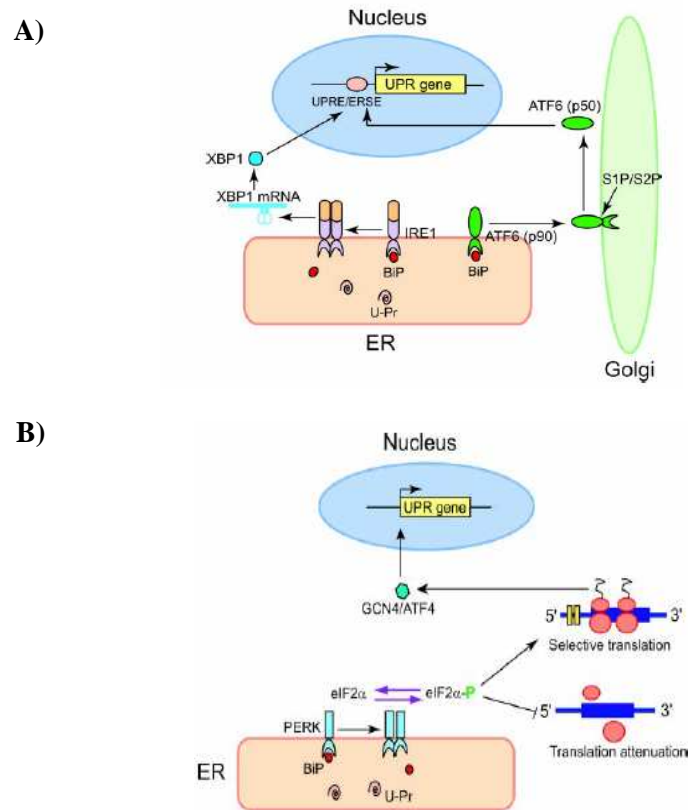


Figura 1.12:

**(A) UPR signaling mediato da IRE1 e ATF6**

ATF6, rilasciato da Bip in seguito all'accumulo di proteine da ripiegare nel reticolo, trasloca al Golgi dove viene tagliato da due proteasi per produrre la molecola attiva ATF6 (p50) che raggiunge il nucleo dove attiva le sequenze ERSE.

IRE1 in seguito al rilascio può dimerizzare e attivarsi. Una volta attiva può tagliare per splicing l'mRNA di *XBP1* e portare all'attivazione di tutta una serie di geni.

**(B) UPR signaling mediato da PERK**

PERK una volta attiva dimerizza e fosforila il fattore di trascrizione eIF2α. Il fattore di trascrizione cellulare una volta fosforilato è inattivo e di conseguenza viene bloccata la traduzione cellulare dipendente dal CAP.

(Zhang K. e Kaufman R.J., 2004)

Anche p58<sup>IPK</sup> viene regolato positivamente in risposta allo stress, ma la sua attivazione è più lenta nel tempo rispetto a quella di GADD34. p58<sup>IPK</sup> interagisce con PERK regolando negativamente la fosforilazione e quindi

l'attività della chinasi cellulare. Vista la sua funzione e la sua tarda attivazione durante l'UPR, si ipotizza che il suo ruolo possa essere quello di porre termine alla risposta UPR quando l'ER stress è stato ormai superato (Rutkowski D.T. e Kaufman R.J. 2004 e referenze all'interno).

Questi meccanismi di controllo negativi sono necessari per l'attenuazione della risposta UPR, d'altro canto meccanismi di controllo positivi sono altrettanto essenziali per permettere che la risposta rimanga attiva ed efficiente finché persiste lo stress. Uno di questi controlli è affidato alla proteina XBP1. La trascrizione di *XBP1* può infatti essere attivata anche dalla stessa proteina XBP1, attivando così un feedback positivo di autoregolazione che mantiene in funzione la risposta attraverso la via di IRE1, anche dopo che le altre due vie, quella di PERK e di ATF6, più rapide, sono state regolate negativamente (Yoshida H. *et al.*, 2001).

In aggiunta a tutto quello che è stato appena descritto, finalizzato a superare l'accumulo di proteine non ripiegate correttamente nel reticolo endoplasmatico e lo stress che ne deriva per la cellula, l'UPR inizia in parallelo l'attivazione di una via di trasduzione proapoptotica, nel caso in cui i tentativi di eliminare la causa che ha provocato lo stress e tornare all'omeostasi falliscano. Una UPR insufficiente comporterebbe l'inizio dell'apoptosi attraverso l'attivazione di JNK, della caspasi-7 e della caspasi-12. Si ritiene quindi che l'apoptosi indotta dallo stress del ER possa coinvolgere entrambe le vie note, quella estrinseca e quella intrinseca e che differenti stimoli di stress possano promuovere differenti pathway apoptotici. Questo fa pensare che lo stimolo di stress sia importante nel determinare come e quando l'apoptosi possa essere indotta (Rutkowski D.T. e Kaufman R.J. 2004 e referenze all'interno).

### 1.7.1 HCV e ER stress

La replicazione di HCV avviene in associazione con le membrane cellulari e, come descritto diverse volte, molto probabilmente vengono coinvolte anche le membrane del reticolo endoplasmatico (Egger D. *et al.*, 2002). Proprio la replicazione del virus distrugge le normali funzioni del reticolo ed induce ER stress (Gong G. *et al.*, 2001; Tardiff K.D. *et al.*, 2002).

Come abbiamo discusso in precedenza la risposta UPR attiva tre diverse vie, necessarie per ristabilire l'omeostasi cellulare.

Per quanto riguarda la via di ATF6, è stato descritto come l'espressione dei geni del virus dell'epatite C causi ER stress con la traslocazione del

dominio citoplasmatico di ATF6 al nucleo. In cellule all'interno delle quali replica il replicone di HCV la forma attiva di ATF6 è quindi presente e funzionale. D'altra parte il pathway di IRE1-XBP1 è anch'esso attivato dalla replicazione virale, ma la forma attiva di XBP1 [XBP1(S)], quella che ha subito il taglio per splicing da parte di IRE1, sebbene presente in quantità elevata, viene repressa. Il blocco dell'attività di XBP1(S) comporta una mancata induzione trascrizionale delle EDEM ("*ER Degradation-Enhancing  $\alpha$ -Mannosidase-like Protein*"), che dipende totalmente ed unicamente dal pathway di IRE1-XBP1. Questa mancata induzione ha come conseguenza la diminuzione della degradazione proteica che avviene attraverso proteine di degradazione associate al reticolo (ERAD). Le EDEM infatti legano direttamente le ERAD provocando un aumento della degradazione, che in assenza di questo legame risulta inibita. La repressione dell'attività di XBP1(S) in cellule che esprimono HCV comporterebbe quindi una non induzione delle EDEM con la conseguente riduzione dell'attività delle ERAD. Questo "difetto" potrebbe facilitare la traduzione di HCV, e questo spiegherebbe perché il virus regoli negativamente questa via di trasduzione (Tardiff K.D. *et al.*, 2004) (Fig.1.13).

Analizzando l'altra via attivata dall'UPR, quella di PERK, è stata descritta l'interazione fra la proteina strutturale di HCV E2 e la chinasi (Pavio N. *et al.*, 2003). Siccome la proteina strutturale E2, così come la proteina non strutturale NS5A, legano entrambe la chinasi PKR (Gale M.J *et al.*, 1997; Taylor D.R. *et al.*, 1999), attivata dal dsRNA, e siccome PKR e PERK mostrano un'elevata omologia (circa il 40% di identità), è stato ipotizzato che anche NS5A possa legare PERK e bloccarne quindi la funzione (Tardif K.D. *et al.*, 2005).

Inoltre recentemente è stato descritto come la proteina virale NS4B induce l'attivazione di ATF6 e di IRE1, ma anche in questo caso l'attivazione trascrizionale delle EDEM, a carico di XBP1(S) viene inibita (Zheng Y. *et al.*, 2005).

### 1.7.2 HCV, ER stress e ROS

In cellule in condizioni non stressanti le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono solitamente in equilibrio con gli antiossidanti, in modo tale da prevenire qualsiasi danno alle cellule stesse. Alle volte però questo equilibrio viene meno, i ROS si accumulano nella cellula e causano stress ossidativo (Halliwell B., 1999). Questo shock ossidativo può essere causato anche dal

rilascio del calcio dal reticolo provocato da stress. Infatti il reticolo endoplasmatico è uno dei maggiori depositi di calcio della cellula.

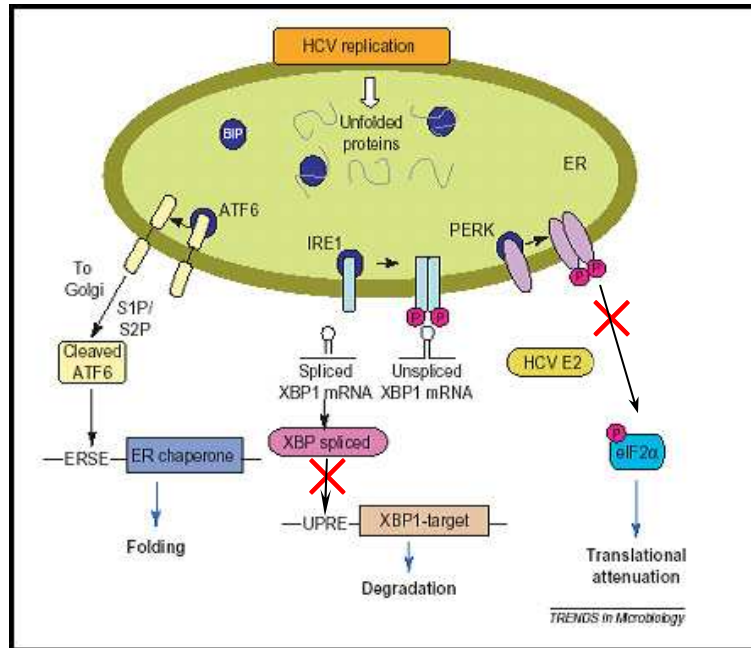


Figura 1.13:

Componenti distinti della risposta UPR e controllo da parte di HCV

La presenza del virus all'interno della cellula attiva la risposta UPR, ma nello stesso tempo la blocca alterando vari stadi. Attraverso la proteina strutturale E2 il virus blocca la fosforilazione e quindi l'inattivazione del fattore di traduzione eIF2α. Inoltre HCV blocca anche l'attività di XBP-1(S) e la seguente attivazione delle sequenze ERSE.

(Tardif H.D. *et al.*, 2005)

Qualunque stress alteri l'equilibrio di questo organello andrà a perturbare anche l'equilibrio osmotico dei depositi di calcio e questo, sotto forma di Ca<sup>2+</sup>, verrà rilasciato dal ER e si accumulerà nella cellula. L'accumulo di Ca<sup>2+</sup>, non bilanciato dagli antiossidanti, porterà ad un aumento dei ROS. Proprio un aumento di ROS ed un ridotto livello di antiossidanti è stato osservato nel fegato di pazienti infettati cronicamente dal virus dell'epatite C (Yadav D. *et al.*, 2002).

Già alcuni anni fa Gong G. e collaboratori avevano descritto come l'espressione della proteina virale NS5A producesse l'alterazione dei livelli di calcio inducendo nella cellula produzione di ROS, stress ossidativo e portando all'attivazione di STAT3 e NF- $\kappa$ B (Gong G. *et al.*, 2001, Waris G. *et al.*, 2002). Waris G. ed i suoi colleghi qualche anno più tardi si sono domandati quale fosse quindi il ruolo di STAT3 nella replicazione di HCV, tenendo presente la sua costitutiva attivazione a causa dello stress ossidativo in cellule all'interno delle quali replica il virus. I risultati di questo studio hanno mostrato il coinvolgimento di p38 MAPK ("p38 *mitogen-activated protein kinase*"), JNK, JAK2 e la chinasi Src nell'attivazione di STAT3; dimostrando che sia la produzione di ROS che l'attivazione di STAT3 contribuiscono a stimolare la replicazione dell'RNA di HCV (Waris G. *et al.*, 2005) (Fig.1.14).

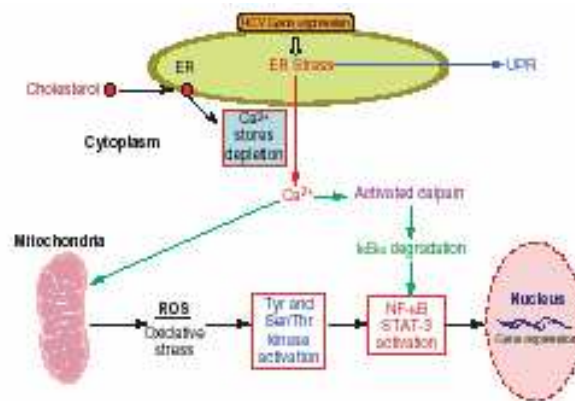


Figura 1.14:

ER stress e stress ossidativo

L'ER stress produce anche uno stress ossidativo nella cellula dove replica il virus dell'epatite C attraverso il rilascio del calcio. Il Ca<sup>2+</sup> rilasciato dal reticolo produce nel mitocondrio formazione e rilascio di ROS. I ROS attivano le Tyr e Ser/Thr chinasi, che a loro volta attivano NF- $\kappa$ B e STAT3.

(Tardif H.D. *et al.*, 2005)

Per concludere poi, è stato descritto come anche la proteina strutturale Core induca ER stress e rilascio di calcio dal reticolo. In cellule dove viene espressa la proteina virale infatti viene trovata una diminuzione dei livelli di

calcio trattenuto nel reticolo con conseguente stress dell'organello stesso. Tutto questo comporta nella cellula induzione di apoptosi con rilascio del citocromo c (Benali-Furet N.L. *et al.*, 2005).



## 2. Scopo del lavoro

Il mio lavoro ha avuto come obiettivo l'analisi proteomica delle interazioni fra la proteina non strutturale 5A del virus dell'epatite C (NS5A) e le proteine della cellula ospite.

Il presente lavoro sperimentale si inserisce in un progetto più ampio che mira a definire in maggior dettaglio la risposta dell'ospite all'infezione da virus dell'epatite C (HCV), con particolare attenzione allo studio della replicazione del virus e alla "clearance" virale mediata dall'interferone- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). In seguito all'isolamento del genoma di HCV nel 1989, molti studi sono stati compiuti al fine di comprendere i meccanismi molecolari alla base del ciclo vitale del virus e della sua capacità di interferire con importanti processi cellulari. Nonostante la molteplicità degli approcci tentati e la grande quantità di dati ottenuti, riassunti nell'introduzione, ancora molte domande rimangono aperte e nuove strategie sperimentali sono necessarie per comprendere i meccanismi d'azione di HCV.

I meccanismi molecolari alla base delle patologie associate con l'infezione da HCV sono ancora in gran parte non caratterizzati. Al fine di comprendere le alterazioni cellulari indotte dall'infezione virale ci si propone di isolare e caratterizzare i complessi proteici che si formano tra proteine cellulari e le proteine di HCV responsabili della replicazione virale. Le proteine così isolate saranno identificate tramite analisi proteomica utilizzando la spettrometria di massa MALDI-ToF-ToF ("*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-/time-of-flight*").

Fino a qualche anno fa il maggior fattore limitante lo studio di HCV è stato l'assenza di un modello cellulare di replicazione. Questa lacuna è stata qualche anno fa colmata grazie alla messa a punto di un sistema che permette la riproduzione degli eventi di replicazione virale *in vitro*. Grazie al lavoro di Bartenschlager R. e collaboratori sono state generate delle molecole, denominate "repliconi", in cui al genoma di HCV, limitato alle sole proteine non strutturali, è stato affiancato il gene per la resistenza all'antibiotico G418 (Neo), sotto il controllo delle regioni regolative della replicazione virale (IRES), per permettere la selezione delle sole cellule che sostengono la replicazione virale e l'IRES del virus dell'encefalomiocardite, che controlla invece la traduzione delle proteine virali.

Al fine di identificare proteine cellulari che interagiscono con la proteina virale NS5A si sono utilizzati due diversi sistemi di purificazione di complessi proteici. In un primo momento, clonando la proteina virale *in*

*frame* con uno specifico *tag* (TAP-*tag*), è stata utilizzata la purificazione messa a punto nel laboratorio di Séraphin B. nota come TAP (“*Tandem Affinity Purification*”). Questa metodologia permette di isolare proteine che interagiscono con una proteina di interesse con una specificità molto elevata. Si basa infatti sulla fusione della proteina nota, nel nostro caso NS5A, non con un unico “*tag*”, ma con due “*tag*”. Il TAP tag consiste infatti di un dominio legante le IgG (proteina A) e di un peptide legante la calmodulina (CBP), separati da un sito di taglio per la proteasi del virus del mosaico del tabacco. Entrambi questi *tag* sono stati selezionati per la loro alta efficienza. Questo permette di eliminare tutte le interazioni non specifiche, potendo contare su due diverse purificazioni sequenziali. Le proteine cellulari che si associano specificamente con la proteina virale verranno identificate su gel monodimensionale di poliacrilammide in presenza di SDS. Le bande proteiche di interesse, rese visibili da colorazione, verranno isolate dal gel ed identificate mediante un metodo analitico estremamente sensibile quale la spettrometria di massa MALDI-ToF-ToF.

Al fine di comprendere a quale scopo NS5A (HCV) interagisce con le proteine cellulari identificate si sono messe poi a punto in cellule all'interno delle quali replica il replicone di HCV analisi di “*RNA Interference*” ed “overespressione” della loro espressione per vedere se “l'aumento” e/o “la diminuzione” di queste altera in qualche modo la replicazione del virus.

Successivamente, per avere una visione più approfondita di quello che avviene effettivamente nelle cellule in cui replica HCV, e per mettere in evidenza le interazioni che intercorrono fra la proteina NS5A e le proteine cellulari nel complesso delle altre proteine virali, si è messo a punto un sistema per inserire direttamente all'interno del replicone dei *tag* specifici da utilizzare poi per una doppia immunoprecipitazione. La tecnica del TAP infatti si basa sull'overespressione della proteina, che non risulta quindi espressa a livelli fisiologici. Questo potrebbe comportare una diversa localizzazione della proteina, e soprattutto potrebbe dar luogo ad artefatti e ad interazioni alterate da un'alterata espressione. Per esprimere la proteina virale NS5A a livelli fisiologici, e soprattutto per poter studiare gli interattori proteici ad essa associati nel complesso replicativo delle proteine non strutturali del virus, noi abbiamo inserito le sequenze che codificano per i due *tag* (Flag e HA) all'interno della sequenza che codifica per la proteina non strutturale 5A nel subgenoma virale. Basandoci su un lavoro di Moradpour D. e collaboratori (Moradpour D. *et al.*, 2004) è stato infatti possibile individuare la porzione di sequenza all'interno della quale inserire i *tag* mantenendo la proteina attiva e funzionale e di conseguenza facendo in

modo di ottenere un replicone che replica ed esprime NS5A fusa con due diversi *tag* (*HA-tag* e *Flag-tag*). Questo permette di avere la proteina di interesse espressa a livelli fisiologici e, come vedremo poi nei risultati, nel complesso delle altre proteine virali. Esprimere NS5A insieme alle altre proteine non strutturali vuol dire permettere la formazione del complesso di replicazione di HCV e quindi poter andare ad analizzare gli interattori cellulari della proteina nel suo reale contesto e nella sua reale funzione.

Anche in questo caso viene poi condotta un'analisi di massa sugli interattori separati su gel monodimensionale di poliacrilammide in presenza di SDS.

Tale ricerca si propone di migliorare la conoscenza sulla biologia del virus e sul suo ciclo vitale ed inoltre potrà eventualmente consentire l'identificazione di nuovi potenziali bersagli terapeutici per lo sviluppo di nuovi specifici composti antivirali.

### 3. Materiali e Metodi

#### 3.1 Chimici e reagenti

NaCl, glicerolo, Igepal CA 630 (NP-40) e 1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT) sono Fluka; n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), NaF, NaV, EDTA, Mg-acetate, imidazolo, CaCl<sub>2</sub>, Protease Inhibitor Cocktail (PIC), glucosio, ammonium bicarbonate, metanolo, acido acetico, acetonitrile, iodoacetamide (IAA), acido trifluoroacetico (TFA) e tunicamicina sono Sigma-Aldrich; acetone e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sono Carlo Erba;  $\beta$ -mercaptoethanol, KCl e Hepes sono MPBiomedicals; Tris base, fenolo/cloroformio/alcool isoamilico ed EGTA sono Usb.

#### 3.2 Procedure per il clonaggio

##### 3.2.1 PCR (reazione a catena della polimerasi)

Lo schema della reazione di PCR è il seguente; in un volume finale di 50  $\mu$ L:

- Buffer (10X) (Stratagene)
- 800  $\mu$ M dNTP totali (200  $\mu$ M per ognuno)
- 0.25  $\mu$ M oligo S
- 0.25  $\mu$ M oligo AS
- 1-5 ng DNA plasmidico
- Pfu Turbo (Stratagene) (Stock 2.5 u/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L; aggiunto dopo la denaturazione (“*Hot Start*”), per evitare che inizi a lavorare appaiandosi in modo aspecifico a basse temperature ed amplificando frammenti non corretti.

Il gene che codifica per la proteina NS5A di HCV è stato amplificato mediante PCR a partire da un plasmide contenente il cDNA dell'intero genoma di HCV.

Il gene che codifica per la proteina Grp78 è stato amplificato da una libreria preparata da cellule di fegato umane.

Per l'amplificazione dei geni descritti nei risultati sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi:

(NS5A TAP S)

5'-CCCAAGCTTATGTCCGGCTCGTGGCTAAGAGATGTTTG-3'

(NS5A TAP AS)

5'-GAAGATCTGCAGACGACGTCCTCACTAGCC-3'

(Grp78 S)

5'-CAGCTCGAGCTGGCAAGATGAAGCTCTCCCTGG-3'

(Grp78 AS)

5'-GCAAGCTTCTACAACATCTTTTTTCTGCTG-3'

3.2.2 Inserimento nel replicone di HCV di un doppio *tag* (HA-Flag) nella sequenza che codifica per la proteina virale NS5A

Nel replicone pHCVneo17.wt (Mottola G. *et al.*, 2002; Murray E.M. *et al.*, 2003) sono stati inseriti due *tag* (*Flag e HA*) all'interno della sequenza che codifica per la proteina NS5A, da utilizzare poi per un esperimento di immunoprecipitazione doppia.

Il *Flag-tag* è stato inserito tramite PCR inversa utilizzando la Pfu Turbo ed i seguenti oligo:

(NS5A Flag S)

5'GACTACAAAGACGATGACGATAAACTTGAGGGGGAGCCGGG  
GGATCCCGAT3'

(NS5A Flag AS)

5'TTTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCACTAGTCAATCGATTGGGG  
GGCATGGAGGAGTACGACTC3'

Il ciclo di PCR utilizzato è il seguente:

94°C 30 secondi

50°C 2 minuti

68°C 20 minuti.

Sono stati fatti 18 cicli.

Il prodotto di PCR viene poi digerito direttamente, senza purificazione ne' precipitazione, con 1 µL di DpnI (*BioLabs*) (digerisce il template metilato) per 2 ore a 37°C e precipitato (come descritto nei prossimi paragrafi) con isopropanolo a -20°C. Dopo aver lavato con abbondante etanolo 70% si risospende in 5 µL di acqua e si trasforma.

Procedere poi con la procedura di estrazione del DNA plasmidico.

Dopo aver recuperato il costrutto si digeriscono 10 µg di DNA purificato in 50 µL con ScaI (*BioLabs*) per linearizzare e creare il sito di inizio per la

trascrizione *in vitro*. Purificato poi con fenolo/cloroformio/alcool isoamilico e precipitato, si risospende in 20 µL di TE (0.5 γ/λ).

Questa PCR permette di inserire all'interno della sequenza che codifica per NS5A il Flag-tag e due siti di restrizione che permetteranno poi il successivo inserimento del secondo tag.

Dopo aver inserito il primo tag, il secondo viene introdotto più semplicemente per taglio con gli enzimi di restrizione introdotti e successiva ligasi. Gli oligo per l'HA-tag vengono appaiati e fosforilati per creare un doppio filamento da utilizzare per la successiva reazione di ligasi.

Oligo utilizzati:

(HA Sticky S)

5'CGAGAATACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTA3'

(HA Sticky AS)

5'CTAGTAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTCT3'

Soluzioni utilizzate:

Tampone per risospendere frammenti di DNA o RNA;

TE 10X:

Tris base pH 7.6 100 mM

EDTA pH 8 10 mM.

Fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (Usb).

### 3.2.3 Annealing e fosforilazione di oligo

Schema di annealing:

20 µg oligoS

20 µg oligoAS

5 µL acqua MQ

5µL buffer di annealing (5X)

Lasciare 5 minuti a 95°C, poi lasciare raffreddare lentamente nel termoblock dove è avvenuta la reazione fino a temperatura ambiente.

Schema di fosforilazione:

1 µL oligo annilati

44 µL acqua MQ

5µL buffer della T4 DNA-ligasi (*BioLabs*)

0.5 µL T4 polynucleotide kinase (*BioLabs*)

Incubare 30 minuti a 37°C e successivamente 20 minuti a 65°C per inattivare l'enzima.

Poi procedere con la reazione di ligasi.

Soluzione utilizzata:

Buffer annealing (1X):

10 mM TRIS-HCl

1 mM EDTA

50 mM NaCl

### 3.2.4 Trascrizione *in vitro* (MEGAscript Protocol) (Promega)

Si parte da un template di DNA all'interno del quale è presente un promotore (fago T7) dal quale inizia la trascrizione. Il plasmide può essere digerito in modo tale da interrompere la trascrizione.

SCHEMA REAZIONE DI TRASCRIZIONE *in vitro*:

ATP solution	2 µL
CTP solution	2 µL
GTP solution	2 µL
UTP solution	2 µL
10X Reactin Buffer	2 µL
Template DNA	1 µg
Enzyme Mix	2 µL
H <sub>2</sub> O nuclease-free fino a	20 µL

Incubare a 37°C per minimo 2-4 ore.

Aggiungere 1 µL di DNasi 1, mischiare bene ed incubare per 15 minuti a 37°C per rimuovere il template.

Aggiungere 115 µL di H<sub>2</sub>O nuclease-free e 15 µL di Ammonium Acetate Stop Solution; mischiare bene.

Aggiungere un volume di fenolo/cloroformio acido (pH5) che toglie il DNA che rimane nella fase acida. Mischiare bene.

Centrifugare per 3 minuti e recuperare il super.

Precipitare con un volume di isopropanolo per RNA lasciando per minimo un'ora a -20°C. Centrifugare per 15 minuti a 4°C e risospingere il pellet in un volume appropriato di H<sub>2</sub>O. Storare a -80°C.

La quantizzazione dell'RNA può esser fatta allo spettrofotometro.

Si può poi controllare l'RNA correndolo su un gel di agarosio-formaldeide.

### 3.2.5 Elettroporazione di RNA in cellule di epatoma umano Huh7 per inserire il replicone

Lavare con PBS le cellule e staccarle in tripsina. Portare le cellule in un falcon ed aggiungere PBS per portare il volume finale a 50 mL. Agitare e centrifugare per 5 minuti a 4°C a 1200 RPM. Filtrare le cellule con filtri da 70 µm (per fermare i gruppi di cellule) e poi contarle. Portare poi il volume dei falcon a 50 mL con PBS e centrifugare come sopra.

Finito il lavaggio, buttare il supernatante e risospendere le cellule nel volume di PBS necessario per avere 2 milioni di cellule in 200 µL (= 10 milioni di cellule per mL). Prendere 200 µL di cellule risospese in PBS ed aggiungerli ad una eppendorf dove si sono preparati 10µg di RNA da trasformare.

#### ELETTROPORAZIONE:

0.35 Volts

10 µF (Capacitanza).

Dare due pulse - Gene Pulser II (BioRad).

Piastrare il numero di cellule desiderato e mettere in selezione.

#### Soluzioni utilizzate:

PBS ( Buffer salino fosfato):

NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM pH 7.4

### 3.2.6 Digestione del DNA con enzimi di restrizione

I frammenti ottenuti per PCR vengono poi controllati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio, purificati con fenolo/cloroformio/alcool isoamilico e precipitati . Dopo aver risospeso in TE 1X, i frammenti di PCR ed i plasmidi sono digeriti con appositi enzimi di restrizione che producono estremità “*sticky*” per permetterne l'appaiamento e la seguente chiusura da parte dell'enzima ligasi.

#### SCHEMA REAZIONE DI DIGESTIONE:

In un volume finale di 50 µL:



- Buffer (10X) (*BioLabs*)
- BSA (100X) (*BioLabs*)
- 5-10 µg di DNA oppure la totalità della reazione di PCR
- Enzima di restrizione (*BioLabs*); le unità per µL da utilizzare dipendono dall'enzima stesso.

Si lascia per 2 ore a 37°C (o a diversa temperatura, dipendente dall'enzima utilizzato) e si corre la digestione su gel d'agarosio.

In alcuni casi potrebbe non essere possibile tagliare il vettore ed il frammento con enzimi che producono estremità compatibili; in questo caso le estremità non compatibili possono essere "appiattite" ("*blunt*") tramite reazione con T4 DNA Polimerasi dopo la digestione.

#### SCHEMA DI REAZIONE DELLA REAZIONE CON T4 DNA POLIMERASI:

- T4 DNA Polimerasi (*BioLabs*) (13000 u/mL) 1-3 unità per µg di DNA
  - 100 µM di ogni nucleotide
  - Buffer (10X) (*BioLabs*) o qualsiasi buffer per gli enzimi di restrizione.
- Incubare a 12°C per 20 minuti e poi a 75°C per 10 minuti per bloccare la reazione.

#### Soluzione utilizzata:

Tampone per risospendere frammenti di DNA o RNA;

#### TE 10X:

Tris base pH 7.6 100 mM

EDTA pH 8 10 mM.

### 3.2.7 Gel di agarosio

L'elettroforesi viene condotta in TAE 1X in apposite camere da corsa (Biorad). Come marcatore di pesi molecolari viene usata una mix commerciale di frammenti a lunghezza nota.

Gel di agarosio: sciogliere la quantità necessaria di agarosio in TAE 1X portandolo ad ebollizione. Quando la temperatura scende sotto i 50°C aggiungere 4 µL di bromuro di etidio (10mg/mL) in 100 mL di gel.

#### Soluzioni utilizzate:

Tampone di corsa per elettroforesi su gel di agarosio;

#### TAE 50X:

Tris base, 242 g  
Acido acetico 100%, 57.1 mL  
EDTA 0.5 M pH 8, 100 mL.

Tampone per caricare DNA su gel d'agarosio e visualizzarne la corsa;

Loading Buffer 6X:

0.25 % blu di bromofenolo  
0.25 % xilene cianolo  
30 % glicerolo.

### 3.2.8 Estrazione del DNA dal gel di agarosio per elettroeluzione

Dopo la corsa su gel d'agarosio, il frammento di interesse, visualizzato alla luce UV, viene prelevato con un bisturi e posto in un tubo da dialisi in presenza di 500  $\mu$ L di BSA 50  $\mu$ g/mL in TE (per prevenire l'adesione del DNA al tubo da dialisi). Il DNA viene fatto migrare fuori dal gel per migrazione elettroforetica e recuperato nel liquido all'interno del tubo.

### 3.2.9 Purificazione del DNA tramite estrazione fenolo/cloroformio/alcool isoamilico e precipitazione

Il DNA viene quindi purificato dalle proteine ed altri composti non polari tramite estrazione con solventi organici aggiungendo un volume di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico. In seguito a centrifugazione in una microcentrifuga a 13.000 RPM per 3 minuti, la fase acquosa (superiore) viene recuperata e sottoposta a precipitazione con alcool aggiungendo in sequenza, 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 5.5, 1  $\mu$ L di glicogeno (20 mg/mL) e 2 volumi e mezzo di etanolo 100% (o un volume di isopropanolo).

Il campione viene posto a  $-80^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti o a  $-20^{\circ}\text{C}$  per 1-2 ore; centrifugato per 10 minuti a 13000 RPM a  $4^{\circ}\text{C}$ , lavato con un volume uguale o maggiore di etanolo al 70% e risospeso in TE 1X alla concentrazione finale di 100 ng/ $\mu$ L.

Fenolo/Cloroformio/Alcool Isoamilico (Usb).

Serve per purificare il DNA dalle proteine e da altri composti non polari. Se ne usa solitamente 1 volume. Deve essere tenuto a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.10 Reazione di ligasi

La seguente procedura viene utilizzata per clonare frammenti di DNA in un vettore di interesse. Il vettore ed il frammento vengono digeriti con appositi enzimi per avere estremità sporgenti compatibili. La reazione viene catalizzata dalla DNA ligasi, che promuove la formazione di legami fosfodiesterici.

#### SCHEMA REAZIONE DI LIGASI:

In un volume finale di 10  $\mu\text{L}$ :

- Buffer (10X) (*BioLabs*)
- 2  $\mu\text{L}$  inserto (100 ng/ $\mu\text{L}$ )
- 1  $\mu\text{L}$  vettore (100 ng/ $\mu\text{L}$ )
- 0.5  $\mu\text{L}$  T4 DNA-ligasi (Stock 400.000 u/mL) (*BioLabs*)

Si prepara anche una reazione di controllo mancante dell'inserto per verificare che il plasmide non si richiuda su se stesso. Si lascia per 4 ore a temperatura ambiente o per tutta la notte a 16°C. La reazione viene precipitata, lavata con etanolo al 70% e risospesa in acqua.

### 3.2.11 Plasmidi utilizzati

pLPCX è un vettore retrovirale che contiene 2 LTR (“*Long Terminal Repeat*”) e la sequenza  $\Psi$ , necessaria per l'incapsidamento del genoma virale, ma non codifica per *gag*, *pol* ed *env*. Se le proteine *gag*, *pol* ed *env* vengono date *in trans*, grazie alle LTR e alla sequenza  $\Psi$  è possibile la formazione di particelle virali difettive. Queste particelle possono entrare nelle cellule, essere retrotrascritte ed integrarsi, dando un'infezione stabile. Non possono però produrre una progenie virale. Una volta all'interno della cellula viene prodotta la proteina di interesse in elevata quantità, grazie alla presenza all'interno del plasmide del gene che la codifica. Codifica inoltre per un gene che conferisce resistenza all'ampicillina e uno che conferisce resistenza alla puromicina (CLONTECH Laboratories, Inc.).

pLBCX: pLPCX modificato come segue; al posto della sequenza che codifica per la resistenza alla puromicina è stata inserita per PCR una sequenza che porta al suo interno un sito di taglio per l'enzima di restrizione BamHI.

pLBCX GFP: pLBCX all'interno del quale è stata clonata la GFP (*Green Fluorescein Protein*), presa dal plasmide pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Inc.) utilizzando i siti di taglio XhoI-NotI.

pBS1479: plasmide che contiene la sequenza TAP-Tag utilizzata negli esperimenti descritti nei risultati. Il frammento TAP-Tag è stato preso dal vettore utilizzando i siti di taglio HindIII-NcoI.

### 3.2.12 Trasformazione di cellule procariotiche competenti per elettroporazione

Cellule procariotiche competenti precedentemente preparate (vedi paragrafo 3.2.15) e conservate a -80°C vengono mischiate con la reazione di ligasi ed elettroporate in un'apposita cuvetta utilizzando un apparecchio Micropulsar della BioRad.

Dopo la trasformazione i batteri vengono risospesi in 500 µL di LB broth ed incubati per 30 minuti a 37°C per favorirne la ripresa. Le cellule vengono quindi piastrate su piastre LB agar contenente ampicillina (100µg/mL) ed incubate a 37°C per tutta la notte.

Un certo numero di colonie cresciute sulla piastra vengono fatte crescere isolatamente in 2 mL di LB broth/antibiotico in agitazione tutta la notte a 37°C.

#### Terreni di crescita utilizzati:

LB Agar (Sigma): sciogliere 35 g in 1 litro d'acqua e autoclavare.

LB Broth (Sigma): sciogliere 20 g in 1 litro d'acqua e autoclavare.

### 3.2.13 Procedura di purificazione del DNA plasmidico su piccola scala (MINI-PREP)

I batteri della coltura notturna vengono centrifugati a 13000RPM per 30 secondi e il supernatante viene aspirato via;

- i batteri vengono risospesi nella soluzione S1;
- si aggiunge la soluzione S2 per la lisi, si agita e
- si aggiunge la soluzione S3, si agita e si lascia in ghiaccio per 5 minuti per far precipitare il DNA ad alto peso molecolare;
- si purifica con fenolo/cloroformio/alcool isoamilico, e si recupera la fase acquosa superiore contenente il DNA;

- si precipita con isopropanolo, centrifugando per 5 minuti a 13000 RPM;
- si lava il pellet con etanolo al 70% e si risospende in acqua più RNasi (50 µg/mL).

Le mini-prep vengono digerite con gli appositi enzimi di restrizione per controllo.

Soluzioni utilizzate:

S1; Tris 50 mM; EDTA 10 mM pH 8; per risospendere i batteri.

S2; NaOH 0.2 M; Sodio dodecil solfato (SDS) 1%; per la lisi. Preparare al momento.

S3; potassio acetato 2.6 M pH 5.2; per allontanare il DNA ad alto peso molecolare. Tenere a 4°C.

### 3.2.14 Procedura di purificazione del DNA plasmidico su larga scala (MAXI-PREP)

Prendere l'LB con i batteri di una delle mini-prep che è risultata positiva, versare il contenuto rimasto nel tubo in una beuta con 200 mL di LB broth più l'antibiotico e lasciare crescere i batteri in agitazione per tutta la notte a 37°C.

Per l'estrazione del DNA si procede con il kit "plasmid maxi-kit" (Nucleobond):

- i batteri della coltura notturna vengono trasferiti in tubi falcon da 50 mL, centrifugati a 5000 RPM per 15 minuti a 4°C, poi viene rimosso il supernatante;
- il pellet batterico viene risospeso in 12 mL di buffer S1 (a cui viene aggiunta l'RNasi);
- si aggiungono 12 mL di buffer S2, e si lascia in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente;
- si aggiungono 12 mL di soluzione S3, e si lascia in incubazione in ghiaccio per 15 minuti, per favorire la precipitazione del DNA genomico, proteine e lisati cellulari;
- si centrifuga la soluzione a 4000 RPM per 30 minuti a 4°C e viene rimosso il supernatante nel quale è contenuto il DNA plasmidico.

L'estrazione del DNA non viene fatta con fenolo/cloroformio/alcool isoamilico, ma vengono usate delle colonne che separano il DNA dal resto dei componenti del supernatante. Le colonne vanno prima equilibrate con 6 mL di buffer N2 ("*equilibration buffer*");

- dopo la centrifugazione si fa passare il supernatante nella colonna, dove rimane “intrappolato” il DNA;
  - si lava la colonna con 16 mL di buffer N3 (per 2 volte), che porta via dalla colonna tutto l’aspecifico;
  - infine si raccoglie il DNA facendo passare nella colonna 15 mL di buffer N5 che eluisce il DNA. La soluzione viene raccolta in tubi falcon;
  - si precipita con 11 mL di isopropanolo, centrifugando per 30 minuti a 11000 RPM, si lava il pellet con 25 mL di etanolo al 70%, ricentrifugando per 20 minuti a 11000 RPM. Poi si risospende il DNA in 500  $\mu$ L d’acqua.
- Dopo aver controllato la concentrazione ( $\mu$ g/ $\mu$ L) tramite lettura allo spettrofotometro ( $A_{260}$ ), le maxi-prep vengono digerite con appositi enzimi di restrizione per controllo.

### 3.2.15 Preparazione cellule procariotiche competenti

Il ceppo di batteri utilizzato è *escherichia coli* TOP10 (Stratagene).

Procedura: i batteri vengono piastrati su una piastra con LB agar senza antibiotico e fatti crescere a 37°C per tutta la notte.

Si prende la singola colonia con una punta sterile, si mette in una falcon contenente 5 mL di LB broth e si fanno crescere a 37°C in agitazione per tutta la notte.

Il giorno seguente la coltura batterica viene diluita 1:100 in 500 mL di LB broth. Si lascia crescere per 3 ore a 37°C, poi tramite lettura spettrofotometrica a 600 nm si controlla la sua densità ottica ( $OD_{600}$ ) che deve avere un valore compreso tra 0.4 – 0.5, densità a cui i batteri sono in crescita esponenziale. Raggiunta la giusta OD le beute con i batteri si mettono in ghiaccio per 30 minuti per bloccarne la crescita.

I batteri vengono quindi centrifugati a 4000 RPM per 30 minuti a 4°C. Il supernatante viene rimosso ed il pellet batterico risospeso nello stesso volume di acqua sterile autoclavata e centrifugato a 4000 RPM per 30 minuti a 4°C. Si rimuove il supernatante e si risospende il pellet batterico in metà volume di acqua sterile autoclavata. Si centrifuga a 4000 RPM per 30 minuti a 4°C. Il supernatante viene rimosso ed i batteri si risospendono in acqua con glicerolo al 10% autoclavato e centrifugato a 4000 RPM per 20 minuti a 4°C. Si toglie il lavaggio e il totale dei batteri si risospende in 3 mL di glicerolo al 10%. Questi vengono poi aliquotati in tubi eppendorf da 1.5 mL sterili (aliquote da 80  $\mu$ L), subito congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

L'efficienza delle cellule competenti così preparate dovrebbe essere intorno a  $10^8 - 10^9$  colonie per  $\mu\text{g}$  di plasmide.

### 3.3 Procedure per l'analisi dell'espressione genica

#### 3.3.1 Estrazione di RNA da cellule

Lavare le cellule con PBS per 2 volte, aggiungere TRIzol Reagent (Invitrogen). Agitare per 5 minuti poi recuperare in eppendorf ed eventualmente congelare a  $-20^\circ\text{C}$ . Aggiungere 0.2 mL di cloroformio per 1 mL di TRIzol ed agitare vigorosamente per 15 secondi. Lasciare 2-3 minuti a RT e poi centrifugare per 15 minuti a 14000RPM a  $4^\circ\text{C}$ . Recuperare la fase acquosa superiore che dovrebbe corrispondere più o meno al 60% e aggiungervi 500  $\mu\text{L}$  di isopropanolo per 1 mL di TRIzol. Agitare e lasciare 10 minuti a RT; poi centrifugare come sopra per 10 minuti. Gettare l'isopropanolo e aggiungere 1 mL di EtOH 75% per 1 mL di TRIzol e vortexare; poi centrifugare come sopra per 5 minuti. Risospendere in un volume variabile di acqua DEPC ( 10-20  $\mu\text{L}$  per piastre da 3.5 cm e 20-30  $\mu\text{L}$  per piastre da 6cm).

Controllare la concentrazione allo spettrofotometro ( $A_{260}$ ).

#### Soluzioni utilizzate:

TRIzol Reagent (Invitrogen)

PBS ( Buffer salino fosfato):

NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  2 mM pH 7.4

$\text{H}_2\text{O}$  DEPC:

1 mL di dietilpirocarbonato in 1 L di acqua.

#### 3.3.2 Trascrizione inversa (Reverse Transcription System – Promega)

Ci permette, partendo da un template di RNA, di retrotrascrivere, grazie ad uno specifico enzima, per generare il cDNA corrispondente.

#### SCHEMA DELLA REAZIONE:

Aggiungere a 2  $\mu\text{g}$  di RNA l'acqua DEPC necessaria e scaldare a  $70^\circ\text{C}$  per 10 minuti poi aggiungere la mix seguente:

MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µL
Reverse Transcription 10X Buffer	2 µL
dNTP Mixture 10 mM	2 µL
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	0.5 µL
AMV Reverse Transcriptase	0.6 µL
Oligo(dT)15 Primer o Random Primers	1 µL
Nuclease-Free Water fino ad un volume finale di	20 µL.

Se si usano gli oligo dT primer incubare per 15 minuti a 42°C, se si usano i Random Primers incubare a RT per 10 minuti e poi a 42°C per 15-45 minuti. Scaldare a 95°C per 5 minuti e incubare per 5 minuti in ghiaccio.

### 3.3.2.1 PCR con GoTaq (Promega)

Oligo utilizzati:

(NS4A S)

5'-GCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTCC-3'

(NS4A AS)

5'-CACTCTTCCATCTCATCGAACTCCCG-3'

(Actina S)

5'-ATGGATGACGATATCGCTGCG-3'

(Actina AS)

5'-ATCTTCATGAGGTAGTCTGTCAGG-3'

#### SCHEMA DELLA REAZIONE:

in un volume totale di 20 µL

Buffer	4 µL
dNTP (mixture 10 mM)	0.4 µL
oligo S (stock 25 pmoli/µL)	0.4 µL
oligo AS (stock 25 pmoli/µL)	0.4 µL
templato (RT)	2 µL
H <sub>2</sub> O	a volume
GoTaq	0.1 µL.

#### CICLO utilizzato per NS4A (HCV) e actina:

3 minuti 95°C

30 cicli:

15 secondi 95°C



30 secondi 60°C  
30 secondi 72°C  
poi 72°C per 10 minuti.

### 3.3.3 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE)

Per questa metodica viene utilizzato un gel discontinuo di poliacrilammide, costituito da due parti: un “*resolving gel*”, che può essere a diverse percentuali di poliacrilammide a seconda della taglia delle proteine da analizzare e uno “*stacking gel*” al 5%.

Come marcatore di peso molecolare viene impiegato una miscela commerciale di proteine a peso molecolare noto. La corsa elettroforetica viene eseguita ad un voltaggio costante (100-150 Volts) con un apparecchio “mini trans-blot” della BioRad .

#### Gel di poliacrilammide:

Il “*resolving gel*” é composto da:

una soluzione di acrilammide e bis-acrilammide a concentrazione desiderata (a partire da una soluzione stock di 30% ), un tampone Tris 375mM a pH 8.8, SDS allo 0.1%. Per ottenere la polimerizzazione, si aggiungono persolfato di ammonio allo 0.1% e TEMED (N,N,N',N-tetrametiletilenediamina) (Sigma) 0.04 %.

Lo “*stacking gel*” é composto da:

acrilammide mix al 5%, un tampone Tris 125mM a pH 6.8, SDS allo 0.1%.

Marcatore di peso molecolare: miscela commerciale (Invitrogen) di proteine a peso molecolare noto (176.5kD, 113.7kD, 80.9kD, 63.8kD, 49.5kD, 37.4kD, 26.0kD, 19.6kD, 14.9kD, 8.4kD).

#### Soluzioni utilizzate:

##### Laemmli Buffer 1X:

Tris- HCl 62.5 mM pH 6.8

Glicerolo 10%

SDS 2%

Blu di bromofenolo 0.05%

β-mercapto 5%.

La presenza del detergente anionico SDS legandosi alle proteine le carica negativamente e ne permette la corsa su gel di poliacrilammide secondo la massa.

Running Buffer 1X per un litro:

Tris base 25 mM

Glicina 250 mM

SDS 0.1%;

utilizzato per la corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide.

### 3.3.4 Saggio Bradford per determinare la concentrazione proteica di un campione

Questo saggio permette di determinare, prendendo come riferimento una curva standard di BSA, la concentrazione di proteine totali presenti in un campione.

Standard BSA: preparare una curva standard di BSA.

Portare tutti i campioni ad un volume finale di 800  $\mu\text{L}$  con acqua, aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di "Protein Assay" (Biorad) (5X) ed agitare subito.

Campioni da analizzare: in un tubo mettere un volume noto del campione. Portare ad un volume finale di 800  $\mu\text{L}$  con acqua, aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di soluzione ed agitare subito.

Leggere la concentrazione allo spettrofotometro. Leggere a 600 nm.

Calcolare i  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (concentrazione) di proteine nel campione tenendo conto delle diluizioni.

Soluzioni utilizzate:

Protein Assay solution (5X) (Biorad)

BSA (10mg/mL) (*BioLabs*)

### 3.3.5 Western Blot (WB)

Per il trasferimento si utilizza un apparecchio per blot "semidry" (BioRad): sull'apparecchio vengono messi in sequenza tre fogli di carta assorbente, un filtro di nitrocellulosa, il gel dal quale viene tolto lo "stacking" ed altri tre fogli di carta assorbente. Tutto viene bagnato con Transfer Buffer. Il trasferimento viene eseguito ad un voltaggio costante (15 Volt) per un tempo di circa 30 minuti per filtro. Dopo il trasferimento il filtro

di nitrocellulosa viene immerso in una soluzione di PONCEAU S (Sigma) allo 0.1% in acido acetico al 5%, che colora le proteine su filtro per controllare che il trasferimento sia avvenuto. La colorazione si rimuove sciacquando il filtro con acqua distillata. Il filtro viene messo per 1 ora in una soluzione di bloccaggio che previene l'adesione aspecifica dell'anticorpo al filtro e che è composta da latte senza grassi al 5% in buffer TBST. Il filtro viene poi incubato con l'anticorpo primario diluito in latte al 5% in TBST (la diluizione varia per ogni anticorpo) in agitazione ad una temperatura di 4°C per tutta la notte oppure per 1 ora a temperatura ambiente. Si eseguono quindi 3 lavaggi con TBST di 10 minuti ciascuno. Il filtro viene quindi incubato con l'anticorpo secondario diluito in latte al 5% in TBST (la diluizione varia per ogni anticorpo). Il filtro viene lasciato in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente e quindi lavato con TBST come descritto sopra. Dopo i lavaggi, sul filtro viene messa per 5 minuti una soluzione commerciale (ECLplus Amersham Biosciences) per la reazione di chemiluminescenza; questa operazione va' eseguita al buio. Il filtro viene poi messo in una cassetta da esposizione con una lastra fotografica (Amersham).

Soluzioni utilizzate:

Transfer Buffer 1X per un litro:

Tris base 48 mM

Glicina 39 mM

SDS 0.037% (V/V)

Metanolo 20% (da aggiungere al momento dell'uso);

utilizzato per il trasferimento delle proteine da gel di poliacrilammide a membrana di nitrocellulosa.

TBS (Tris-Buffer salino) (10X) per un litro :

Tris base 0.2 M

NaCl 1.4 M pH 7.6

TBST : TBS al quale viene aggiunto Tween-20 diluito 1/1000.

### 3.3.6 Immunofluorescenza indiretta (IF)

Le cellule da analizzare vengono lavate per tre volte con PBS e fissate con paraformaldeide (PAF) al 4% in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente. Vengono quindi lavate con PBS e permeabilizzate con Triton allo 0.2% in PBS per 5 minuti. Dopo ulteriori lavaggi in PBS le cellule vengono

incubate con l'anticorpo primario (specifico per la proteina di interesse) diluito in 3% BSA (albumina bovina) (Sigma) in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. Al termine si effettuano tre lavaggi con PBS. Le cellule vengono quindi incubate con l'anticorpo secondario diluito in 3% BSA in PBS che riconosce la porzione costante dell'anticorpo primario, ed è coniugato covalentemente ad un composto fluorescente. Dopo un'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente le cellule vengono lavate con PBS e incubate per 3 minuti a temperatura ambiente con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo\*2HCl) (1:5000 in PBS) che serve ad evidenziare il DNA. Al termine, sulle cellule viene posta una soluzione di glicerolo al 70% in PBS, posizionato un vetrino coprioggetto e analizzate ad un microscopio a fluorescenza (Nikon).

Soluzione utilizzata:

PBS ( Buffer salino fosfato):

NaCl 137 mM

KCl 2.7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM

KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM pH 7.4

### 3.3.7 Immunoprecipitazione (IP)

Le cellule vengono lavate con PBS e poi staccate con tripsina. Recuperate in una provetta, precipitate tramite centrifugazione e lavate una seconda volta con PBS. Dopo averle nuovamente centrifugate le cellule vengono risospese in un buffer ipotonico ed incubate per 20 minuti a 4°C in agitazione. Dopo l'incubazione le cellule vengono "rotte" tramite un omogenizzatore "potter" (50 pestellate) e centrifugate a 4°C a 900g. Da questa prima centrifugata si ottiene un super (S9-1) ed un piccolo pellet (P9-1). Questo pellet viene risospeso nel buffer ipotonico, lisato tramite omogenizzatore come sopra e centrifugato nuovamente a 900g. Da questa seconda centrifugata si ottiene un secondo super (S9-2) che viene unito al precedente (S9-1) ed un secondo pellet (P9-2) che rappresenta i nuclei. I due super uniti (S9-1+2) vengono centrifugati a 15000g a 4°C per separare la frazione citoplasmatica, i super (S15), e la frazione delle membrane, il pellet (P15) (Hardy R.W. *et al.*, 2003). La frazione P15 viene quindi incubata con una soluzione di lisi, alla quale vengono aggiunti al momento dell'uso gli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi, per 1 ora a 4°C in agitazione. Quindi

centrifugare a 13000 RPM per 10 minuti a 4°C per rimuovere i residui cellulari non solubilizzati. Si recupera il supernatante e per avere un controllo degli estratti totali da utilizzare per Western blot, dopo centrifugazione, 50 µL del lisato vengono tenuti da parte. Gli estratti proteici vengono incubati con l'anticorpo che lega il Flag-tag (Sigma-Aldrich) legato ad una resina (agarosio), lavato 3 volte con glicina 0.1M e 3 volte con il buffer di lisi senza inibitori, per tutta la notte. Al termine dell'incubazione la resina viene recuperata tramite centrifugazione (5 minuti a 2.500RPM a 4°C) e si procede con 4 lavaggi con il "wash buffer".

A questo punto si elimina dalla resina tutto il buffer, portando a secco la resina e si procede alla prima eluizione. Si aggiungono alla resina 250µL di wash buffer e il Flag-peptide (Sigma-Aldrich) ad una concentrazione finale di 150 ng/µL. Si incuba in agitazione a 4°C per 30 minuti e poi si recupera l'eluato. Si procede nel seguente modo per due eluizioni consecutive. I due eluati vengono poi uniti insieme per procedere al secondo legame con l'anticorpo anti-HA coniugato ad una resina di agarosio (Sigma-Aldrich). L'anticorpo prima di essere utilizzato viene lavato 3 volte con il wash buffer. Questa seconda incubazione che permette il legame dell'anticorpo con il secondo tag (HA) avviene a 4°C, in agitazione, per 3 ore circa. Al termine del legame i complessi proteici coniugati con la resina vengono lavati per 4 volte come sopra.

A questo punto si elimina dalla resina tutto il buffer, portando a secco la resina e si procede alla prima eluizione. Si aggiungono alla resina 50µL di wash buffer e l'HA-peptide (Sigma-Aldrich) ad una concentrazione finale di 150 ng/µL.

Si incuba in agitazione a 4°C per 30 minuti e poi si recupera l'eluato. Si procede nel seguente modo per due eluizioni consecutive.

Negli esperimenti descritti nella parte sperimentale si sono condotti quattro esperimenti indipendenti e gli eluati finali sono stati uniti per ottenere una quantità maggiore di proteine da analizzare.

Soluzioni utilizzate:

Buffer ipotonico;

10 mM Tris-HCl pH8

10 mM NaCl

Buffer di lisi;

10 mM Tris-HCl pH8

150 mM NaCl

10% Glicerolo

1% n-Dodecil- $\beta$ -D-maltoside

Viene utilizzato per la lisi dopo l'aggiunta degli inibitori.

Wash Buffer;

10 mM Tris-HCl pH8

150 mM NaCl

0.5% n-Dodecil- $\beta$ -D-maltoside

“Protease inhibitor cocktail” (Sigma): lo stock contiene Aprotinina (0.08 mM), AEBSF (104 mM), Bestatina (3.6 mM), E-64 (1.4 mM) e Leupeptina (2.1 mM). Solitamente 1 mL è raccomandato per l'inibizione dell'attività proteasica trovata in 100 mL di lisato cellulare ottenuto da 20 g di fegato bovino o in 10 mL di lisato cellulare ottenuto da cellule CHO ad una densità di  $10^8$  cellule per mL.

Altri inibitori:

NaF; inibitore delle fosfatasi. Stock 1M (50X).

NaV; inibitore delle fosfatasi. Stock 100 mM (1000X).

PMSF; inibitore delle proteasi. Stock 100 mM (100X).

Tutti gli inibitori vanno tenuti a  $-20^{\circ}\text{C}$  ed aggiunti al momento dell'uso.

### 3.3.8 “Tandem Affinity Purification System” (TAP)

Al fine di identificare complessi tra proteine virali e proteine cellulari è stato messo a punto un metodo di identificazione di interattori proteici descritto per la prima volta da Séraphin B. e collaboratori nel 1999 (Rigaut G. *et al.*, 1999); la “*Tandem Affinity Purification*” (TAP). Questa metodologia permette di isolare proteine che interagiscono con una proteina di interesse con elevata specificità. Si basa infatti sulla fusione della proteina nota, nel nostro caso le proteine virali, non con un unico “*tag*”, ma con due “*tag*”. Il TAP tag consiste infatti di un dominio legante le IgG (proteina A) e di un peptide legante la calmodulina (CBP), separati da un sito di taglio per la proteasi del virus del mosaico del tabacco. Entrambi questi *tag* sono stati selezionati per la loro alta efficienza. Questo permette di eliminare tutte le interazioni non specifiche, potendo contare su due diverse purificazioni sequenziali (Fig.3.1). Si può partire da un numero variabile di cellule e quindi di proteine totali.

Per circa 3 mg/mL (6 piastre da 15cm); lisare le cellule con 5mL di buffer di lisi freddo, per avere alla fine circa 7.5 mL totali. Lasciare a lisare a  $4^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti in agitazione. Centrifugare per 20 minuti a 8000RPM (megacentrifuga)  $4^{\circ}\text{C}$ .

1° step di purificazione; aggiungere al lisato 200  $\mu$ L di IgG coniugate con biglie di sefarosio precedentemente lavate con il buffer IPP150 ed incubare 4 ore a 4°C in agitazione. Poi centrifugare a 1200RPM per uno/due minuti e levare il super. Lavare le biglie recuperate più volte con il buffer IPP150 e poi una/due volte con il TEV cleavage buffer .

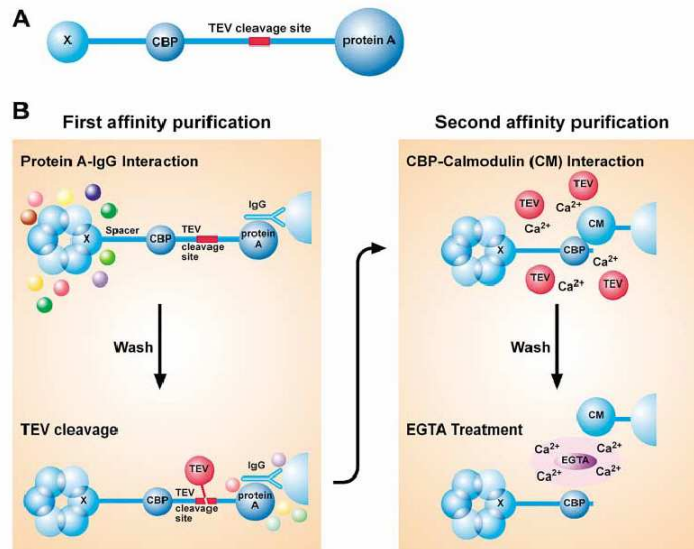


Figura 3.1:

Schema della purificazione tramite TAP (“Tandem Affinity Purification”)

(A) X; proteina di interesse, nel nostro caso NS5A (HCV).

CBP; peptide legante la calmodulina (“*Calmodulin Binding Peptide*”).

TEV Cleavage Site; sito di taglio specifico per la proteasi del virus del Tabacco.

(B) La purificazione di complessi proteici tramite TAP permette due diverse purificazioni consecutive. La prima purificazione sfrutta il legame fra la proteina A e le IgG, mentre il secondo legame avviene fra il CBP (“*Calmodulin Binding Peptide*”) e la calmodulina. L’utilizzo dei due tag in modo sequenziale è reso possibile dalla presenza fra questi di una sequenza TEV, substrato specifico della proteasi del virus del Tabacco.

Taglio TEV; dopo aver portato le biglie a secco, risospingere in 500  $\mu$ L di TEV cleavage buffer ed aggiungere 50 unità di “TEV protease”. Incubare O.N. a 4°C in agitazione.

Il mattino seguente recuperare il super completamente dopo aver centrifugato 10 minuti a 4°C 13000 RPM. Lavare con 500µL le biglie ed unire al super recuperato precedentemente.

2° step di purificazione; aggiungere al lisato 3 volumi di *Calmodulin Binding Buffer* e 3µL di CaCl<sub>2</sub> 1M per mL di soluzione. Incubare 1 mL alla volta con 50 µL di Calmodulina coniugata a biglie di sefarosio, precedentemente lavate, per 1-2 ore a 4°C in agitazione (ogni volta centrifugare, buttare il super ed aggiungere alle beads altro lisato). Poi recuperare le biglie centrifugando per 5 minuti a 4°C 2500RPM. Lavare più volte con lo stesso buffer e poi eluire.

Eluizione; eluire in due frazioni con 50µL di *Calmodulin Elution Buffer*; lasciare 5 minuti a RT e poi recuperare l'eluato. Mantenere le biglie a secco a -20°C.

Soluzioni utilizzate:

Buffer di lisi;

10 mM Tris-HCl pH8

150 mM NaCl

10% Glicerolo

1% NP-40

IPP150

10 mM Tris-HCl pH8

150 mM NaCl

0.5% NP-40

TEV cleavage buffer

10 mM Tris-HCl pH8

150 mM NaCl

0.5% NP-40

0.5mM EDTA pH8

1 mM DTT (prima dell'uso)

IPP150 Calmodulin binding buffer

10 mM β-mercaptoetanol

10 mM Tris-HCl pH8

150 mM NaCl

1 mM Mg-acetato

1 mM imidazolo

2 mM CaCl<sub>2</sub>

0.5% NP-40

IPP150 Calmodulin elution buffer



10 mM  $\beta$ -mercaptofenolo  
10 mM Tris-HCl pH8  
150 mM NaCl  
1 mM Mg-acetato  
1 mM imidazolo  
2 mM EGTA  
0.5% NP-40  
TEV (Tobacco Etch Mosaic Virus) (Invitrogen):  
Stock 10u/ $\mu$ L

### 3.3.9 Infezione virale

Il gene di interesse viene clonato all'interno di un vettore retrovirale (come descritto nei precedenti paragrafi) che viene successivamente trasfettato in cellule particolari (cellule "*packaging*" 293gp) che esprimono stabilmente i geni per le proteine virali *gag* e *pol* necessari per la formazione delle particelle virali. Se la proteina virale *env*, anch'essa necessaria per la formazione delle particelle virali, viene data *in trans* tramite coinfezione, poiché il plasmide retrovirale contiene le due LTR e la sequenza  $\Psi$  di incapsidamento, vengono a formarsi nuove particelle virali, che sono però difettive. L'essere difettive fa sì che queste possano entrare nelle cellule, essere retrotrascritte ed integrarsi, dando un'infezione stabile. Non possono però produrre una progenie virale. Una volta all'interno della cellula viene prodotta la proteina di interesse in elevata quantità, grazie alla presenza all'interno del plasmide del gene che la codifica.

TRASFEZIONE DELLE 293gp PER L'INFEZIONE: come controllo positivo si usa di solito un plasmide che codifica per la GFP (*Green Fluorescein Protein*), così prima di recuperare il virus si può controllare se le cellule esprimono la GFP e quante cellule sono positive. Come controllo negativo si trasfetta solo il plasmide che codifica per *env*.

Procedura: mettere in un tubo da 1.5 mL 15  $\mu$ g di plasmide retrovirale che codifica per la proteina di interesse e 5  $\mu$ g di plasmide che codifica per la proteina del rivestimento lipidico (di VSV, Virus della stomatite vescicolare). Portare ad un volume finale di 440  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O autoclavata ed aggiungere 60  $\mu$ L di CaCl<sub>2</sub> (2 M).

Mettere HBS 2X in tubi da 5 mL (500  $\mu$ L per tubo).

Prima di unire le 2 soluzioni aggiungere alle piastre cloroquina 100 mM (4000X) che facilita l'ingresso dei precipitati nelle cellule, poi prendere il

contenuto del tubo da 1.5 mL e lasciare cadere goccia a goccia nel tubo dell' HBS dove con una pipetta si formano delle bolle. Aggiungere il precipitato alle piastre. Fra l'aggiunta della cloroquina alle cellule e l'aggiunta del precipitato alle piastre non dovrebbero passare più di due minuti.

Dopo un minimo di otto ore si cambia il terreno alle cellule. Dopo aver cambiato il terreno si lasciano le cellule ad incubare per un giorno ed il secondo giorno si raccoglie il virus nel supernatante.

I virus sono difettivi, perciò entrano nelle cellule, retrotrascrivono e si integrano. Non producono però una progenie virale.

Al supernatante recuperato si aggiungono:

- 10% FBS (Sigma),

- polibrene 4 mg/mL (1000X ), che facilita l'ingresso del virus nelle cellule. Mischiare. Filtrare con filtri da 0.45 µm che permettono il passaggio del virus, ma non dei batteri e di frammenti cellulari.

Aggiungere alle piastre 1-2 mL di virus per ciascuna piastra da 3.5 cm. Lasciare 1 piastra senza virus per controllo.

Cellule utilizzate:

Cellule 293gp (“*packaging*”)

### 3.3.10 Colorazione gel di poliacrilammide con Sypro Ruby TM

Dopo aver corso il gel fissarlo per 1 ora in: CH<sub>3</sub>OH 10% e CH<sub>3</sub>COOH 7%; lasciarlo minimo quattro ore (o l'intera notte) a colorare, possibilmente al buio, in agitazione a temperatura ambiente. Finita la colorazione si controlla il gel sugli UV. Se si è colorato si procede con due lavaggi da 30 minuti l'uno con la stessa soluzione del fissaggio e poi con due lavaggi di qualche minuto in acqua.

A questo punto il gel è pronto per essere esaminato.

Il gel può, in caso si decolori, essere ricolorato o anche essere colorato successivamente con coomassie.

Soluzione utilizzata:

Colorante Sypro Ruby TM (BioRad): è già pronto per l'uso. Colorante luminescente molto sensibile per la colorazione di proteine separate su gel di poliacrilammide per elettroforesi. La sua sensibilità (circa 10 ng) è paragonabile a quella della colorazione con AgNO<sub>3</sub> , ma il suo utilizzo è molto più semplice. Conservare a temperatura ambiente.

### 3.3.11 “*Small Interference RNA*” (si-RNA)

Gli oligonucleotidi utilizzati per gli esperimenti di interference descritti nella parte sperimentale di questo lavoro sono stati disegnati dalla ditta Invitrogen e sono i seguenti:

- UUCAAAUUUGGCCCGAGUCAGGGUC (1S),
- GACCCUGACUCGGGCCAAAUUUGAA (1AS),
- UACCCUUGUCUUCAGCUGUCACUCG (2S),
- CGAGUGACAGCUGAAGACAAGGGUA (2AS).

La trasfezione di questi oligo e dell'oligo usato come controllo è preformata seguendo il protocollo della Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen).

I campioni vengono trattati o recuperati in genere 24-48 ore dopo la trasfezione.

### 3.4 Cellule utilizzate

Cellule Huh7: cellule di epatoma umano.

Cellule Rep60: cellule Huh7 all'interno delle quali è presente il replicone di HCV. Sono tenute in continua selezione con l'antibiotico G418 perché il replicone codifica per una proteina, la neomicina fosfotrasferasi, che conferisce alle cellule nelle quali si replica resistenza alla G418.

Cellule Rep60 (5A HA-Flag): cellule Rep60 che presentano all'interno della sequenza che codifica per la proteina virale NS5A due sequenze *tag* (HA-Flag). Queste cellule esprimono quindi una proteina NS5A fusa con due diversi *tag* presenti al suo interno. Sono tenute in continua selezione con l'antibiotico G418.

Cellule 293gp (“*packaging*”): sono cellule di rene umano che contengono stabilmente plasmidi che producono le proteine virali *gag* e *pol*, necessarie per l'impacchettamento della particella virale, ma non per *env* che solitamente viene data *in trans*. Sono cellule molto delicate; vengono usate per produrre particelle virali da utilizzare poi per l'infezione.

#### 3.4.1 Terreni di coltura e soluzioni utilizzate per mantenere le cellule in coltura

“Dulbecco’s modified eagle medium” (Sigma-Aldrich): terreno utilizzato per mantenere in linea cellule Cos7, cellule Huh7 e cellule 293gp. Al terreno si aggiunge il siero FBS (“Fetal Bovine Serum”) (Sigma) al 10%, gli antibiotici penicillina (5000 u/mL) e streptomina (5000 µg/mL) all’1% (Gibco BRL) e la L-glutamina 200 mM all’1% (Gibco BRL). Il terreno viene cambiato ogni 2-3 giorni.

G418 (Gibco BRL): antibiotico utilizzato per tenere in selezione le cellule che supportano la replicazione del replicone di HCV al loro interno. Il replicone infatti codifica per una proteina, la neomicina fosfotrasferasi, che conferisce alle cellule nelle quali si replica resistenza all’antibiotico. Stock 0.6 mg/µL (1000X).

Tripsina-EDTA (1X) in HBSS senza calcio e magnesio (Sigma-Aldrich).

### 3.5 Anticorpi utilizzati

Anti-HCV NS5A (Biodesign International): anticorpo monoclonale che riconosce la proteina virale NS5A. Si utilizzano le seguenti diluizioni: 1:1000 per WB; 1:200 per IF.

Anti-Grp78 C-20 (Santa Cruz): anticorpo monoclonale che riconosce la regione C-terminale della proteina Grp78 (Bip). Si utilizzano le seguenti diluizioni: 1:1000 per WB.

Anti-BIN1 99-D (Santa Cruz): anticorpo monoclonale che riconosce la proteina BIN1 (varianti di splicing 1-10). Si utilizzano le seguenti diluizioni: 1:500 per WB

Anti-HCV NS3 (Anogen): anticorpo monoclonale che riconosce la proteina virale NS3 (Clone number 133). Stock concentrato 0.2 µg/µL. Si utilizzano le seguenti diluizioni: 1:200 per WB.

Anti-α-tubulina (Sigma-Aldrich): anticorpo monoclonale che riconosce la tubulina, proteina costitutivamente espressa nella cellula. Viene utilizzato per normalizzazione. Si utilizza la seguente diluizione: 1:5000 per WB.

Anti-c-HA (Roche): anticorpo monoclonale ottenuto da topi immunizzati con una piccola sequenza aminoacidica della proteina HA umana; la soluzione stock è concentrata 0.4 mg/mL. Si utilizzano le seguenti diluizioni: 1:100 per WB.

Anti-Flag M2 (Sigma): anticorpo monoclonale che riconosce la regione N-terminale della sequenza Flag. La soluzione stock è concentrata 4 mg/mL. Si utilizzano le seguenti diluizioni: 1:4000 per WB.

Anti-mouse-peroxidase (Jackson ImmunoResearch): anticorpo policlonale che riconosce la porzione costante della catena pesante delle IgG, è coniugato con l'enzima perossidasi (POX). E' ottenuto da topi immunizzati; la soluzione stock è concentrata 1 mg/mL. Si utilizza diluito 1:5000 come anticorpo secondario per il WB.

Anti-goat-peroxidase (Jackson ImmunoResearch): anticorpo policlonale che riconosce la porzione costante della catena pesante delle IgG, è coniugato con l'enzima perossidasi (POX). E' ottenuto da capre immunizzate; la soluzione stock è concentrata 0.8 mg/mL. Si utilizza diluito 1:5000 come anticorpo secondario per il WB.

Anti-mouse-fluorescein (Jackson ImmunoResearch): anticorpo policlonale che riconosce la porzione costante della catena pesante delle IgG, è coniugato con la fluorescina (FITC). E' ottenuto da topi immunizzati; la soluzione stock è concentrata 1.4 mg/mL. Si utilizza diluito 1:500 come anticorpo secondario per l'IF.

Anti-mouse-Cy3 (Jackson ImmunoResearch): anticorpo policlonale che riconosce la porzione costante della catena pesante delle IgG, è coniugato con la cianina 3 (Cy3). E' ottenuto da topi immunizzati; la soluzione stock è concentrata 1.4 mg/mL. Si utilizza diluito 1:200 come anticorpo secondario per l'IF.

### 3.6 Proteomica

Il termine "*proteoma*" venne utilizzato per la prima volta nel 1995 per definire la totalità delle proteine presenti in un organismo in analogia al termine *genoma* che definisce la totalità dei geni. Il proteoma è altamente dinamico e dipende da un vasto numero di fattori che influenzano la cellula. La "*proteomica*" è lo studio e la caratterizzazione del proteoma e di tutte le sue modificazioni quantitative e qualitative (post-traduzionali) (Graves P.R. e Haystead T.A.J, 2002).

Il primo studio nel campo della proteomica risale al 1975, quando con l'introduzione del gel bi-dimensionale (2D-gel), O'Farrell iniziò a mappare le proteine di *escherichia coli* (O'Farrell P.H., 1975). Benché molte proteine furono separate ed analizzate, non si riuscì ad identificarle. I limiti tecnici erano allora enormi, attualmente invece si sono fatti molti passi avanti e le nuove tecnologie permettono di identificare proteine dell'ordine delle femtomoli.

La proteomica permette inoltre di ottenere molte informazioni che non si possono ottenere dallo studio del genoma e di poter identificare:

- variazioni quantitative nell'espressione proteica,
- proteine di nuova sintesi,
- modificazioni post-traduzionali,
- degradazione di proteine.

Un tipico esperimento di proteomica può essere suddiviso in:

- separazione ed isolamento di proteine;
- acquisizione di informazioni sulla composizione peptidica della proteina;
- utilizzazione di database (Fig.3.2).

### 3.6.1 Separazione ed isolamento di proteine

La tecnologia più utilizzata per questo scopo è l'elettroforesi su gel di poliacrilammide. Per molte applicazioni di proteomica le proteine sono risolte su gel mono-dimensionale (1-D gel). Nel 1-D gel le proteine vengono separate in base alla massa molecolare. Solitamente viene usata per isolare proteine all'interno di un micro sistema proteico. Per misture più complesse di proteine o per lisati cellulari non purificati si utilizza invece il 2-D gel.

Nel gel bi-dimensionale le proteine vengono separate nella prima dimensione in accordo alla carica netta, e nella seconda dimensione secondo la massa molecolare. La risoluzione risulta quindi molto più elevata che nel gel mono-dimensionale.

### 3.6.2 Acquisizione di informazioni sulla composizione peptidica delle proteine

La *spettrometria di massa (MS)* viene utilizzata nell'identificazione delle proteine attraverso la determinazione della massa dei peptidi che le costituiscono. Questo processo può essere suddiviso in tre fasi distinte:

- preparazione del campione;
- ionizzazione del campione;
- analisi della massa.

- 1) **PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.** La proteina viene digerita "*in gel*" con una proteasi (comunemente tripsina) in modo da poter

estrarre i peptidi che la compongono (procedura descritta in seguito Par.3.6.4).

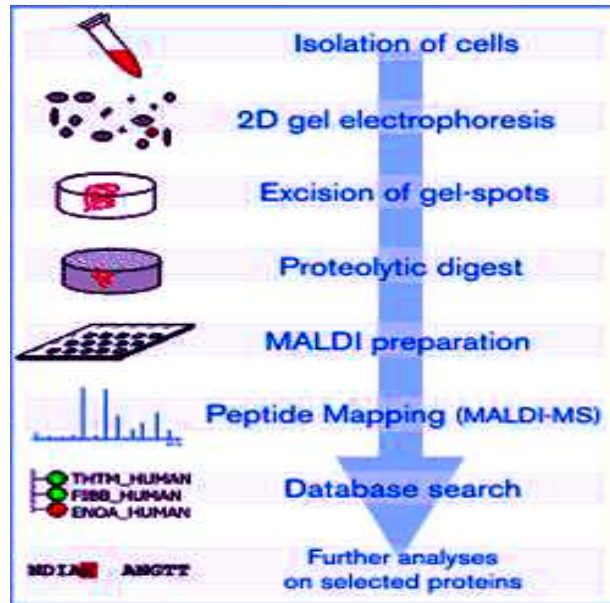


Figura 3.2:

Procedimento di preparazione del campione e successiva analisi per spettrometria di massa MALDI-TOF

La tecnologia più utilizzata per separare ed isolare le proteina è l'elettroforesi su gel di poliacrilammide; le proteina possono essere risolte su gel monodimensionali (1D-gel) o bidimensionali (2D-gel). Vengono quindi tagliate le bande (o gli spot) di interesse e la proteina viene digerita "in gel" con una proteasi (comunemente tripsina) in modo da poter estrarre i peptidi che la compongono. Per analizzare campioni biologici tramite spettrometria di massa è necessario caricare le molecole. Uno dei metodi che si può utilizzare a tal fine è la "matrix- assisted laser desorption/ionization" (MALDI).

Dall'utilizzo del MALDI si ottiene una lista delle masse dei peptidi che compongono la proteina che si sta studiando ("fingerprint"). La lista della massa dei peptidi viene comparata alle masse predette di peptidi derivanti dalla digestione teorica di proteine contenute in un database. Dalla sovrapposizione dello spettro delle masse dei peptidi reali con quello dei peptidi teorici si possono identificare le proteine.

2) IONIZZAZIONE DEL CAMPIONE. Per analizzare campioni biologici tramite MS è necessario caricare le molecole. Uno dei metodi che si può utilizzare a tal fine è la "matrix- assisted laser desorption/ionization"

(MALDI). Il MALDI è un metodo di ionizzazione “delicato” che permette il formarsi di ioni senza una perdita significativa dell’integrità del campione. Infatti nel MALDI il campione viene cocristallizzato in una matrice e poi soggetto a radiazioni tramite un laser. La matrice assorbe l’energia del laser, viene eccitata e trasmette energia al campione. Con questa tecnica i peptidi acquistano carica positiva generalmente pari ad 1. Se il campione fosse sottoposto direttamente alla radiazione perderebbe infatti la sua integrità (Fig.3.3).

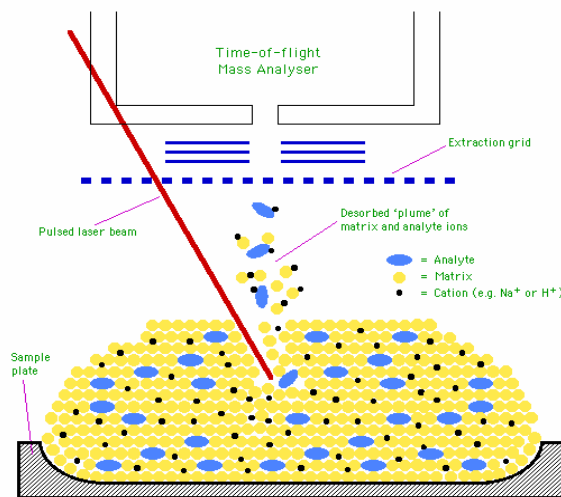


Figura 3.3:

Ionizzazione del campione

Per analizzare campioni biologici tramite MS è necessario caricare le molecole. Uno dei metodi che si possono utilizzare a tal fine è la “*matrix- assisted laser desorption/ionization*” (MALDI). Nel MALDI il campione viene cocristallizzato in una matrice e poi soggetto a radiazioni tramite un laser. La matrice assorbe l’energia del laser, viene eccitata e trasmette energia al campione. Se il campione fosse sottoposto direttamente alla radiazione perderebbe infatti la sua integrità. In questo modo è invece possibile ionizzarlo senza danneggiarlo.

La miscela campione-matrice cristallizza sul “plate” metallico che viene poi introdotto nello spettrometro di massa e irradiato dal laser.

I peptidi ionizzati vengono accelerati nel “tubo di volo” attraverso l’applicazione di un elevato campo elettrostatico. Il vuoto presente nel “tubo di volo” permette la separazione dei peptidi, aventi la stessa energia cinetica, in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ).



In questo modo è invece possibile ionizzarlo senza danneggiarlo. La matrice utilizzata è scelta in base alla natura del campione da analizzare. La miscela campione-matrice cristallizza sul “plate” metallico che viene poi introdotto nello spettrometro di massa e irradiato dal laser.

3) ANALISI DELLA MASSA. L’analizzatore di massa da noi utilizzato, “*time of flight- time of flight*” (ToF-ToF), è stato scelto perché associato al MALDI permette elevate prestazioni. I peptidi ionizzati vengono accelerati nel “tubo di volo” attraverso l’applicazione di un elevato campo elettrostatico. Il vuoto presente nel “tubo di volo” permette la separazione dei peptidi, aventi la stessa energia cinetica, in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ).

L’analizzatore “*time of flight*” misura il rapporto  $m/z$  di uno ione tramite la determinazione del tempo richiesto da questo per attraversare il “tubo di volo” in tutta la sua lunghezza (*Linear ToF*). Il ToF può includere alla fine del “tubo di volo” una serie di lamine cariche a potenziale crescente che riflettono indietro gli ioni al detector. In questo modo viene aumentata la lunghezza del percorso che gli ioni devono percorrere nel “tubo” e questo incrementa la sensibilità e la risoluzione dello strumento; inoltre corregge le piccole differenze energetiche fra i diversi ioni (*Reflector ToF*).

Il nostro analizzatore inoltre, come definisce lo stesso nome “*time of flight- time of flight*” (ToF-ToF), ha due “tubi di volo” consecutivi. Questo permette di aumentare ulteriormente la lunghezza del percorso che gli ioni devono fare all’interno dello strumento andando ad accrescere la sensibilità e la risoluzione.

Dall’utilizzo del MALDI-ToF-ToF si ottiene una lista delle masse dei peptidi che compongono la proteina che si sta studiando (“*fingerprint*”).

### 3.6.3 Utilizzazione di database

La lista della massa dei peptidi, ottenuta dalla digestione proteolitica di una proteina da identificare, viene comparata alle masse predette di peptidi derivanti dalla digestione teorica di proteine contenute in un database. Dalla sovrapposizione dello spettro delle masse dei peptidi reali con quello dei peptidi teorici si possono identificare le proteine (Fig.3.4).

Per il lavoro sperimentale descritto in seguito è stato utilizzato il seguente analizzatore; *Reflector ToF-ToF ion optic*.

I dati sono stati acquisiti in modalità “*MS positive reflector mode*”.

I dati sono stati poi interpretati utilizzando il GPS Explorer software (Version 1.1, Applied Biosystems), che agisce come interfaccia fra il database “Oracle” ed il programma MASCOT (Version 1.8).

L’*“impronta digitale” (Peptide Mass Fingerprint)* ottenuta dall’analisi viene utilizzata per l’identificazione di proteine attraverso il programma chiamato Pro-Found, che si basa per la ricerca sul database di NCBI.

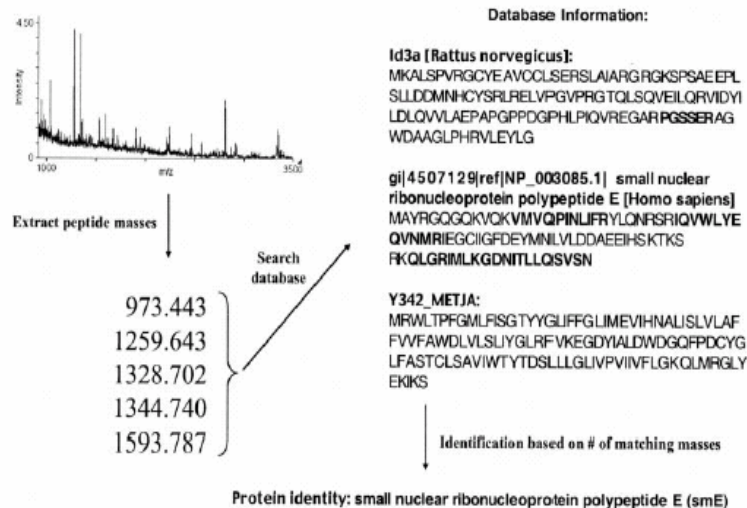


Figura 3.4:

Esempio di ricerca in database

La lista della massa dei peptidi, ottenuta dalla digestione proteolitica di una proteina da identificare, viene comparata alle masse predette di peptidi derivanti dalla digestione teorica di proteine contenute in un database. Dalla sovrapposizione dello spettro delle masse dei peptidi reali con quello dei peptidi teorici si possono identificare le proteine.

Possono essere utilizzati diversi programmi di ricerca e diverse banche dati. Prima di avviare la ricerca è possibile inserire diversi parametri al fine di facilitare e migliorare l’analisi. Si possono infatti introdurre notizie sul tipo di digestione effettuata o di quali modificazioni tenere conto. Si può poi limitare l’intervallo di peso molecolare o di punto isoelettrico all’interno del quale eseguire la ricerca, e decidere in quale organismo andare a cercare. E’ possibile infine stabilire un errore massimo permesso sul peso molecolare della proteina.

- Per l'analisi MS in banca dati sono stati utilizzati i seguenti parametri:
- massimo errore permesso sulla massa dei peptidi (50ppm);
  - "max missed cut 1", perdita di un solo sito di taglio durante la digestione;
  - modificazioni: iodioacetammide e parziale ossidazione delle metionine e serine, treonine e tirosine parzialmente fosforilate;
  - intervallo di pI (punto isoelettrico) 0-14;
  - intervallo di peso (Da) 0-3000.

Mascot (Matrix Science) scores sono considerati significativi ( $p < 0.005$ ).

Per l'analisi di MS/MS sono analizzati tutti i picchi con un "signal-to-noise ratio" migliore di 5. La ricerca avviene utilizzando il database NCBI, utilizzando le stesse modificazioni utilizzate per l'analisi MS.

#### 3.6.4 Digestione in gel di poliacrilammide

Direttamente dal gel di poliacrilammide si possono tagliare le bande di interesse e digerire le proteine che verranno successivamente esaminate tramite spettrometria di massa.

Procedura:

- le bande di interesse vengono escisse dal gel attraverso un apposito strumento, Investigator<sup>TM</sup> ProPic Spot picker (Genomic Solutions<sup>TM</sup>) e poste in eppendorf da 0.2mL.

Se non si procede subito alla digestione tenere le bande in H<sub>2</sub>O a 4°C.

Lavaggi: il primo viene fatto con 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, poi senza togliere il lavaggio aggiungere un ugual volume di acetonitrile 100%. Questi lavaggi con NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e acetonitrile devono essere ripetuti due volte.

Successivamente, togliere il lavaggio e procedere con acetonitrile. A questo punto il gel si seccerà. Rimuovere e seccare a RT.

Riduzione ed alchilazione: seccato il gel, aggiungere 10 mM DTE o DTT/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> fino a coprire il gel. Incubare 30/40 minuti a 56°C per ridurre le proteine. Alchilare con 55 mM iodioacetanide/100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 20 minuti al buio a temperatura ambiente.

Lavaggi come sopra, poi lavare con acetonitrile. A questo punto il gel si seccerà. Rimuovere e seccare a RT.

Digestione con tripsina; preparare la tripsina in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM alla concentrazione d'uso (nel nostro caso 4ng/μL). Lo stock della tripsina (Promega) è da 0.2 μg/μL.

Aggiungere tripsina/buffer in volume sufficiente per coprire il gel. Dopo 45 minuti rimuovere la tripsina rimasta. Aggiungere lo stesso volume di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM senza tripsina. Incubare tutta la notte a 37°C in camera calda.

Se il campione ha bisogno di essere concentrato, si possono usare delle ZipTip C18 (Millipore).

Preparazione ZipTip: lavare la tip con 10  $\mu\text{L}$  di acetonitrile 100%, poi con 50% acetonitrile 0.1% TFA (acido trifluoroacetico) e poi con 0.1% TFA per 3 volte. Passare poi più volte il campione sulla tip. Il campione verrà bloccato sulla resina all'interno della colonnina. Lavare con 0.1% TFA per 3 volte, poi eluire con 0.7  $\mu\text{L}$  di matrice HCHA. Mettere la goccia sul "plate" metallico nello "spot". Lasciare asciugare e procedere all'analisi del campione.

Soluzioni utilizzate:

Matrice (acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico; HCHA) (Sigma): la polvere si conserva a 4°C. Preparare una soluzione madre satura (SS), mettendo la polvere in 50% acetonitrile 0.1% TFA e vortexando per qualche minuto. Dalla madre si prepara una soluzione mezza satura (1/2S) diluendo 1:1 la SS (non risospesa) in 50% acetonitrile 0.1% TFA.

Calibranti – ABI 4700 Calibration Mixture (conservati a -20°C): diluire 1  $\mu\text{L}$  di calibrante in 34  $\mu\text{L}$  di matrice 1/2S.

## 4. Risultati

### 4.1 Clonaggio della proteina virale NS5A fusa con il TAP-tag nel vettore di espressione pLPCX

Allo scopo di purificare complessi proteici associati alla proteina non strutturale 5A del virus dell'epatite C, la prima fase del lavoro sperimentale ha previsto l'espressione della proteina virale in fusione ad una sequenza "TAP-tag".

La purificazione tramite "TAP-tag" (*Tandem Affinity Purification*), messa a punto nel laboratorio di Séraphin B. (Rigaut G. *et al.*, 1999) permette di isolare proteine che interagiscono con una proteina di interesse con una specificità molto elevata. Si basa infatti sulla fusione della proteina nota, nel nostro caso NS5A, non con un unico "tag", ma con due "tag". Il TAP tag consiste infatti di un dominio legante le IgG (proteina A) e di un peptide legante la calmodulina (CBP), separati da un sito di taglio per la proteasi del virus del mosaico del tabacco. Entrambi questi tag sono stati selezionati per la loro alta efficienza. Questo permette di eliminare tutte le interazioni non specifiche, potendo contare su due diverse purificazioni sequenziali.

Per avere a disposizione un vettore retrovirale che mi permettesse di esprimere la proteina NS5A fusa "in frame" con il "TAP-tag" è stato utilizzato un vettore commerciale; pLPCX (CLONTECH Laboratories, Inc.), modificato come descritto precedentemente in materiali e metodi (Par.3.2.11), per generare un vettore "nuovo" pLBCX. Per il clonaggio del "TAP-tag" è stato utilizzato il vettore pLBCXGFP; dove la GFP (*Green Fluorescein Protein*) è stata inserita nel plasmide retrovirale utilizzando i siti di restrizione XhoI – NotI. Il vettore così modificato è stato utilizzato per il clonaggio del "TAP-tag".

Il plasmide pBS1479, descritto in materiali e metodi (Par.3.2.11), è stato digerito con il seguente enzima di restrizione: HindIII, e l'estremità è stata resa "piatta" tramite l'uso della T4 Polimerasi. Poi lo stesso plasmide è stato ulteriormente digerito con BamHI. In tal modo è stato possibile ottenere il frammento "TAP-tag" (BamHI – blunt). Questo frammento è stato poi inserito nel vettore retrovirale pLBCXGFP, digerito con l'enzima di restrizione NotI, e modificato tramite l'uso della T4 Polimerasi. Lo stesso plasmide è stato digerito con BamHI. Tagliando BamHI "a monte" della sequenza che codifica per la GFP e NotI "a valle" della stessa, è stato

possibile eliminare la sequenza codificante per la “*Green Fluorescein Protein*” ed ottenere un plasmide retrovirale (pLBCX BamHI – blunt) che è stato quindi possibile utilizzare per il clonaggio del frammento “TAP-tag” (BamHI – blunt).

Il vettore ed il frammento sopra descritti sono stati sottoposti ad una reazione di ligazione trasformati per elettroporazione in cellule batteriche competenti (TOP10) e piastrate su terreno con l’antibiotico per ottenere colonie all’interno delle quali replica il plasmide di interesse che porta il gene per la resistenza all’antibiotico. Dalle colonie ottenute, cresciute separatamente in terreno di coltura, viene estratto il DNA, prima su piccola scala (mini prep), per controllare tramite restrizione enzimatica quali colonie sono positive e da una di queste colonie risultata positiva, amplificata in un volume di terreno maggiore, viene estratto il DNA su larga scala (maxi prep). Controllato su gel di agarosio tramite corsa elettroforetica, ne viene poi calcolata la concentrazione ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) tramite lettura allo spettrofotometro ( $A_{260}$ ).

Il vettore ottenuto, che ho chiamato pLBCXTAP, è stato quindi utilizzato per il clonaggio del cDNA che codifica per la proteina virale NS5A. Tramite questo vettore è possibile, se l’inserito viene appositamente inserito mantenendo il corretto codice di lettura per gli amminoacidi, generare una proteina di fusione tra la proteina di interesse clonata nel vettore e la proteina TAP (Fig.4.1).

Il plasmide precedentemente preparato (pLBCXTAP) è stato quindi utilizzato come vettore per poter esprimere la proteina virale di interesse fusa al C-terminale con il frammento TAP-tag, che mi permetterà in seguito di poter purificare complessi proteici associati alla proteina NS5A del virus dell’epatite C tramite la strategia del “*Tandem Affinity Purification*” (TAP).

La scelta di utilizzare un vettore retrovirale, pLBCX, permette di andare ad esprimere la proteina virale in cellule di mammifero ad alti livelli tramite infezione virale. Il plasmide contiene infatti le due LTR (“*Long Terminal Repeat*”) e la sequenza  $\Psi$ , indispensabili per l’incapsidamento dei nuovi virioni, ma non esprime le proteine retrovirali *gag*, *pol* ed *env*, anch’esse necessarie per formare le particelle retrovirali.

Il clonaggio del DNA-complementare (cDNA) del gene che codifica per NS5A in questo plasmide retrovirale mi ha permesso di poter esprimere la proteina di HCV in cellule di epatoma umano Huh7 ad alti livelli e di poter utilizzare lisati di queste cellule per esperimenti di immunoprecipitazione utilizzando appunto la metodica del “TAP”.

Per clonare il cDNA codificante per NS5A nel vettore preparato in precedenza (pLBCXTAP), il c-DNA è stato ottenuto tramite la tecnica della PCR. Avendo a disposizione un vettore contenente il cDNA corrispondente all'intero genoma di HCV è stato possibile utilizzare questo plasmide come template per la PCR. Per amplificare il cDNA sono stati utilizzati gli oligonucleotidi specifici, elencati precedentemente, che contengono determinati siti di restrizione per il clonaggio. Dopo la reazione il risultato viene controllato su gel di agarosio per verificare che il frammento amplificato abbia il giusto peso.

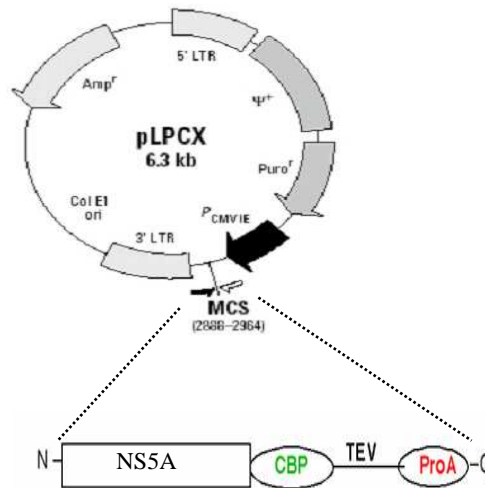


Figura.4.1:

Rappresentazione schematica del clonaggio della proteina virale NS5A fusa "in frame" con il TAP-tag nel vettore retrovirale pLPCX

Il plasmide retrovirale utilizzato nel clonaggio permette di andare ad esprimere la proteina di interesse in cellule di mammifero ad alti livelli tramite infezione virale. Come descritto nel testo infatti contiene due sequenze LTR e la sequenza  $\psi$ , indispensabili per la formazione dei nuovi virioni.

TAP-tag; CBP; Calmodulin Binding Protein  
 TEV; Tobacco Etch Mosaic Virus protease  
 ProtA; proteina A.

L'intera reazione di PCR è stata quindi digerita con appositi enzimi di digestione in modo da creare estremità compatibili con quelle del vettore

(pLBCXTAP) nel quale andrò a clonare i diversi frammenti amplificati. Il c-DNA del frammento NS5A è stato quindi digerito BglII – HindIII. Per ligare i frammenti nel nuovo vettore retrovirale è necessario digerire pLBCXTAP in modo tale da avere estremità compatibili con quelle dell'inserto.

Il vettore viene quindi digerito con i seguenti enzimi di restrizione BamHI – HindIII. L'estremità 3'-BglII del frammento risulta compatibile con quella del vettore BamHI, essendo le due estremità create dai due enzimi di restrizione identiche fra loro. Inoltre, è bene far notare che è necessario clonare il frammento all'interno del vettore utilizzando BamHI all'estremità 3', perché solo in questo modo si darà luogo ad una proteina di fusione corretta.

Dopo la reazione di ligazione fra pLBCXTAP (HindIII – BamHI) e l'inserto (HindIII – BglII), si procede come descritto in precedenza per ottenere il plasmide di interesse (Fig.4.1).

#### 4.2 Espressione delle proteine virali in cellule di mammifero tramite infezione virale

Il vettore retrovirale così ottenuto può essere trasfettato in particolari cellule 293gp (“*cellule packaging*”) per generare particelle virali per esprimere stabilmente la proteina nelle cellule di interesse. Il plasmide retrovirale contenente l'inserto di interesse (pLBCX NS5A-TAP) viene trasfettato in cellule packaging insieme ad un plasmide che codifica per la proteina del rivestimento *env* di VSV (Virus della Stomatite Vescicolare).

Siccome le cellule 293gp hanno al loro interno, integrato stabilmente, un plasmide che codifica per le due proteine retrovirali *gag* e *pol*, mentre pLBCX contiene le due LTR e la sequenza  $\Psi$  di incapsidamento, è possibile la formazione di particelle virali infettive. Queste particelle retrovirali vengono recuperate dal supernatante 48 ore dopo la trasfezione. Le particelle sono complete, possono quindi dar vita ad un'infezione stabile, ma poiché le proteine virali sono state date *in trans* e non sono quindi codificate dal genoma retrovirale, le particelle risultano difettive ed incapaci di produrre un'ulteriore progenie virale. Con il virus recuperato si è proceduto ad infettare cellule Huh7. Retrovirus ad alto titolo virale permettono l'espressione in tutte le cellule della proteina di interesse (NS5A), poiché il genoma virale retroscritto si integra nel genoma della cellula ospite, e quindi tale espressione rimane stabile nel tempo.



Dalle cellule Huh7 infettate ho preparato estratti proteici totali, che sono stati risolti su gel di poliacrilammide (SDS PAGE) e poi esaminati per Western blot utilizzando l'anticorpo anti-NS5A. I risultati confermano la corretta espressione della proteina virale NS5A in cellule Huh7. La proteina fusa con il TAP-tag ha un'attività elettroforetica rallentata rispetto alla stessa proteina espressa nelle Rep60, cellule Huh7 all'interno delle quali replica il subgenoma di HCV, a causa della fusione con il tag, che ne provoca un aumento di peso molecolare (Fig.4.2).

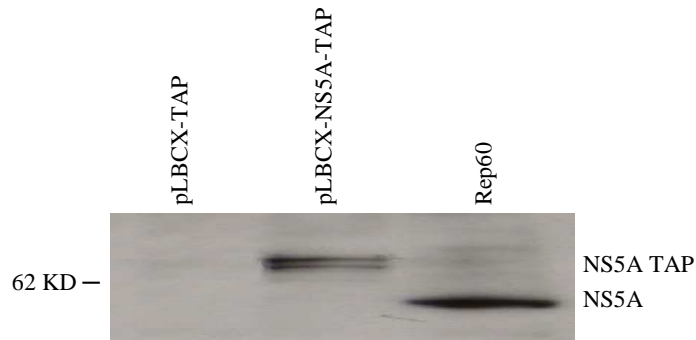


Figura 4.2:

Controllo della corretta espressione della proteina NS5A-TAP-tag

La corretta espressione della proteina virale nelle cellule Huh7 viene controllata tramite analisi Western blot con un anticorpo anti-NS5A. Gli estratti proteici vengono preparati 48 ore dopo l'infezione con il retrovirus. La proteina fusa con il TAP-tag migra più lentamente della proteina espressa dal replicone (Rep60) per la presenza del tag. Come controllo viene utilizzato il retrovirus che esprime solo il TAP-tag (pLBCX-TAP).

4.3 Identificazione di proteine cellulari che interagiscono con la proteina non strutturale 5A di HCV tramite esperimenti di *Tandem Affinity Purification*

Per studiare quali siano le proteine cellulari che interagiscono con la proteina virale e che potrebbero quindi influenzare la replicazione del virus ed il suo ciclo vitale, sono stati purificati complessi proteici da estratti cellulari tramite esperimenti di *Tandem Affinity Purification*. A tal fine le cellule sono state infettate con retrovirus che permettono la produzione NS5A, e come controllo con retrovirus che producono il solo TAP-tag.

Le cellule infettate (Huh7) sono state lisate con un tampone appropriato e sono state incubate a 4°C per facilitarne la rottura. Recuperati i lisati ho

condotta la purificazione come da protocollo; un primo legame avviene utilizzando IgG coniugate con della resina di agarosio, poi si procede al taglio proteolitico specifico tramite proteasi e successivamente al secondo legame fra il CPB e la calmodulina, anch'essa coniugata ad una resina di agarosio.

Poiché questo secondo legame (CBP-Calmodulina), avviene solo in presenza di calcio, è poi possibile eluire la proteina di interesse ed i complessi proteici che si sono formati, eliminando il calcio dalla soluzione attraverso chelanti specifici, quale l'EGTA o l'EDTA.

A questo punto i campioni sono stati risolti su gel di poliacrilammide (SDS PAGE).

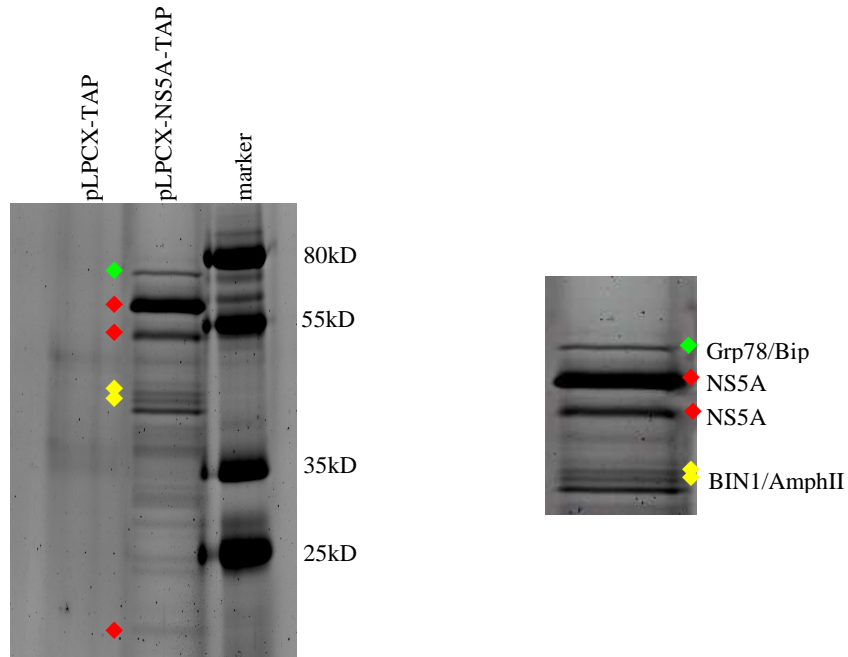
Dopo aver risolto i campioni su gel, le proteine co-purificate con la proteina virale sono state rilevate con un colorante fluorescente Sypro Ruby. La colorazione con Sypro è stata scelta per la sua elevata sensibilità; infatti, come descritto precedentemente (Par.3.3.12), questa colorazione permette di visualizzare quantità di proteina intorno a 10ng. Per il lavoro sperimentale descritto è stato difatti importante avere una colorazione altamente sensibile, avendo delle quantità molto piccole di proteina da analizzare. A paragone, la colorazione tramite coomassie non permette di visualizzare proteine presenti in piccole quantità, mentre se confrontato ad una colorazione tramite nitrato d'argento, che presenta una sensibilità equiparabile a quella del Sypro, questa seconda tecnica risulta molto più pratica, veloce e meno dipendente dall'operatore (es. tempi di esposizione). Il gel viene quindi decolorato ed esaminato agli UV per visualizzare le proteine.

Dal confronto fra il controllo che esprime il solo TAP-tag e le cellule che esprimono NS5A-TAP-tag, ho osservato diverse bande presenti nei campioni di interesse e non nel controllo (Fig.4.3). Queste bande rappresentano proteine che si legano in maniera specifica alla proteina virale e non alla resina in modo aspecifico, non risultando nel controllo negativo.

L'identificazione delle proteine di interesse viene operata attraverso un metodo analitico estremamente sensibile quale la spettrometria di massa MALDI-ToF-ToF ("*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight- time-of-flight*"). Per analizzare le bande ottenute si procede prima alla digestione delle proteine contenute nel gel con una proteasi, nel nostro caso la tripsina, che mi consente di trasformare la proteina in una miscela di peptidi.

La tripsina taglia al carbossi-terminale di ogni residuo di lisina e arginina producendo peptidi di diversa grandezza che sono stati poi analizzati tramite spettrometria di massa. Lo spettro di peptide ottenuto è stato confrontato con

le digestioni triptiche teoriche di tutte le proteine umane attraverso il programma di ricerca che si basa sul database NCBI.



*Figura 4.3:*

Identificazione di proteine cellulari che interagiscono con la proteina virale NS5A

Dopo la purificazione tramite TAP i complessi proteici eluiti vengono separati su un gel monodimensionale SDS-Page e colorati tramite colorante Sypro Ruby. Dal confronto fra le cellule che esprimono NS5A-TAP-tag e quelle che esprimono il solo TAP-tag vengono scelte ed analizzate delle bande. Le bande corrispondenti alle proteine di interesse vengono digerite ed analizzate tramite spettrometria di massa MALDI-ToF-ToF. Nell'immagine ingrandita è possibile osservare in dettaglio le bande corrispondenti alle proteine identificate come interattori della proteina virale, anch'essa identificata come controllo (♦).

Le proteine identificate con alta confidenza da più esperimenti indipendenti sono state le seguenti

(Tabella 2 – Fig.4.4 Identificazione Grp78/Bip):

- 1) Grp78/Bip (banda ♦ in fig.4.3; identificazione in fig.4.4),

2) BIN1 (Bridging Integrator-1) /AmphII (banda ♦ in fig.4.3).

Inoltre per controllo è stata digerita anche la banda che si riteneva corrispondere alla proteina virale NS5A (banda ♦ in fig.4.3) e la sua identificazione ha confermato che si trattava della proteina di HCV.

Protein Name	Accession number	Protein Score	Protein Score C.I.%	Peptide Count
(P26662)Genome polyprotein	POLG_HCVJA	204	100	14
(P26662)Genome polyprotein	POLG_HCVJA	71	98,653	14
(P26662)Genome polyprotein	POLG_HCVJA	89	99,754	9
(O00499) Myc box dependent interacting protein 1(Bridging integrator 1) (Amphiphysin-like protein)	BIN1_HUMAN	90	99,983	11
(O00499) Myc box dependent interacting protein 1(Bridging integrator 1) (Amphiphysin-like protein)	BIN1_HUMAN	147	100	16
(P11021) 78 kDa glucose-regulated protein precursor(GRP 78)	GR78_HUMAN	222	100	21

*Tabella 2: Identificazione degli interattori della proteina virale NS5A tramite spettrometria di massa MALDI-ToF-ToF*

Altre bande di peso molecolare inferiore inoltre corrispondono a frammenti della stessa proteina virale.

Come ulteriore controllo delle identificazioni i campioni eluiti sono stati analizzati tramite Western blot con anticorpi specifici per le due proteine cellulari identificate (Fig.4.5).

#### 4.4 L'overespressione della proteina cellulare Grp78 riduce la sintesi delle proteine virale

A seguito delle identificazioni ottenute mi sono chiesta se le proteine identificate come interattori della proteina virale NS5A potessero avere un

ruolo nella replicazione del virus. Per rispondere a questa domanda ho predisposto esperimenti di overespressione e “*RNA interference*” (siRNA) per modulare l’espressione di Grp78/Bip e BIN1/AmphII. Questi esperimenti sono stati portati avanti con il sistema del replicone in cellule Rep60. Questo sistema ci ha permesso di osservare e controllare eventuali alterazioni della replicazione di HCV in seguito alla modulazione delle due proteine cellulari.

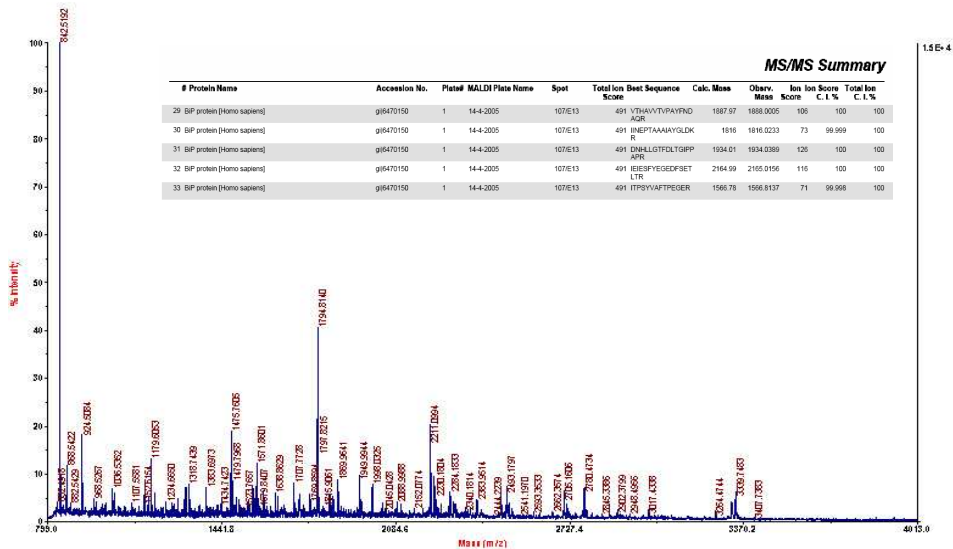
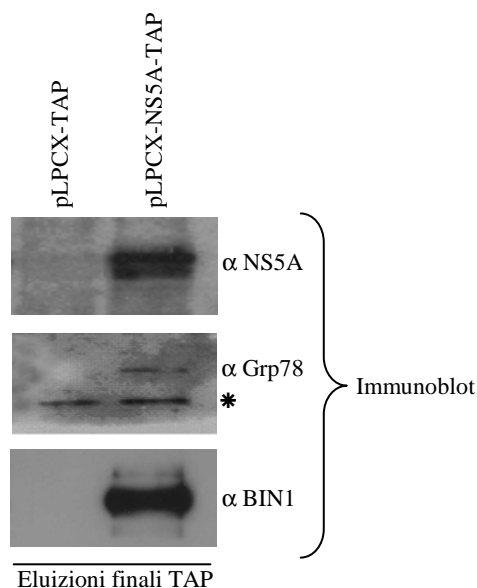


Figura 4.4:  
Spettro di massa dell’identificazione di Grp78/Bip

Dall’utilizzo del MALDI-ToF-ToF si ottiene una lista delle masse dei peptidi che compongono la proteina che si sta studiando (“*fingerprint*”). La lista della massa dei peptidi viene comparata alle masse predette di peptidi derivanti dalla digestione teorica di proteine contenute in un database. Dalla sovrapposizione dello spettro delle masse dei peptidi reali con quello dei peptidi teorici è stato possibile identificare la proteina.

Modulando la proteina cellulare BIN1/AmphII, non ho osservato cambiamenti rilevanti nella replicazione di HCV, ne’ in seguito ad un aumento di espressione della stessa ne’ in seguito ad una sua diminuzione (Fig.4.6). Questo suggerisce un ruolo per BIN1 non direttamente legato alla replicazione virale.



*Figura 4.5:*

Conferma delle identificazione degli interattori di NS5A

Dopo la purificazione tramite TAP i complessi proteici eluiti vengono separati su un gel monodimensionale SDS-Page ed ibridati con diversi anticorpi. L'analisi con un anticorpo anti-NS5A viene utilizzata come controllo dell'effettiva precipitazione della proteina. Gli anticorpi specifici per Grp78 e BIN1 sono invece utilizzati per confermare l'identificazione delle due proteine cellulari che co-precipitano con la proteina virale.

\*; banda aspecifica riconosciuta dall'anticorpo anti-Grp78.

Il coinvolgimento di Grp78 nella replicazione virale è stato studiato modulando positivamente la sua espressione tramite l'uso di retrovirus che codificano per lo chaperone cellulare. Il clonaggio della sequenza che codifica per la proteina Grp78 nel plasmide retrovirale viene condotto come descritto precedentemente al paragrafo 4.1 per la proteina virale. Gli oligonucleotidi utilizzati sono descritti nei Materiali e Metodi (Par.3.2.1). La PCR che mi ha permesso di amplificare la sequenza di interesse è stata condotta su una libreria preparata da cellule di fegato umane.

Successivamente il frammento di interesse è stato digerito con gli enzimi di restrizione HindIII e XhoI e ligato nel plasmide pLPCX come già descritto.

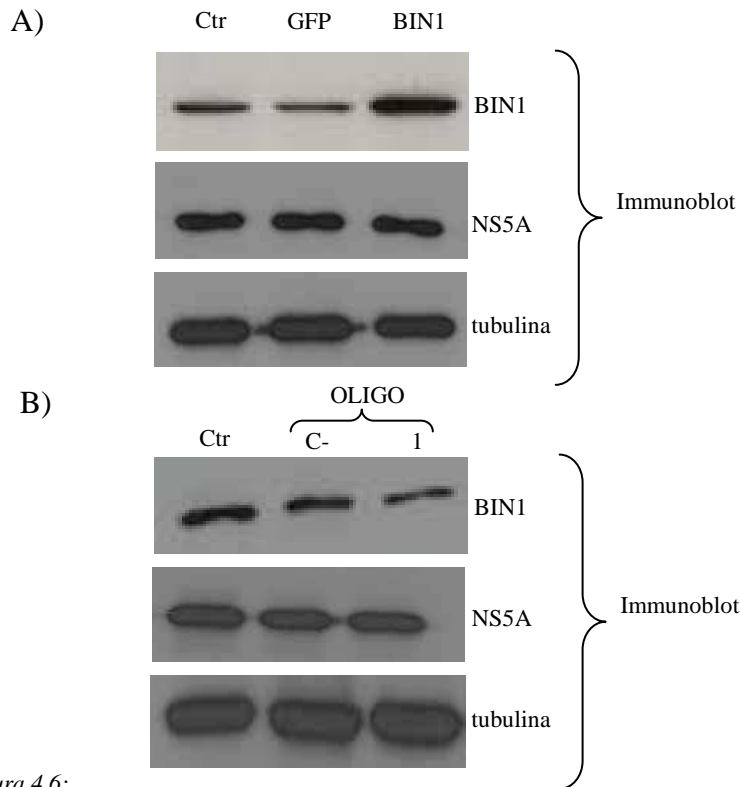


Figura 4.6:

Modulazione della proteina cellulare BIN1

(A) Tramite analisi Western blot viene mostrato che la up-regolazione della proteina cellulare (BIN1) in cellule Rep60 attraverso l'utilizzo di retrovirus non altera l'espressione della proteina virale (NS5A).

Ctr; controllo negativo, cellule non infettate.

GFP; controllo di infezione, retrovirus che esprime la proteina GFP come controllo.

BIN1; retrovirus che esprime la proteina BIN1.

(B) Tramite analisi Western blot viene mostrato che la regolazione negativa della proteina cellulare (BIN1) in cellule Rep60 attraverso l'utilizzo di oligo si-RNA diretti contro la proteina (1) non altera l'espressione della proteina virale (NS5A).

La tubulina viene utilizzata per normalizzare i campioni.

Ctr; controllo non trasfettato,

C-; oligo non specifico utilizzato come controllo.

Un retrovirus che codifica per la proteina GFP (*“Green Fluorescent Protein”*) viene utilizzato come controllo. Questa metodica ci permette di esprimere tramite infezione la proteina cellulare Grp78 a livelli maggiori

rispetto all'espressione endogena, com'è possibile osservare dalla figura 4.7 (Immunoblot anti-Grp78, terza colonna). Gli estratti proteici sono preparati 48 ore dopo l'infezione ed analizzate tramite analisi Western blot con anticorpi anti Grp78 o anti HCV NS5A.

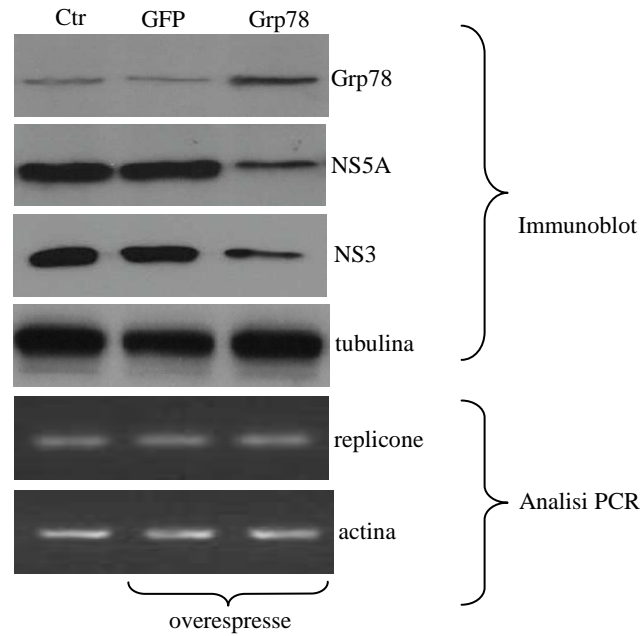


Figura 4. 7:

L'overespressione di Grp78/Bip riduce la sintesi delle proteine di HCV, ma non ne altera l'RNA

(A) Tramite analisi Western blot viene mostrato che la up-regolazione della proteina cellulare (Grp78) in cellule Rep60 attraverso l'utilizzo di retrovirus, riduce la sintesi delle proteine virali (NS3-NS5A).

Ctr; controllo negativo, cellule non infettate.

GFP; controllo di infezione, retrovirus che esprime la proteina GFP come controllo.

Grp78; retrovirus che esprime la proteina Grp78/Bip.

(B) L'RNA virale (replicone), analizzato dopo RT tramite analisi PCR utilizzando oligo specifici per la regione che codifica per NS4A, non risulta invece modulato dalla stessa up-regolazione.

Tubulina e actina vengono utilizzate per la normalizzazione dei campioni.



Come possiamo vedere in figura 4.7, i livelli delle proteine di HCV sono drasticamente ridotti quando Grp78 viene overespresso. Questa diminuzione non è osservata unicamente per la proteina non strutturale 5A, ma si osserva anche per le altre proteine virali presenti nel replicone, come NS3 (Fig.4.7). D'altra parte l'analisi dell'effetto dell'aumentata espressione di Grp78 su i livelli di RNA virale tramite analisi RT-PCR, mostra che i livelli di RNA del virus non sono affetti dall'aumento di Grp78. Questo indica che la diminuzione delle proteine virali indotta dall'iperespressione di Grp78 avviene a livello traduzionale o post-traduzionale (Fig.4.7).

#### 4.5 Grp78 è coinvolto nell'inibizione di HCV indotta da stress del reticolo

Grp78 è il regolatore principale delle funzioni del reticolo endoplasmatico (ER). Come descritto nell'introduzione questa proteina cellulare è responsabile della traslocazione delle proteine attraverso il reticolo, del loro ripiegamento, assemblaggio, e di tante altre funzioni. Inoltre, Grp78 funziona come sensore delle condizioni di stress nel reticolo. Grp78 è una proteina che risiede nel reticolo endoplasmatico, e la sua sintesi può essere stimolata da una varietà di condizioni, ambientali e fisiologiche, che perturbano l'omeostasi e la funzione del ER producendo ER stress (Linda M.H., 2004).

Basandomi su queste osservazioni, mi sono chiesta se i livelli di espressione delle proteine di HCV potessero essere modulati in condizioni di ER stress in cellule all'interno delle quali replica il replicone di HCV.

A questo scopo ho trattato le cellule per 12 e 24 ore con tunicamicina, un inibitore della N-acetilglicosilazione che porta ad una rapida induzione di ER stress. Come prima cosa ho controllato l'aumento dei livelli di Grp78 in seguito al trattamento con l'inibitore e, come aspettato, i livelli della proteina cellulare incrementano (Fig.4.8-A, Immunoblot anti-Grp78). In parallelo con l'aumento di Grp78, l'ER stress causa una forte riduzione dei livelli di proteine virali (Fig.4.8-A, Immunoblot anti-NS5A).

Questa riduzione risulta inoltre proporzionale ai livelli di stress indotto (Fig.4.8-B). Anche in questa condizione il livello di RNA del virus non risulta mai alterato (Fig.4.8, Analisi PCR-replicone).

Per dimostrare che Grp78 avesse un ruolo diretto nella diminuzione dei livelli di espressione delle proteine virali durante l'induzione di ER stress, le cellule che esprimono il replicone di HCV sono state trasfettate con due oligo specifici per interferire con l'm-RNA di Grp78 e prevenirne in questo

modo l'aumento di espressione in seguito all'induzione di ER stress con tunicamicina. Un oligo aspecifico viene utilizzato come controllo.

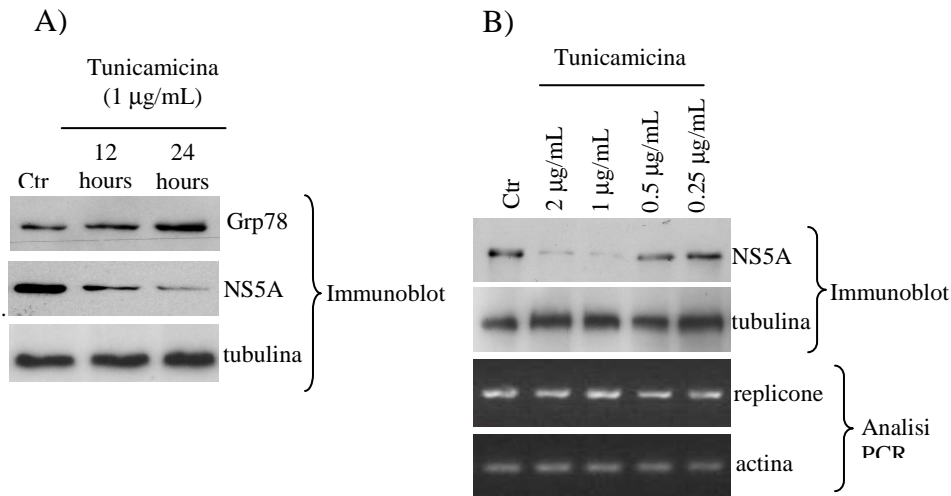


Figura 4.8:

L'overespressione di Grp78 in seguito ad induzione di ER stress riduce la sintesi delle proteine virali, ma non provoca alterazioni dell'RNA virale

Trattando le cellule con un inibitore della N-acetilglicosilazione (Tunicamicina) è possibile indurre ER stress e portare ad un aumento fisiologico della proteina cellulare Grp78.

(A) Analizzando tramite Western blot cellule Rep60 trattate per 12 e 24 ore con tunicamicina è possibile osservare che ad un aumento di espressione di Grp78 corrisponde una diminuzione della proteina virale (NS5A).

(B) Analizzando l'espressione della proteina virale NS5A dopo 24 ore dal trattamento, è possibile osservare che diverse concentrazioni dell'inibitore portano ad una diversa riduzione dell'espressione della proteina, che risulta maggiormente ridotta all'aumentare della concentrazione dell'inibitore e quindi dei livelli di ER stress. Anche in questo caso un'analisi tramite PCR dell'RNA virale non mostra alcuna modificazione (Analisi PCR-replicone). Tubulina e actina vengono utilizzate per la normalizzazione dei campioni.

24 ore dopo la trasfezione le cellule sono trattate con tunicamicina ed analizzate dopo ulteriori 24 ore. Come è possibile osservare la trasfezione degli oligo specifici per Grp78 è capace di prevenire un aumento della proteina in condizioni di stress. In queste condizioni, la diminuzione dei livelli della proteina virale NS5A in seguito al trattamento con tunicamicina è significativamente ridotto (Fig.4.9).

Da questi risultati è possibile affermare che la proteina cellulare Grp78 gioca un importante ruolo nel controllo dei livelli di espressione di HCV in seguito ad induzione di stress del reticolo endoplasmatico.

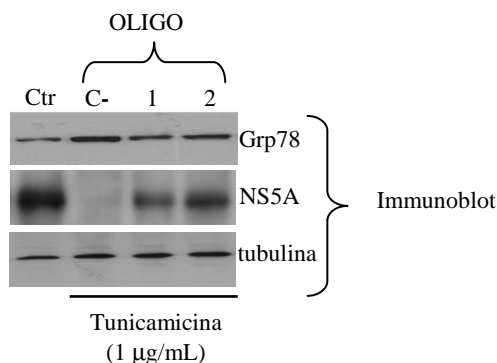


Figura 4.9:

Grp78 è richiesto per lo stress del reticolo indotto dal virus dell'epatite C

Per analisi Western Blot è possibile osservare che se la up-regolazione di Grp78 per induzione di ER stress viene bloccata attraverso si-RNA non avviene la riduzione dell'espressione delle proteine virali.

Nel C- trattato con tunicamicina per 24 ore per indurre ER stress, Grp78 viene up-regolato (anticorpo anti-Grp78) e di conseguenza notiamo una riduzione della sintesi delle proteine di HCV, ma se blocchiamo l'aumento della proteina cellulare viene bloccata o quantomeno ridotta anche la riduzione dell'espressione delle proteine virali (anticorpo anti-NS5A).

La tubulina viene utilizzata per normalizzare i campioni.

Ctr; controllo non trasfettato.

C-; oligo i-RNA non specifico.

1-2; oligo i-RNA specifici per Grp78

#### 4.6 Inserimento delle sequenze che codificano per i due tag (HA e Flag) nel replicone di HCV

Gli esperimenti condotti con la metodica del TAP permettono di isolare con efficienza e specificità molto elevate complessi proteici associati ad una proteina di interesse, nel mio caso la proteina virale NS5A. Con questa tecnica però la proteina nota viene espressa in quantità non fisiologiche, viene cioè overespressa. L'espressione di una proteina a livelli diversi da quelli fisiologici alcune volte può determinarne una diversa localizzazione all'interno della cellula o può causare interazioni artefatte. Nel mio caso inoltre, esprimere NS5A come singola proteina, al di fuori quindi del

complesso delle altre proteine virali non strutturali, vuol dire analizzarla al di fuori del suo “normale” stato di attività. E’ infatti dimostrato in letteratura ormai da diversi studi che le proteine non strutturali di HCV formano un complesso associato a membrane del reticolo endoplasmatico resistenti ai detergenti. Quindi, come descritto nell’introduzione, le proteine non strutturali espresse dal replicone formano un complesso, e in assenza delle altre proteine di HCV è altamente probabile che la proteina NS5A non possa svolgere alcune delle sue funzioni. Esaminando tramite immunofluorescenza la localizzazione della proteina virale espressa singolarmente è possibile vedere come questa sia differente dalla localizzazione che assume in presenza del complesso delle altre proteine virali (Fig.4.10). Questo sottolinea ancora di più quanto affermato in precedenza, NS5A senza le altre proteine virali presenta una localizzazione prevalentemente citoplasmatica, mentre con le altre proteine ha una localizzazione più discreta “*a spot*”. Per questo è interessante analizzare l’interazioni di NS5A con le proteine cellulari in un complesso più fisiologico, in presenza delle altre proteine virali. La mancanza di specifici anticorpi per la proteina da poter utilizzare per esperimenti di immunoprecipitazione però non permette di analizzare queste interazioni purificando direttamente la proteina virale. Per ovviare a questo problema ho inserito nella sequenza che codifica per la proteina NS5A nel replicone due sequenze che codificano per due diversi *tag* (HA e Flag). Questo mi ha permesso di utilizzare anticorpi anti-HA ed anti-Flag, disponibili in commercio, per immunoprecipitare NS5A, ed avendo a disposizione due diversi *tag* è possibile allestire una immunoprecipitazione doppia, molto simile alla metodica del TAP.

Iniziali tentativi fatti per inserire sequenze per diversi *tag* in differenti posizioni del replicone sono falliti a causa dell’interferenza dei *tag* sulla funzione della proteina e quindi sulla replicazione del subgenoma virale.

Nel 2004 però il laboratorio di Rice C.M. è riuscito ad inserire proprio all’interno della sequenza che codifica per NS5A una sequenza *tag* (Flag) e perfino la sequenza completa della proteina GFP (Moradpour D. *et al.*, 2004). In questo lavoro le sequenze vengono introdotte in diverse regioni casualmente e successivamente vengono selezionati quei repliconi che sono capaci di replicare. In seguito a questo lavoro mi è stato possibile inserire la prima sequenza *Flag-tag* all’interno del replicone, proprio nella regione descritta, tramite PCR inversa. Sono stati disegnati degli oligo che mi hanno permesso l’inserimento per PCR della sequenza specifica. Successivamente il plasmide modificato viene introdotto per trasformazione in cellule batteriche. Dai batteri viene preparato il DNA plasmidico, utilizzato poi per

la trascrizione *in vitro*. L'RNA è stato poi inserito in cellule Huh7 per elettroporazione, come descritto precedentemente. Dopo la selezione si ha quindi a disposizione un replicone che replica correttamente ed esprime NS5A con all'interno la sequenza Flag-tag (Rep60 NS5A-Flag).

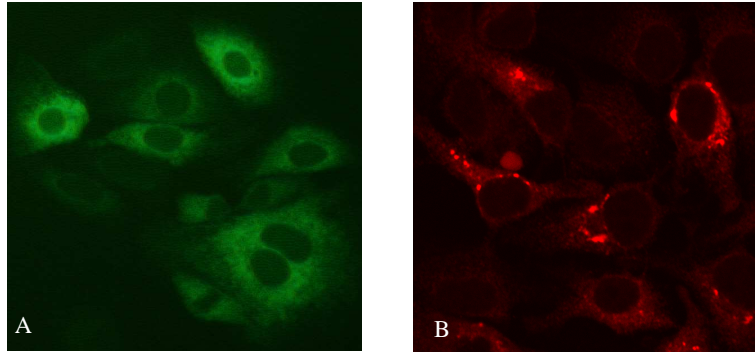


Figura 4.10:

La localizzazione della proteina virale NS5A varia se osservata in presenza o in assenza delle altre proteine virali non strutturali

Se osserviamo la proteina virale NS5A in assenza delle altre proteine virali questa localizza principalmente dispersa nel citoplasma (A), se però viene espressa nel complesso del replicone, cioè in presenza delle altre proteine, la proteina NS5A è osservata sempre nel citoplasma, ma ha una localizzazione più discreta “a spot” (B).

Anticorpo primario anti-NS5A (A-B); anticorpi secondari anti-mouse FITC (A) e Cj3 (B).  
Ingrandimento 40X.

Per l'inserimento della sequenza HA-tag ho invece più semplicemente disegnato degli oligo che contengono estremità a singolo filamento compatibili con siti di restrizione presenti nel replicone a valle della sequenza Flag, poi appaiati ed inseriti per taglio enzimatico all'interno del replicone 5A-Flag. Anche questo replicone viene purificato, trascritto e poi inserito in cellule Huh7. Dopo la selezione con G418 ho quindi ottenuto un replicone che esprime correttamente la proteina NS5A con all'interno due diverse sequenze tag (Rep60 NS5A HA-Flag) (Fig.4.11).

La corretta espressione della proteina è necessaria per la replicazione del subgenoma di HCV. La regolare replicazione del replicone modificato quindi mi rileva la presenza di una proteina NS5A attiva e funzionale. La presenza al suo interno dei due diversi tag è stata invece controllata tramite

analisi Western blot su estratti proteici di Rep60 NS5A HA -Flag con anticorpi anti-HA ed anti-Flag.

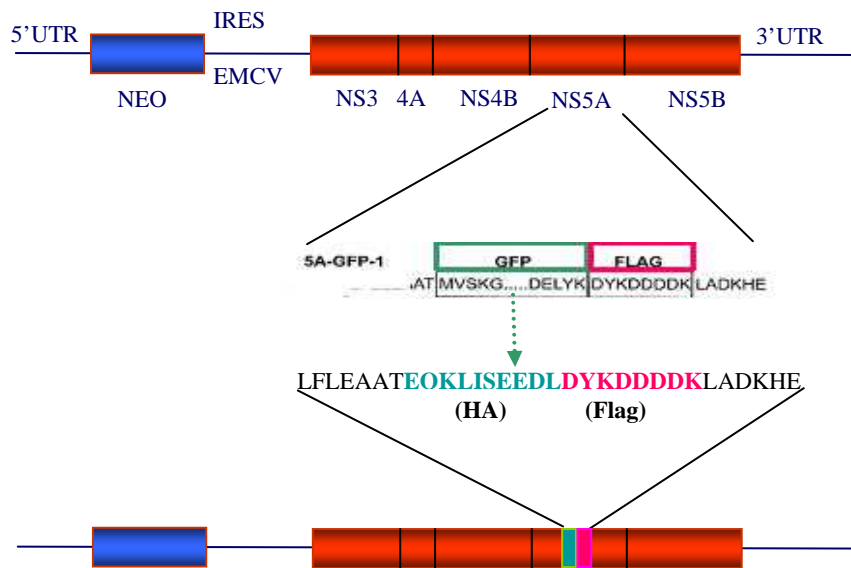
#### 4.7 Identificazione di proteine cellulari che interagiscono con la proteina non strutturale 5A di HCV tramite esperimenti di doppia immunoprecipitazione

Avendo a disposizione un replicone modificato in modo tale da esprimere una proteina NS5A con al suo interno due *tag*, è stato possibile, utilizzando anticorpi commerciali coniugati con sfere di agarosio diretti contro il Flag-*tag* e l'HA-*tag*, precipitare la stessa proteina (NS5A). Questo mi ha permesso, come nel caso del TAP, di ridurre enormemente le interazioni aspecifiche. Inoltre, proprio perché la proteina si trova in presenza delle altre proteine non strutturali, è ragionevole credere che, in queste condizioni, si venga a formare il complesso associato alle membrane che permette la replicazione virale.

Inoltre, diversamente dagli esperimenti di purificazione descritti precedentemente, in questo caso le immunoprecipitazioni sono state condotte non su estratti proteici totali, ma in seguito a frazionamento subcellulare. Il lavoro di Hardy R.W. e colleghi infatti, ha dimostrato che la replicazione del virus dell'epatite C si concentra in frazioni di membrana che possono essere facilmente separate dalla frazione citosolica, come viene descritto nello stesso lavoro e nella parte sperimentale di questa tesi (Par.3.3.7) (Hardy R.W. *et al.*, 2003).

Per il mio esperimento ho quindi separato le due frazioni, citosolica e di membrana, partendo da cellule Rep60 NS5A HA-Flag, e dopo aver controllato un'effettiva presenza in quantità elevata delle proteine virali nella frazione di membrana, ho utilizzato questa frazione per gli esperimenti di immunoprecipitazione.

Dopo aver lisato le cellule (Rep60 NS5A HA-Flag) e separato la frazione di membrana, questa è stata lisata con un buffer contenente n-dodecil- $\beta$ -D-maltoside, un detergente noto per preservare i complessi di membrana. Recuperati i lisati ho condotto la purificazione come da protocollo; un primo legame avviene utilizzando un anticorpo anti-Flag coniugato con una resina di agarosio, seguito da eluizione dei complessi utilizzando un peptide (Flag) che compete per il legame all'anticorpo. Il secondo legame avviene utilizzando come antigene il *tag* HA. Anche in questo caso l'anticorpo è coniugato ad una resina di agarosio, ed anche in questo caso segue un'eluizione tramite peptide (HA).



*Figura 4.11:*  
Schema inserimento dei due tag (Flag e HA) nel replicone di HCV all'interno della sequenza che codifica per la proteina NS5A  
 Descrizione del clonaggio nel testo.  
 (Moradpour D. *et al.*, 2004)

A questo punto i campioni sono stati risolti su gel di poliacrilammide (SDS PAGE).

Per analizzare le proteine co-precipitate con la proteina virale, dopo aver risolto i campioni su gel, ed averlo fissato, lo coloro con colorante fluorescente Sypro Ruby per tutta la notte. Il gel viene quindi decolorato ed esaminato agli UV perché le bande siano visibili. Dal confronto fra il controllo (Rep60) che esprime la proteina NS5A non modificata e le cellule che esprimono NS5A fusa con i due tag, possiamo osservare come prima cosa la presenza di diverse bande di interesse (Fig.4.12) Inoltre, se paragoniamo questo gel a quello ottenuto dagli esperimenti su NS5A-TAP (Fig.4.3) è possibile notare una maggiore complessità di interattori.

L'identificazione delle proteine di interesse viene operata, come sopra, attraverso spettrometria di massa MALDI-ToF-ToF (“*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight- time-of-flight*”).

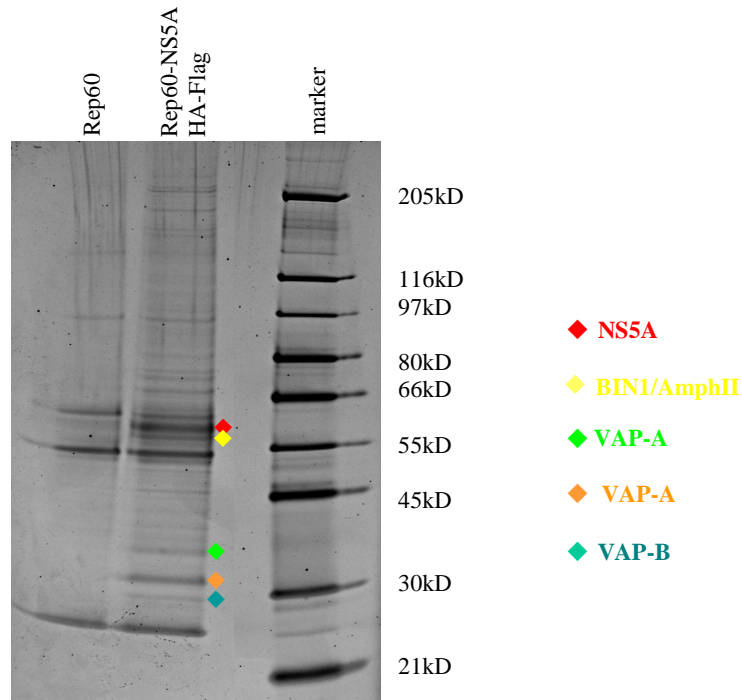


Figura 4.12:

Identificazione di proteine cellulari che interagiscono con la proteina non strutturale 5A di HCV tramite esperimenti di doppia immunoprecipitazione

Utilizzando il doppio *tag* (HA-Flag) inserito all'interno della sequenza che codifica per NS5A è possibile purificare i complessi proteici ad esso associati utilizzando i due *tag* come antigeni in una doppia immunoprecipitazione. Le Rep60 sono utilizzate come controllo, poiché esprimono la proteina virale NS5A non modificata.

Le bande segnate con il simbolo (◆) rappresentano le proteine ad oggi identificate; riportate in figura (a dx).

Come prima cosa per controllo ho identificato la proteina virale NS5A (banda ◆ in fig.4.12), e la sua identificazione ha confermato che si trattava della proteina di HCV.



Fino ad oggi è stato possibile identificare con certezza solo alcune delle bande prese in esame;

- 1) BIN1/AmphII (banda ◆ in fig.4.12),
- 2-3) VAP-A (banda ◆ - ◆ in fig.4.12),
- 4) VAP-B (banda ◆ in fig.4.12).

La proteina BIN1 era già stata descritta in letteratura come interattore di NS5A (Zech B. *et al.*, 2003), ed anche i nostri esperimenti di TAP avevano isolato ed identificato la proteina. Anche le proteine hVAP sono già note in letteratura interagire non solo con NS5A, ma anche con la polimerasi del virus (Tu H. *et al.*, 1999, Gao L. *et al.*, 2004, Hamamoti I. *et al.*, 2005). Quello che comunque è interessante notare è che le proteine VAP sono proteine di membrana descritte interagire con le proteine di HCV proprio allo scopo di mantenere il complesso di replicazione del virus associato alle membrane del reticolo.

Questo mi permette quindi di affermare che in questo caso si stanno analizzando le interazioni di NS5A presente nel complesso di replicazione di HCV, cioè con la proteina attiva e funzionale; diversamente da quanto avviene esprimendo la proteina da sola.

Le altre bande di interesse non sono state per ora identificate con certezza ed il loro studio è ancora in fase di analisi.

## 5. Discussione

Il mio progetto è consistito nello studio delle interazioni fra la proteina non strutturale 5A (NS5A) del virus dell'epatite C (HCV) e le proteine cellulari.

Le conoscenze attuali sulla biologia molecolare del virus, sul suo ciclo vitale e sulla patologia ad esso associata sono ancora limitate. Poco si sa di fatto sulle varie fasi della replicazione di HCV all'interno della cellula ospite o su come il virus causi i danni epatici associati all'infezione. Inoltre per alcune delle proteine virali, quali la stessa NS5A, non è stata ancora definita una funzione; rimane quindi non noto il loro ruolo durante l'infezione. D'altra parte NS5A, come descritto nell'introduzione, è comunque indispensabile al virus per replicare nella cellula ospite.

La percentuale di persone infettate da HCV nel mondo è ancora elevata, alla fine del secolo si stimava che circa 170 milioni di persone fossero infettate dal virus (Alter H.J., 1999), e questo numero è oggi in continuo aumento. Inoltre a tutt'oggi la sola terapia possibile per il trattamento dell'epatite C è rappresentata da alte dosi di interferone di tipo I- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), o di una molecola di interferone modificata (PEG-IFN- $\alpha$ ), più stabile, da solo o in combinazione con un analogo nucleosidico della guanosina, la ribavirina. D'altra parte, solo il 40-50% dei pazienti sembrano rispondere positivamente al trattamento, che può causare in alcuni casi anche gravi effetti collaterali (Lavanchy D. *et al.*, 1999, Feld J.J. e Hoofnagle J.H, 2005). Inoltre, il successo di questa terapia è strettamente legato al genotipo virale del virus che si va' a trattare, e mentre alcuni genotipi, e quindi alcuni pazienti, rispondono positivamente al trattamento antivirale, altri hanno una risposta minima, se non del tutto assente (Feld J.J. e Hoofnagle J.H, 2005).

La mancanza di informazioni sul ciclo vitale di HCV e sulla patologia da esso indotta, e la necessità di trovare nuove e specifiche terapie, giustifica la ricerca di eventuali fattori cellulari che interagiscono con il virus. Evidenziare tali interazioni potrebbe infatti fornire importanti informazioni sul virus e su come questo si replica. Diversi dati mostrano oltre a ciò che il virus per replicarsi forma un complesso replicativo al quale prendono parte proteine virali e proteine cellulari. Alcuni di questi fattori cellulari sono già stati identificati, come descritto nell'introduzione, ed altri sono sicuramente ancora da identificare. L'identificazione di proteine cellulari che interagiscono con la proteina virale NS5A potrebbe inoltre fornire importanti informazioni sulla funzione della proteina che non risulta ancora nota.

La strategia utilizzata in questo lavoro è stata inizialmente quella di isolare gli eventuali interattori della proteina virale con la metodologia del TAP (*Tandem Affinity Purification*), messa a punto nel 1999 (Rigaut G. *et al.*, 1999). Tramite PCR il gene che codifica per la proteina virale di interesse è stato amplificato e clonato all'interno di un vettore retrovirale (pLBCX), nel quale era già stata inserita la sequenza che codifica per il TAP-tag. Se il clonaggio avviene "*in frame*", questo costrutto permette di esprimere, attraverso la produzione di progenie virale e la successiva infezione, una proteina di fusione fra la proteina NS5A ed il TAP-tag, all'interno delle cellule infettate, nello specifico cellule di epatoma umano Huh7. Avendo a disposizione a questo punto cellule che producono una quantità elevata di proteina virale ho potuto allestire esperimenti di immunoprecipitazione con la metodica del TAP al fine di identificare interazioni della proteina virale NS5A con eventuali proteine cellulari.

La metodologia del TAP permette di isolare proteine che interagiscono con una proteina di interesse con una specificità molto elevata. Si basa infatti sulla fusione della proteina nota, nel nostro caso NS5A, non con un unico "*tag*", ma con due "*tag*". Il TAP tag consiste infatti di un dominio legante le IgG (proteina A, ProtA) e di un peptide legante la calmodulina (CBP; *Calmodulin Binding Protein*), separati da un sito di taglio per la proteasi del virus del mosaico del tabacco (TEV). Entrambi questi *tag* sono stati selezionati per la loro alta efficienza. Questo permette di eliminare tutte le interazioni non specifiche, potendo contare su due diverse purificazioni sequenziali (Fig.3.1).

Le prime prove sono state condotte su cellule Huh7 infettate con il retrovirus che produce la proteina virale NS5A, che ricordiamo essere indispensabile per la replicazione del virus, sebbene non se ne conosce ancora la specifica funzione. Le proteine di interesse, evidenziate tramite colorazione con Sypro Ruby dopo aver risolto i campioni isolati su gel di poliaccrilammide (SDS PAGE), sono state digerite con tripsina ed analizzate tramite spettrometria di massa MALDI-ToF-ToF. Tramite questa metodica è stato possibile identificare diverse proteine che interagiscono con la proteina virale. NS5A interagirebbe con lo chaperone cellulare Grp78/Bip e con due diverse isoforme della proteina BIN1/AmphII.

La proteina BIN1 era già stata identificata come interattore di NS5A da un precedente studio nel 2003 (Zech B. *et al.*, 2003). In un ulteriore lavoro viene inoltre dimostrato che l'interazione della proteina cellulare con la proteina di HCV porterebbe ad una inibizione della fosforilazione di NS5A (Masumi A. *et al.*, 2005). Nelle mie indagini, condotte con il sistema del

replicone, che mi permette di osservare e controllare eventuali alterazioni della replicazione di HCV in seguito alla modulazione di proteine cellulari, ho condotto degli studi modulando l'espressione della proteina BIN1/AmphII, aumentandone e diminuendone i livelli di espressione. Questi esperimenti dimostrano però che nessuna variazione, positiva o negativa, dei livelli di espressione della proteina cellulare, comportano alterazioni nella traduzione e nella replicazione del virus dell'epatite C (Fig.4.6). Questo suggerisce un ruolo per BIN1/AmphII non direttamente legato alla replicazione virale. Con il nuovo sistema di studio per HCV, descritto nell'introduzione (Par.1.5.5), che permette la formazione di progenie virale efficiente sarà possibile lo studio anche delle altre fasi dell'infezione, quali ingresso o rilascio di particelle virali, che potrebbero invece essere influenzate dalla modulazione della proteina cellulare BIN1/AmphII; e che è impossibile studiare con il sistema del replicone. Se BIN1/AmphII non sembra influenzare l'attività della proteina virale, potrebbe al contrario essere NS5A ad influenzare la funzione della proteina cellulare. A tal proposito, NS5A sembra poter modulare la funzione proapoptotica di BIN1/AmphII (Nanda S.K. *et al.*, 2006). Questo può far ipotizzare che l'interazione BIN1/NS5A possa prevenire l'attivazione della morte per apoptosi avviata in una cellula infettata con il fine di permettere la sopravvivenza del virus e la produzione di particelle virali.

Gli stessi esperimenti di modulazione di espressione sono stati condotti per l'altro interattore identificato, la proteina cellulare Grp78/Bip. Come descritto nell'introduzione (Par.1.7), Grp78 è una proteina multifunzionale, residente nel lume del reticolo endoplasmatico (ER), che ha come principale funzione quella di legare proteine nascenti e facilitarne il corretto ripiegamento. Come già illustrato inoltre la proteina cellulare lega tre "sensori" presenti sulla membrana del reticolo che attivano una serie di risposte cellulari quando la cellula è sottoposta a diversi tipi di stress (Zhang K. and Kaufman R., 2004) (Fig.1.11-1.12). Nell'introduzione abbiamo anche sottolineato come la replicazione del virus dell'epatite C produce essa stessa uno stress nella cellula all'interno della quale replica, comportando l'attivazione della risposta UPR ("*Unfolded Proteins Response*") (Fig.1.13); la stessa risposta che si attiva quando si accumulano nella cellula proteine da ripiegare in eccesso. Molti studi infatti dimostrano che la replicazione di HCV avviene sulle membrane intracellulari, molto probabilmente membrane correlate al reticolo endoplasmatico (Shi S.T. *et al.*, 2003; Miyanari Y. *et al.*, 2003). Le proteine virali non strutturali di fatto formano un complesso di replicazione associato a queste membrane (Egger D. *et al.*, 2002). La

replicazione virale quindi perturba la normale funzione del ER ed induce appunto “ER stress” e risposta UPR, anche se d'altra parte il virus HCV sembra bloccare alcune vie di questa risposta (Introduzione, Par.1.7.1-Fig.1.13). Inoltre, HCV altera l'omeostasi del calcio inducendo nella cellula stress ossidativo (Introduzione Par.1.7.2-Fig.1.14). D'altra parte, come HCV manipoli la risposta cellulare all'ER stress per promuovere la sua esistenza all'interno della cellula non è ancora noto.

In questo lavoro ho dimostrato che NS5A (HCV) interagisce con Grp78/Bip in cellule che esprimono unicamente questa proteina virale. L'interazione potrebbe rappresentare parte del meccanismo responsabile dell'inibizione dell'ER stress per favorire la persistenza di HCV nella cellula ospite, oppure potrebbe essere parte della risposta cellulare antivirale.

I risultati riportati in questa tesi dimostrano che l'induzione di ER stress regola negativamente l'espressione delle proteine virali (Fig.4.8), e che Grp78/Bip è richiesto per questo effetto antivirale. Se infatti, attraverso si-RNA blocchiamo l'aumento di espressione della proteina Grp78/Bip in seguito a trattamento con tunicamicina, anche la regolazione negativa dell'espressione delle proteine di HCV viene bloccata (Fig.4.9).

Quello che rimane ancora da chiarire però è se l'interazione fra NS5A e Grp78 sia effettivamente richiesta per l'inibizione di HCV o se Grp78 agisca per via indiretta, attraverso per esempio altri fattori cellulari residenti nel reticolo capaci di inibire l'espressione del virus. L'osservazione che l'inibizione di HCV avviene principalmente a livello dell'espressione proteica porterebbe a pensare che Grp78 possa regolare la sintesi delle proteine virali. E' molto interessante a tale proposito notare che la proteina virale NS5A è stata mostrata legare ed inibire la protein chinasi R (PKR), una chinasi attivata dalla presenza di RNA a doppio filamento e responsabile della fosforilazione del fattore di inizio traduzione eIF-2 $\alpha$ , della sua inattivazione e della conseguente inibizione della sintesi proteica (Gale M.J. *et al.*, 1997; Gale M.J. *et al.*, 1998). PKR per di più mostra una elevata omologia di sequenza con PERK, proteina indotta da ER stress, anch'essa chinasi di eIF-2 $\alpha$ . Potrebbe quindi essere interessante valutare se NS5A sia in grado di legare ed inibire anche PERK, come PKR, e se Grp78/Bip interagendo con NS5A possa in qualche modo prevenire questa inibizione e non permettere per esempio a PERK di bloccare la traduzione di HCV, dipendente anch'essa dal fattore di traduzione cellulare eIF-2 $\alpha$ .

Inoltre, si potrebbe contestare che le due proteine che ho mostrato interagire (Grp78/Bip ed NS5A) hanno una diversa localizzazione all'interno della cellula. Grp78/Bip infatti viene descritta generalmente come proteina

residente nel lume del reticolo, mentre NS5A è ancorata alla regione esterna della membrana del reticolo endoplasmatico. Interessantemente però, un recente lavoro di Reddy R.K e collaboratori ha dimostrato che Grp78/Bip interagisce con la caspasi-7 e proprio attraverso questa interazione potrebbe modulare negativamente l'apoptosi. Per mezzo di questo legame lo chaperone cellulare riuscirebbe infatti ad inibire l'attività della caspasi ed a modulare la morte cellulare programmata (Reddy R.K. et al., 2003). Come NS5A, la caspasi-7 è una proteina localizzata sul lato esterno del reticolo, diversamente da quanto si ritiene per Grp78/Bip. La spiegazione per questa apparente contraddizione risiede nel fatto che potrebbe esserci una sottopopolazione di Grp78/Bip capace di esistere come proteina transmembrana nel ER e capace quindi di interagire con la caspasi-7 attraverso la porzione esposta nel citoplasma. Questi risultati corroborano l'ipotesi che anche l'interazione di Grp78 con NS5A potrebbe avvenire nello stesso modo. Basandosi su questa osservazione si potrebbe inoltre speculare che HCV possa modulare la via di morte cellulare per apoptosi attraverso la modulazione proprio del legame Grp78/caspasi-7 tramite NS5A, al fine di promuovere la sopravvivenza o la morte della cellula ospite nelle diverse fasi dell'infezione.

Gli esperimenti di isolamento degli interattori eseguiti in questa prima parte sono stati tutti condotti con la metodologia del TAP. Questa metodica consente, come già più volte ho sottolineato, di avere delle purificazioni molto specifiche ed efficaci, basandosi sull'utilizzo di due diversi *tag* altamente efficienti e quindi di due diverse purificazioni. D'altro canto però questa metodica permette di esprimere la proteina virale presa in esame isolatamente, e non nel complesso delle altre proteine virali. Poiché, come descritto ormai da diversi studi, le proteine non strutturali del virus dell'epatite C formano un complesso di replicazione ben organizzato ed associato alle membrane cellulari (Lin C. *et al.*, 1997; Schmidt-Mende J. *et al.*, 2001), è lecito pensare che in assenza delle altre proteine di HCV sia altamente probabile che la proteina NS5A non riesca ad associarsi alle membrane e non possa quindi svolgere pienamente la sua funzione. Gli studi condotti quindi analizzando la proteina espressa singolarmente non tengono conto, in qualche modo, del suo effettivo ruolo nel ciclo vitale di HCV e della sua "normale" funzione. Questa ipotesi è supportata anche dall'analisi tramite fluorescenza della localizzazione della proteina NS5A in presenza ed in assenza delle altre proteine virali del complesso. Esaminando infatti tramite immunofluorescenza la localizzazione di NS5A espressa singolarmente è possibile vedere come questa sia in gran parte differente

dalla localizzazione che assume in presenza del complesso delle altre proteine virali (Fig.4.10). Questo sottolinea ancora di più quanto affermato in precedenza; NS5A senza le altre proteine virali sembra rimanere diffuso nel citoplasma, mentre nel complesso delle altre proteine assume una localizzazione più discreta “*a spot*”. Per questo è stato interessante analizzare l’interazioni di NS5A con le proteine cellulari in un complesso più fisiologico, in presenza delle altre proteine virali. Oltre a ciò, molti studi indicano che il complesso formato dalle proteine non strutturali del virus, molto probabilmente, contiene anche proteine cellulari (Ishido S. *et al.*, 1998; Lohmann V. *et al.*, 1997; Schmidt-Mende J. *et al.*, 2001; Piccinini S. *et al.*, 2002).

La mancanza di buoni anticorpi specifici per la proteina virale da utilizzare per esperimenti di immunoprecipitazione però non mi ha permesso di analizzare queste interazioni isolando direttamente la proteina NS5A; sono riuscita tuttavia a mettere a punto una tecnica che mi ha permesso di immunoprecipitare la proteina NS5A prodotta dal replicone, inserendo nel replicone, nella sequenza che codifica per la proteina stessa, due sequenze che codificano per due diversi *tag* (HA-*tag* e Flag-*tag*) (Fig.4.11). Questo mi ha consentito di utilizzare anticorpi anti-HA ed anti-Flag, disponibili in commercio, per immunoprecipitare NS5A, ed avendo a disposizione due diversi *tag* è stato possibile allestire una immunoprecipitazione doppia, molto simile alla metodica del TAP.

La purificazione degli interattori cellulari di NS5A utilizzando questo replicone modificato mi ha permesso di avere innanzitutto un pattern di proteine molto più complesso rispetto a quello purificato per TAP. Al momento solo alcune delle bande sono state analizzate ed identificate con successo. Una prima analisi conferma l’interazione di NS5A con BIN1/AmphII, ma, cosa ancora più interessante, identifica come interattori della proteina virale una serie di proteine VAP o VAMP (“*Vesicle-Associated Membrane Protein*”) (Fig.4.12). Anche queste proteine sono già state descritte in letteratura interagire non solo con NS5A, ma anche con la polimerasi del virus (NS5B) (Tu H. *et al.*, 1999, Gao L. *et al.*, 2004, Hamamoto I. *et al.*, 2005). Quello che comunque è importante notare è che le proteine VAP sono proteine di membrana descritte interagire con le proteine di HCV proprio allo scopo di mantenere il complesso di replicazione del virus associato alle membrane del reticolo (Fig.1.10).

Questo mi permette quindi di affermare con sicurezza che in questo caso si sta analizzando la funzione di NS5A in associazione con il complesso di

replicazione di HCV, cioè con la proteina attiva e funzionale; diversamente da quanto avviene esprimendo la proteina da sola.

Le altre bande di interesse non sono state per ora identificate con certezza ed il loro studio è ancora in fase di analisi, ma la possibilità di avere adesso a disposizione un sistema per studiare le interazioni fra le proteine virali e quelle cellulari nel contesto “fisiologico” del complesso di replicazione di HCV associato alle membrane, comporta sicuramente nuove prospettive e nuove possibilità future. Tramite questa tecnica potrebbe essere infatti possibile identificare proteine cellulari che prendono parte al complesso di replicazione virale ed utilizzarli eventualmente come bersagli per una terapia specifica per il virus dell’epatite che si basi, per esempio, sull’inibizione proprio della formazione del complesso di replicazione stesso.



## 6. Bibliografia

**Agnello V., Abel G., Elfahal M., Knight G.B. and Zhang Q.X.** (1999). Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **96**:12766-12771.

**Aizaki H., Lee K.J., Sung V.M., Ishiko H. and Lai M.M.** (2004). Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* **324**:450-461.

**Ali N. and Siddiqui A.** (1995). Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *Journal of Virology* **69**:6367-6375.

**Alter H.** (1999). Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. *The American Journal of Medicine* **107**:16-20.

**Alter H.J., Purcell R.H., Holland P.V. and Popper H.** (1978). Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **1**:459-463.

**Arima N., Kao C.Y., Licht T., Padmanabhan R., Sasaguri Y. and Padmanabhan R.** (2001). Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Journal of Biological Chemistry* **276**:12675-12684.

**Asabe S-I., Tanji Y., Satoh S., Kaneko T., Kimura K. and Shimotohno K.** (1997). The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *Journal of Virology* **71**:790-796.

**Bartenschlager R., Ahlborn-Laake L., Mous J. and Jacobsen H.** (1994). Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *Journal of Virology* **68**:5045-5055.

**Bartenschlager R. and Lohmann V.** (2000). Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* **81**:1631-1648.

**Bartenschlager R. and Lohmann V.** (2001). Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral research* **52**:1-17.

**Bartenschlager R., Lohmann V., Wilkinson T. and Koch J.O.** (1995). Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *Journal of Virology* **69**:7519-7528.

**Benali-Furet N.L., Chami M., Houel L., De Giorgi F., Vernejoul F., Lagorce D., Buscali L., Bartenschlager R., Ichas F., Rizzuto R. and Paterlini-Brechot P.** (2005). Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene* **24**:4921-4933.

**Bilodeau P.S., Domsic J.K., Mayeda A., Krainer A.R. and Stoltzfus C.M.** (2001). RNA splicing at human immunodeficiency virus type 1 3' splice site A2 is regulated by binding of hnRNP A/B proteins to an exonic splicing silencer element. *Journal of Virology* **75**:8487-8497.

**Blight K.J., Kolykhalov A.A. and Rice C.M.** (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**:1972-1974.

**Blyn L.B., Swiderek K.M., Richards O., Stahl D.C., Semler B.L. and Ehrenfeld E.** (1996). Poly(rC) binding protein 2 binds to stem-loop IV of the poliovirus RNA 5' noncoding region: identification by automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **93**:11115-11120.

**Blyn L.B., Towner J.S., Semler B.L. and Ehrenfeld E.** (1997). Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *Journal of Virology* **71**:6243-6246.

**Borowski P., Oehlmann K., Heiland M. and Laufs R.** (1997). Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Virology* **71**:2838-2843.

**Brass V., Bieck E., Montserret R., Wolk B., Hellings J.A., Blum H.E., Penin F. and Moradpour D.** (2002). An amino-terminal amphipathic  $\alpha$ -helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *Journal of Biological Chemistry* **277**:8130-8139.

**Breiman A., Grandvaux N., Lin R., Ottone C., Akira S., Yonevama M., Fujita T., Hiscott J. and Meurs E.F.** (2005). Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *Journal of Virology* **79**:3969-3978.

**Carrère-Kremer S., Montpellier-Pala C., Cocquerel L., Wychowski C., Penin F. and Dubuisson J.** (2002). Subcellular localization and topology of p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **76**:3720-3730.

**Chang J., Yang S.H., Cho Y.G., Hwang S.B., Hahn Y.S. and Sung Y.C.** (1998). Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *Journal of Virology* **72**:3060-3065.

**Chen C.M., You L.R., Hwang L.H. and Lee Y.H.** (1997). Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *Journal of Virology* **71**:9417-9426.

**Cheng J.C., Chang M.F., Chang S.C.** (1999). Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *Journal of Virology* **73**:7044-7049.

**Cho J.W., Baek W.K., Suh S.I., Yang S.H., Chang J., Sung Y.C. and Suh M.H.** (2001). Hepatitis C virus core protein promotes cell proliferation through the upregulation of cyclin E expression levels. *Liver* **21**:137-142.

**Cho H.S., Ha N.C., Kang L.W., Chung K.M., Baek S.H., Jang S.K. and Oh B.H.** (1998). Crystal structure of RNA helicase from genotype 1b

hepatitis C virus. A feasible mechanism of unwinding duplex RNA. *Journal of Biological Chemistry* **273**:15045-15052.

**Choi Y.W., Tan Y.J., Lim S.G., Hong W. and Goh P.Y.** (2004). Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *Biochemical Biophysical Research Communication* **318**:514-519.

**Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W. and Houghton M.** (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**:359-362.

**Chung R.T. and Kaplan L.M.** (1999). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I (hnRNP-I/PTB) selectively binds the conserved 3' terminus of hepatitis C viral RNA. *Biochemical Biophysical Research Communication* **254**:351-362.

**Chung R.T., Shen Y. and Hendershot L.M.** (2002). BAP, a mammalian BIP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BIP. *Journal of Biological Chemistry* **277**:47557-47563.

**Chung Y.L., Sheu M.L. and Yen S.H.** (2003). Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **107**:65-73.

**Cocquerel L., Duvet S., Meunier J.C., Pillez A., Cacan R., Wychowski C. and Dubuisson J.** (1999). The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **73**:2641-2649.

**Cribier B., Schmitt C., Bingen A., Kirn A. and Keller F.** (1995). In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *Journal of General Virology* **76**:2485-2491.

**Dejgaard K., Leffers H., Rasmussen H.H., Madsen P., Kruse T.A., Gesser B., Nielsen H. and Celis J.E.** (1994). Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP K proteins derived by alternative splicing. *Journal of Molecular Biology* **236**:33-48.

**Dreyfuss G., Choi Y.D. and Adam S.A.** (1984). Characterization of heterogeneous nuclear RNA protein complexes in vivo with monoclonal antibodies. *Molecular Cell Biology* **4**:1104-1114.

**Dreyfuss G., Kim V.N. and Kataoka N.** (2002). Messenger-RNA-binding protein and the messages they carry. *Molecular Cell Biology* **3**:195-205.

**Duvet S., Cocquerel L., Pillez A., Cacan R., Verbert A., Moradpour D., Wychowski C. and Dubuisson J.** (1998). Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *Journal of Biological Chemistry* **273**:32088-32095.

**Egger D., Wolk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H.E., Moradpour D. and Bienz K.** (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology* **76**:5974-5984.

**Elazar M., Cheong K.H., Liu P., Greenberg H.B., Rice C.M. and Glenn J.S.** (2003). Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology* **77**:6055-6061.

**Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., Kurasaki M., Muratami T., Yamamoto C., Izumi N., Marumo F. and Sato C.** (1995). Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitution in the NS5A region. *The Journal of Clinical Investigation* **96**:224-230.

**Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., Kurasaki M., Muratami T., Yamamoto C., Ogura Y., Izumi N., Marumo F. and Sato C.** (1996). Mutation in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *The New England Journal of Medicine* **334**:77-81.

**Failla C., Tomei L. and De Francesco R.** (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Journal of Virology* **68**:3753-3760.

**Failla C., Tomei L. and De Francesco R.** (1995). An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *Journal of Virology* **69**:1769-1777.

**Farci P., Shimoda A., Coiana A., Diaz G., Peddis G., Melpolder J.C., Strazzer A., Chien D.Y., Munoz S.J., Balestrieri A., Purcell R.H. and Alter H.J.** (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of viral quasispecies. *Science* **288**:339-34.

**Farci P., Shimoda A., Wong D., Cabezon T., De Gioannis D., Strazzer A., Shimizu Y., Shapiro M., Alter H.J. and Purcell R.H.** (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **93**:15394-15399.

**Feinstone S.M., Mihalik K.B., Kamimura T., Alter H.J., London W.T. and Purcell R.H.** (1983). Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infection and Immunity* **41**:816-821.

**Feld J.J. and Hoofnagle J.H.** (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**:967-972.

**Ferreon J.C., Ferreon A.C., Li K. and Lemon S.M.** (2005) Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *The Journal of Biological Chemistry* **280**:20483-20492.

**Flajolet M., Rotondo G., Daviet L., Bergametti F., Inchauspé G., Tiollais P., Transy C. and Legrain P.** (2000). A genomic approach of hepatitis C virus generates a protein interaction map. *Gene* **242**:369-379.

**Flint M., Maidens C., Loomis-Price L.D., Shotton C., Dubuisson J., Monk P., Higginbottom A., Levy S. and McKeating J.A.** (1999a). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *Journal of Virology* **73**:6235-6244.

**Flint M., Thomas J.M., Maidens C., Shotton C., Levy S., Barclay W.S. and McKeating J.A.** (1999b). Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of Virology* **73**:6782-6790.

**Fournier C., Sureau C., Coste J., Ducos J., Pageaux G., Larrey D., Domergue J. and Maurel P.** (1998). In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *Journal of General Virology* **79**:2367-2374.

**Foy E., Li K., Wang C., Sumpter R Jr., Ikeda M., Lemon S.M. and Gale M. Jr.** (2003). Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* **300**:1145-1148

**Foy E., Li K., Sumpter R Jr., Loo Y.M., Johnson C.L., Wang C., Fish P.M., Yoneyama M., Fujita T., Lemon S.M. and Gale M. Jr.** (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **102**:2986-2991.

**Friebe P., Lohmann V., Krieger N. and Bartenschlager R.** (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *Journal of Virology* **75**:12047-12057.

**Friebe P. and Bartenschlager R.** (2002). Genetic analysis of sequences in 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of Virology* **76**:5326-5338.

**Gale M.Jr., Blakely C.M., Kwieciszewski B., Tan S-L., Dossett M., Tang N.M., Korth M., Polyak S.J., Gretch D.R and Katze M.G.** (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanism of kinase regulation. *Molecular and Cellular Biology* **18**:5208-5218.

**Gale M.Jr., Korth M.J., Tang N.M., Tan S.L., Hopkins D.A., Dever T.E., Polyak S.J., Gretch D.R. and Katze M.G.** (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of

the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* **230**:217-227.

**Gale M.Jr., Kwieciszewski B., Dossett M., Nakao H. and Katze M.G.** (1999). Antiapoptotic and oncogenic potential of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *Journal of Virology* **73**:6506-6516.

**Gamarnik A.V. and Andino R.** (1997). Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *RNA* **3**:882-892.

**Gamarnik A.V. and Andino R.** (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Gene and Development* **12**:2293-2304.

**Gao L., Tu H., Shi S.T., Lee K.J., Asanaka ;., Hwang S.B., and Lai M.M.** (2003). Interaction with a ubiquitin-like protein enhances the ubiquitination and degradation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology* **77**:4149-4159.

**Gao L., Aizaki H., He J.W. and Lai M.M.** (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology* **78**:3480-3488.

**Giménez-Barcons M., Franco S., Suarez Y., Fornis X., Ampurdanès S., Puig-Basagoiti F., Sanchez-Fueyo A., Barrera J-M., Llovet J-M., Bruix J., Sanchez-Tapias J-M., Rodés J. and Saiz J-C.** (2001). High amino acid variability within the NS5A of hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV-1b-related cirrhosis. *Hepatology* **34**:158-167.

**Ghosh A.K., Steele R., Meyer K., Ray R. and Ray R.B.** (1999). Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *Journal of General Virology* **80**:1179-1183.

**Ghosh A.K., Majumder M., Steele R., Yaciuk P., Chrivia J., Ray R. and Ray R.B.** (2000). Hepatitis C virus NS5A protein modulates



transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *The Journal of Biological Chemistry* **275**:7184-7188.

**Gong G., Waris G., Tanveer R. and Siddiqui A.** (2001). Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- $\kappa$ B. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **98**:9599-9604.

**Gontarek R.R., Gutshall L.L., Herold K.M., Tsai J., Sathe G.M., Mao J., Prescott C. and Del Vecchio A.M.** (1999). hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3' NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic Acids Research* **27**:1457-1463.

**Goodbourn S., Didcock L. and Randall R.E.** (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* **81**:2341-2364.

**Gorbalenya A. and Snijder E.J.** (1998). Viral cysteine proteinases. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **6**:64-86.

**Graff J., Cha J., Blyn L.B. and Ehrenfeld E.** (1998). Interaction of poly(rC) binding protein 2 with the 5' noncoding region of hepatitis A virus RNA and its effects on translation. *Journal of Virology* **72**:9668-9675.

**Grakoui A., McCourt D.W., Wychowski C., Feinstone S.M. and Rice C.M.** (1993a). Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *Journal of Virology* **67**:2832-2843.

**Grakoui A., McCourt D.W., Wychowski C., Feinstone S.M. and Rice C.M.** (1993b). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **90**:10583-10587.

**Grakoui A., Hanson H.L. and Rice C.M.** (2001). Bad time for Bonzo? Experimental models of hepatitis C virus infection, replication, and pathogenesis. *Hepatology* **33**:489-495.

**Graves P.R. and Haystead T.A.J.** (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**:39-63.

**Guo J-T., Bichko V.V. and Seeger C.** (2001). Effect of alpha interferon on hepatitis C virus replicon. *Journal of Virology* **75**:8516-8523.

**Gwack Y., Kim D.W., Han J.H. and Choe J.** (1996). Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of hepatitis C virus NS3 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **225**:654-659.

**Hahm B., Kim Y.K., Kim J.H., Kim T.Y. and Jang S.K.** (1998). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **72**:8782-8788.

**Halliwell B.** (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* **31**:261-272.

**Hamamoto I., Nishimura Y., Okamoto T., Aizaki H., Liu M., Mori Y., Abe T., Suzuki T., Lai M.M., Miyamura T., Moriishi K. and Matsuura Y.** (2005). Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *Journal of Virology* **79**:13473-13482.

**Harding H.P., Zhang Y., Bertolotti A., Zeng H. and Ron D.** (2000-a). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cells* **5**:897-904.

**Harding H.P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M. and Ron D.** (2000-b). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cells* **6**:1099-1108.

**Hardy R.W., Marcotrigiano J., Blight K.J., majors J.E. and Rice C.M.** (2003). Hepatitis C virus RNA synthesis in a cell-free system isolated from replicon-containing hepatoma cells. *Journal of Virology* **77**:2029-2037.

**He L.F., Alling D., Popkin T., Shapiro M., Alter H.J. and Purcell R.H.** (1987). Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *The Journal of Infectious Diseases* **156**:636-640.

**He Y., Nakao H., Tan S.L., Polyak S.J., Neddermann P., Vijavri S., Jacobs B.L. and Katze M.G.** (2002). Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Virology* **76**:9207-9217.

**Heim M.H., Moradpour D. and Blum H.E.** (1999). Expression of hepatitis C virus protein inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *Journal of Virology* **73**:8469-8475.

**Hidajat R., Nagano-fujii M., Deng L., Tanaka M., Takigawa Y., Kitazawa S. and Hotta H.** (2005). Hepatitis C virus NS3 protein interacts with ELKS- $\delta$  and ELKS- $\alpha$ , members of a novel protein family involved in intracellular transport and secretory pathways. *Journal of General Virology* **86**:2197-2208.

**Hijikata M., Kato N., Ootsuyama Y., Nakagawa M. and Shimotohno K.** (1991). Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **88**:5547-5551.

**Hijikata M., Mizushima H., Akagi T., Mori S., Kakiuchi N., Kato N., Tanaka K., Kimura K. and Shimotohno K.** (1993a). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **67**:4665-4675.

**Hijikata M., Mizushima H., Tanji Y., Comoda Y., Hirowatari Y., Akagi T., Kato N., Kimura K. and Shimotohno K.** (1993b). Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **90**:10773-10777.

**Hong Ji., Fraser C.S., Yu Y., Leary J. and Doudna J.A.** (2004). Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **101**:16990-16995.

**Houshmand H. and Bergqvist A.** (2003). Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **309**:695-701.

**Howe A.Y., Chase R., Taremi S.S., Risano C., Beyer B., Malcom B. and Lau J.Y.** (1999). A novel recombinant single-chain hepatitis C virus NS3-NS4A protein with improved helicase activity. *Protein Science* **8**:1332-1341.

**Hsieh T-Y, Matsumoto M., Chou H-C, Schneider R., Hwang S.B., Lee A.S. and Lai M.M.C.** (1998). Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *The Journal of Biological Chemistry* **273**:17651-17659.

**Huang P. and Lai M.M.** (2001). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a1 binds to 3'-untranslated region and mediates potential 5'-3'-end cross talks of mouse hepatitis virus RNA. *Journal of Virology* **75**:5009-5017.

**Hugle T., Fehrmann F., Bieck E., Kohara M., Krausslich H.G., Rice C.M., Blum H.E. and Moradpour D.** (2001). The hepatitis C virus NSB is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* **284**:70-81.

**Ishido S., Fujita T. and Hotta H.** (1998). Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **244**:35-40.

**Ito T., Tahara S.M. and Lai M.C.** (1998). The 3' untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *Journal of Virology* **72**:8789-8796.

**Iwai A., Hasumura Y., Nojima T. and Takegami T.** (2003). Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 binds to Sm-D1, a small nuclear ribonucleoprotein associated with autoimmune disease. *Microbiol Immunol* **47**:601-611.

**Iwawaki T., Hosoda A., Okuda T., Kamigori Y., Nomura-Furuwatari C., Kimata Y., Tsuru A. and Kohno K.** (2001). Translational control by

the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol.* **3**:158-164.

**Kaminski A., Hunt S.L., Patton J.G. and Jackson R.J.** (1995). Direct evidence that polypyrimidine tract binding protein (PTB) is essential for internal initiation of translation of encephalomyocarditis virus RNA. *RNA* **1**:924-938.

**Kato J., Kato N., Yoshida H., Ono-Nita S.K., Shiratori Y. and Omata M.** (2002). Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *Journal of Medicine Virology* **66**:187-199.

**Khu Y.L., Tan Y.L., Lim S.G., Hong W. and Goh P.Y.** (2004). Hepatitis C virus non-structural protein NS3 interacts with LMP7, a component of the immunoprotease, and affects its proteasome activity. *Biochemistry Journal* **384**:401-409.

**Kim D.W., Gwack Y., Han J.H. and Choe J.** (1995). C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **215**:160-166.

**Kim J.H., Lee J.H., Kim J. and Kim J.K.** (1999). Identification of phage-displayed peptides which bind to the human HnRNP A1 protein-specific monoclonal antibody. *Molecular Cells* **9**:452-454.

**Koch J.O. and Bartenschlager R.** (1999). Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A and NS4B. *Journal of Virology* **73**:7138-7146.

**Koike K., Moriya K., Ishibashi K., Matsuura Y., Suzuki T., Saito I., Iino S., Kurokawa K. and Miyamura T.** (1995). Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice. *Journal of General Virology* **76**:3031-3038.

**Kolykhalov A.A., Feinstone S.M. and Rice C.M.** (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of Virology* **70**:3363-3371.

**Kolykhalov A.A., Mihalik K., Feinstone S.M. and Rice C.M.** (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *Journal of Virology* **74**:2046-2051.

**Konan K.V., Giddings T.H. Jr., Ikeda M., Li K., Lemon S.M. and Kirkegaard K.** (2003). Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus. *Journal of Virology* **77**:7843-7855.

**Lan S., Wang H., Jiang H., Mao H., Liu X., Zhang X., Hu Y., Xiang L. and Yuan Z.** (2003). Direct interaction between alpha-actinin and hepatitis C virus NS5B. *FEBS Lett* **554**:289-294.

**Lauer G.M., Bruce D. and Walker M.D.** (2001). Hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine* **345**: 41-52.

**Lavanchy D., Purcell R., Hollinger F.B., Howard C., Alberti A., Kew M., Dusheiko G., Alter M., Ayoola E., Beutels P., Bloomer R., Ferret B., Decker R., Esteban R., Fay O., Fields H., Fuller E.C., Grob P., Houghton M., Leung N., Locarnini S.A., Margolis H., Meheus A., Miyamura T., Mohamed M.K., Tandon B., Thomas D., Head H.T., Toukan A.U., Van D.P., Zanetti A., Arthur R., Couper M., Emmanuel J.C., Esteves K., Gavinio P., Griffiths E., Hallaj Z., Heuck C.C., Heymann D.L., Holck S.E., Kane M., Martinaz L.J., Meslin F., Mochny I.S., MiNdikuyeze A., Padilla A.M., Rodier G.M., Roure C., Savage F. and Vercauteren G.** (1999). Global surveillance and control of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* **6**:35-47.

**Lesburg C.A., Cable M.B., Ferrari E., Hong Z., Mandarino A.F. and Weber P.C.** (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nature Structural Biology* **6**:937-943.

**Levy S., Todd S.C. and Maecker H.T.** (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Immunology Annual Reviews* **16**:89-109.

**Li H.P., Zhang X., Duncan R., Comai L. and Lai M.M.** (1997). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription-regulatory region of mouse hepatitis virus RNA. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **94**:9544-9549.

**Li K., Foy E., Ferreon J.C., Nakamura M., Ferreon A.C., Ikeda M., Ray S.C., Gale M. Jr. and Lemon S.M.** (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **102**:2992-2997.

**Lin C., Wu J-W., Hsiao K. and Su M. S-S.** (1997). The hepatitis C virus NS4A protein: interaction with the NS5B and NS5A proteins. *Journal of Virology* **71**:6465-6471.

**Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wolk B., Tellinghuiden T.L., Liu C.C., Maruyama T., Hynes R.O., Burton D.R., McKeating J.A. and Rice C.M.** (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623-626.

**Liu Q., Bhat R.A., Prince A.M. and Zhang P.** (1999). The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **254**:572-577.

**Lo S-Y, Marsiarsz F., Hwang S.B., Lai M.M. and Ou J.H.** (1995). Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* **213**:455-461.

**Lo S-Y, Selby M.J. and Ou J-H.** (1996). Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *Journal of Virology* **70**:5177-5182.

**Lohmann V., Körner F., Herian U. and Bartenschlager R.** (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of Virology* **71**:8416-8428.

**Lohmann V., Körner F., Koch J.O., Herian U., Theilmann L. and Bartenschlager R.** (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**:110-113.

**Macdonald A., Crowder K., Street A., McCormick C. and Harris M.** (2004). The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *Journal of General Virology* **85**:721-729.

**Majumder M., Ghosh A.K., Steele R., Ray R. and Ray R.B.** (2001). Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *Journal of Virology* **75**:1401-1407.

**Makeyev A.V. and Liebhaber S.A.** (2002). The poly(C)-binding proteins: A multiplicity of function and a search for mechanisms. *RNA* **8**:265-278.

**Manabe S., Fuke I., Tanishita O., Kaji C., Gomi Y., Yoshida s., Mori C., Takamizawa A., Yosida I. And Okayama H.** (1994). Production of nonstructural proteins of hepatitis C virus requires a putative viral protease encoded by NS3. *Virology* **198**:636-644.

**Marchand V., Mereau A., Jacquenet S., Thomas D., Mouglin A., Gattoni R., Stevenin J. and Branlant C.** (2002). A Janus splicing regulatory element modulates HIV-1 tat and rev mRNA production by coordination of hnRNP A1 cooperative binding. *Journal of Molecular Biology* **323**:629-652.

**Marrone A. and Sallie R.** (1996). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. The clinical significance of genotypes and quasispecies behavior. *Clin. Lab. Med.* **16**:429-449.

**Marusawa H., Hijikata M., Chiba T. and Shimotohno K.** (1999). Hepatitis C virus core inhibits Fas- and Tumor Necrosis Factor Alpha-mediated apoptosis via NF- $\kappa$ B activation. *Journal of Virology* **73**:4713-4720.



**Matsumoto M., Hwang S.B., Jeng K.S., Zhu N. and Lai M.M.** (1996). Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* **71**:1301-1309.

**Matsumoto M., Hsieh T.Y., VanArsdale T., Hwang S.B., Jeng K.S., Gorbalenya A.E., Lo S.Y., Ou J.H., Ware C.F. and Lai M.M.** (1997). Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmatic tail of lymphotoxin-beta receptor. *Journal of Virology* **71**:1301-1309.

**Matunis M.J., Michael W.M. and Dreyfuss G.** (1992). Characterization and primary structure of poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Molecular Cell Biology* **12**:164.171.

**Moriya K., Fujie H., Shintani Y., Yotsuyanagi H., Tsutsumi T., Ishibashi K., Matsuura Y., Kimura S., Miyamura T. and Koike K.** (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Medicine* **4**:1065-1067.

**Mottola G., Cardinali G., Caccacci A., Trozzi C., Bartholomew L., Torrisi M.R., Pedrazzini E., Bonatti S. and Migliaccio G.** (2002). Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* **293**:31-43.

**Murray E. M., Grobler J. A., Markel E. J., Pagnoni M. F., Paonessa G., Simon A. J. and Flores O. A..** (2003). Persistent replication of hepatitis C virus replicons expressing the  $\beta$ -lactamase reporter in subpopulations of highly permissive Huh7 cells. *Journal of Virology* **77**:2928–2935.

**Nanda S.K., Herion D. and Liang T.J.** (2006). The SH3 binding motif of HCV [corrected] NS5A protein interacts with Bin1 and is important for apoptosis and infectivity. *Gastroenterology* **130**:794-809.

**Nishimura Y., Hayashi M., Inada H. and Tanaka T.** (1999). Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochemical Biophysical Research Communication* **254**:21-26.

**Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Jungreis R., Harding H.P. and Ron D.** (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational response. *The EMBO Journal* **22**:1180-1187.

**O'Farrell P.H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *Journal of Biological Chemistry* **250**:4007-4021.

**Okada T., Yoshida H., Akazawa R., Negishi M. and Mori K.** (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochemical Journal* **366**:585-594.

**Okamoto H., Kojima M., Okada S., Yoshizawa H., Iizuka H., Tanaka T., Muchmore E.E., Peterson D.A., Ito Y. and Mishiro S.** (1992). Genetic drift of hepatitis C virus during an 8,2 years infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* **190**:894-899.

**Otsuka M., Kato N., Moriyama M., Taniguchi H., Wang Y., Dharel N., Kawabe T. and Omata M.** (2005). Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* **41**:1004-1012.

**Park K.J., Choi D.H., Lee S.Y., Hwang S.B. and Lai M.M.** (2002). Nonstructural 5A protein of hepatitis C virus modulates tumor necrosis factor alpha-stimulated nuclear factor kappa B activation. *Journal of Biological Chemistry* **277**:13122-13128.

**Park K.J., Choi D.H., Park J.M., Yie S.W., Lee S.Y. and Hwang S.B.** (2003). Hepatitis C virus NS5A protein modulates c-Jun N-terminal kinase through interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Journal of Biological Chemistry* **278**:30711-30718.

**Parsley T.B., Towner J.S., Blyn L.B., Ehrenfeld E. and Semler B.L.** (1997). Poly(rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA* **3**:1124-1134.

**Pavio N., Taylor D.R. and Lia M.M.** (2002). Detection of a novel unglycosylated form of hepatitis C virus E2 envelope protein that is located in the cytosol and interacts with PKR. *Journal of Virology* **76**:1265-1272.

**Pavio N., Romano P.R., Graczyk T.M., Feinstone S.M. and Taylor D.R.** (2003). Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *Journal of Virology* **77**:3578-3585.

**Petrik J., Parker H. and Alexander G.J.** (1999). Human hepatic glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase binds to the poly(U) tract of the 3' non-coding region of hepatitis C virus genomic RNA. *Journal of General Virology* **80**:3109-3113.

**Piccininni S., Varaklioti A., Nardelli M., Dave B., Raney K.D. and McCathy E.G.** (2002). Modulation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the NS3 helicase and the NS4B membrane protein. *The Journal of Biological Chemistry* **277**:45670-45679.

**Pietschmann T., Lohmann V., Rutter G., Kurpanek K. and Bartenschlager R.** (2001). Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *Journal of Virology* **75**:1252-1264.

**Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R., Weiner A.J., Houghton M., Rosa D., Gradi G. and Abrignani S.** (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**:938-941.

**Polyak S.J., Khabar H.S.A., Paschal D.M., Ezelle H.J., Duverlie G., Barber G.N., Levy D.E., Mukaida N. and Gretch D.** (2001). Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8 leading to partial inhibition of interferon-induced antiviral response. *Journal of Virology* **75**:6095-6106.

**Ray R.B., Meyer K. and Ray R.** (1996a). Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* **226**:176-182.

**Ray R.B., Lagging L.M., Meyer K. and Ray R.** (1996b). Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblast to tumorigenic phenotype. *Journal of Virology* **70**:4438-4443.

**Ray R.B., Steele R., Meyer K. and Ray R.** (1997). Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *The Journal of Biological Chemistry* **272**:10983-10986.

**Ray R.B., Meyer K., Steele R., Shrivastava A., Aggarwal B.B. and Ray R.** (1998). Inhibition of Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ )-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *The Journal of Biological Chemistry* **273**:2256-2259.

**Reed K.E., Grakoui A. and Rice C.M.** (1995). Hepatitis C virus encoded NS2-3 protease: cleavage site mutagenesis and requirements for bimolecular cleavage. *Journal of Virology* **69**:4127-4136.

**Reed K.E., Xu J. and Rice C.M.** (1997). Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase. *Journal of Virology* **71**:7187-7197.

**Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M. and Séraphin B.** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology* **17**:1030-1032

**Rosenberg S.** (2001). Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *Journal of Molecular Biology* **313**:451-464.

**Ruggeri A., Harada T., Matsuura Y. and Miyamura T.** (1997). Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* **229**:68-76.

**Rutkowski D.T. and Kaufman R.J.** (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* **14**:20-28.

**Sakamuro D., Furukawa T. and Takegami T.** (1995). Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *Journal of Virology* **69**:3893-3896.

**Samuel C.E.** (2001). Antiviral actions of interferon. *Clinical Microbiology Reviews* **14**:778-809.

**Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Travoni C., Nicosia A., Cortese R. and Vitelli A.** (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal* **21**:5017-5025.

**Schmidt-Mende J., Bieck E., Hugle T., Penin F., Rica C.M., Blum H.E. and Moradpour D.** (2001). Determinants for membrane association of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**:44052-44063.

**Schroder M. and Kaufman R.J.** (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**:739-789.

**Seipelt J., Liebig H-D, Sommergruber W., Gerner C. and Kuechler E.** (2000). 2A proteinase of human Rhinovirus cleaves cytokeratin 8 in infected HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry* **275**:20084-20089.

**Shi S.T., Huang P., Li H-P and Lai M.M.C.** (2000). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates RNA synthesis of cytoplasmic virus. *The EMBO Journal* **19**:4701-4711.

**Shi S.T., Polyak S.J., Tu H., Taylor D.R., Gretch D.R. and Lai M.M.** (2001). Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* **292**:198-210.

**Shi S.T., Lee K.J., Aizaki H., Hwang S.B. and Lai M.M.** (2003). Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *Journal of Virology* **77**:4160-4168.

**Shimakami T., Hijikata M., Luo H., Ma Y.Y., Kaneko S., Shimamothono K. and Murakami S.** (2004). Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *Journal of Virology* **78**:2738-2748.

**Shimoike T., Minori S., Tani H., Matsuura Y. and Miyamura.** (1999). Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *Journal of Virology* **73**:9718-9725.

**Shirota Y., Luo H., Qin W., Kaneko S., Yamashita T., Kobayashi K. and Murakami S.** (2002). Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *The Journal of Biological Chemistry* **277**:11149-11155.

**Silvera D., Gamarnik A.V. and Andino R.** (1999). The N-terminal K homology domain of poly(rC)-binding protein is a mayor determinant for binding to the poliovirus 5'-untranslated region and acts as inhibitor of viral translation. *The Journal of Biological Chemistry* **274**:38163-38170.

**Spahn C.M., Kieft J.S., Grassucci R.A., Penczek P.A., Zhou K., Doudna J.A. and Frank J.** (2001). Hepatitis C virus IRE RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* **291**:1959-1962.

**Spångberg K. and Schwartz S.** (1999). Poly(C)-binding protein interacts with the hepatitis C virus 5' untranslated region. *Journal of General Virology* **80**:1371-1376.

**Squadrito G., Leone F., Sartori M., Nalpas B., Berthelot P., Raimondo G., Pol S. and Brechot C.** (1997). Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Gastroenterology* **113**:567-572.

**Squadrito G., Orlando M.E., Cacciola I., Rumi M.G., Artini M., Picciotto A., Loiacono O., Siciliano R., Levriero M. and Raimondo G.** (1999). Long-term response to interferon alpha in unrelated to "interferon sensitivity determining region" variability in patients with chronic hepatitis C virus-1b infection. *Hepatology* **30**:1023-1027.

**Sumpter R Jr., Loo Y.M., Foy E., Li K., Yoneyama M., Fujita T., Lemon S.M. and Gale M. Jr.** (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *Journal of Virology* **79**:2689-2699.

**Tabor E., Gerety R.J., Drucker J.A., Seeff L.B., Hoofnagle J.H., Jackson D.R., April M., Barker L.F. and Pineda-Tamondong G.** (1978).

Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* **1**:463-466.

**Taguchi T., Nagano-Fujii M., Akutsu M., Kadova H., Ohgimoto S., Ishido S. and Hotta H.** (2004). Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *Journal of General Virology* **85**:959-969.

**Tai C-L, Chi W-K, Chen D-S and Hwang L-H.** (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus non-structural protein 3 (NS3). *Journal of Virology* **70**:8477-8484.

**Tan S-L., Nakao H., He Y., Vijaysri S., Neddermann P., Jacobs B.L., Mayer B.J. and Katze M.G.** (1999). NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signalling. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **96**:5533-5538.

**Tanji Y., Hijikata M., Satoh S., Kaneko T. and Shimotohno K.** (1995a). Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *Journal of Virology* **69**:1575-1581.

**Tanji Y., Kaneko T., Satoh S. and Shimotohno K.** (1995b). Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *Journal of Virology* **69**:3980-3986.

**Tardif K.D., Mori K. and Siddiqui A.** (2002). Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *Journal of Virology* **76**:7453-7459.

**Tardif K.D., Mori K., Kaufman R.J. and Siddiqui A.** (2004). Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:17158-17164.

**Tardif K.D., Waris G. and Siddiqui A.** (2005). Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiology* **13**:159:163.

**Taylor D.R., Shi S.T., Romano P.R., Barber G.N. and Lai M.M.C.** (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285**:107-110.

**Taylor D.R., Tian B., Romano P.R., Hinnebusch A.G., Lai M.M.C. and Mathews M.B.** (2001). Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation site in the RNA-binding domain. *Journal of Virology* **75**:1265-1273.

**Tellinghuisen T.L. and Rice C.M.** (2002). Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Current Opinion in Microbiology* **5**:419-427.

**Tomei L., Failla C., Santolini E., De Francesco R. and La Monica N.** (1993). NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *Journal of Virology* **67**:4017-4026.

**Tomei L., Failla C., Vitale R.L., Bianchi E. and De Francesco R.** (1996). A central hydrophobic domain of hepatitis C virus NS4A protein is necessary and sufficient for the activation of the NS3 protease. *Journal of General Virology* **77**:1065-1070.

**Tu H., Gao L., Shi S.T., Taylor D.R., Yang T., Mircheff A.K., Wen Y., Gorbalenya A.E., Hwang S.B. and Lai M.M.** (1999). Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* **263**:30-41.

**Uchida M., Hino N., Yamanaka T., Fukushima H., Imanishi T., Uchiyama Y., Kodama T. and Doi T.** (2002). Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA polymerase. *Hepatology research* **22**:297-306.

**Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Mivamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H.G., Mizokami M., Bartenschlager R. and Liang T.J.** (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **11**:791-796.



**Walter B.L., Parsley T.B., Ehrenfeld E. and Semler B.L.** (2002). Distinct poly(rC) binding protein KH domain determinants for poliovirus translation initiation and viral RNA replication. *Journal of Virology* **76**:12008-12022.

**Wang C., Sarnow P. and Siddiqui A.** (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of Virology* **67**:3338-3344.

**Waris G., Turkson J., Hassaneim T. and Siddiqui A.** (2005). Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: role of STAT-3 in HCV replication. *Journal of Virology* **79**:1569-1580.

**Waxman L., Whitney M., Pollok B., Kuo L.C. and Darke P.L.** (2001). Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **98**:13931-13935.

**Wolk B., Sansonno D., Kräusslich H-G, Dammacco F., Rice C.M., Blum H.E. and Moradpour D.** (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of Virology* **74**:2293-2304.

**Xu Z., Choi J., Yen T.S.B., Lu W., Strohecker A., Govindarajan S., Chien D., Selby M.J. and Ou J.** (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *The EMBO Journal* **20**:3840-3848.

**Yadav D., Herten H.I., Schweitzer P., Norkus E.P. and Pichumoni C.S.** (2002). Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* **97**:2634-2639.

**Yasui K., Wakita T., Tsukiyama-Kohara K., Funahashi S.I., Ichikawa M., Kajita T., Moradpour D., Wands J.R. and Kohara M.** (1998). The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology* **72**:6048-6055.

**You L-R, Chen C-M and Lee Y-H.W.** (1999). Hepatitis C virus core protein enhances NF-kB signal pathway triggering by lymphotoxin- $\beta$

receptor ligand and Tumor Necrosis Factor Alpha. *Journal of Virology* **73**:1672-1681.

**Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T. and Mori K.** (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**:881-891.

**Zech B., Kurtenbach A., Krieger N., Strand D., Blencke S., Morbitzer M., Salassidis K., Cotten M., Wissing J., Obert S., Bartenschlager R., Herget T. and Daub H.** (2003). Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *Journal of General Virology* **84**:555-560.

**Zhang K. and Kaufman R.J.** (2004). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:25935-25938.

**Zheng Y., Gao B., Ye L., Kong L., Jing W., Yang X., Wu Z. and Ye L.** (2005). Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *Journal of Microbiology* **43**:529-536.

**Zhong J., Gastaminza J., Cheng G., Kapadia S., Kato T., Burton D.R., Wieland S.F., Uprichard S.L., Wakita T. and Chisari F.V.** (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **102**:9294-9299.

**Zhong W., Uss A.S., Ferrari E., Lau J.Y.N. and Hong Z.** (2000). De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *Journal of Virology* **74**:2017-2022.

**Zhu N., Khoshnan A., Schneider R., Matsumoto M., Dennert G., Ware C. and Lai M.M.** (1998). Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *Journal of Virology* **72**:3691-3697.

**Zibert A., Schreir E. and Roggendorf M.** (1995). Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* **208**:653-661.

## 7. Ringraziamenti

*Grazie.....*

*Grazie a tutte le persone che hanno incontrato Marta....*

*A tutte quelle che hanno voluto conoscerla, anche se poi, magari, non ci sono riuscite del tutto; ed a quelle alle quali non è interessato, non vi siete perse nulla, e neanch'io!*

*Grazie a quelle persone che mi hanno fatto sorridere, perché non ho mai ricevuto regalo migliore; e grazie a quelle che mi hanno fatto piangere, perché "che cosa c'è di più celeste di un cielo che ha visto mille tempeste....."?!?!?!*

*Grazie alle persone che mi sono state accanto, perché non mi è mai piaciuto stare sola; e grazie a quelle che mi hanno lasciato sola, perché mi hanno insegnato a starci.....*

*Grazie a quelle persone che pensano che io sia un'egoista, perché comunque si sono chiesti come fossi, e perché forse un po' lo sono veramente. Grazie a chi pensa che io sia generosa, perché vuol dire che ogni tanto lo sono stata, e secondo me, lo sono!*

*Grazie a chi mi ha sempre trattato bene, spero di essermelo meritata; e a chi mi ha trattato male, perché, forse, me lo ero meritata!*

*Grazie a chi mi ha tradita, perché alla fine si è rivelato per quello che era; e grazie a chi non lo ha mai fatto, per lo stesso motivo!*

*Grazie a chi mi ha guardata almeno una volta negli occhi, a chi si è chiesto cosa pensassi, a chi si è chiesto come stessi; a chi magari non lo ha mai capito, ma continua a provarci.*

*Grazie a chi dice che vivo in un Mondo tutto mio, il "Mondo di Marta", perché sapete, in fondo, è vero!*

*Grazie al Professor Piacentini per avermi dato la possibilità di portare avanti questo progetto; ed al Dott. Fimia per avermi aiutato a farlo.*

*Grazie al Professor Cesareni per le stimolanti domande durante questi tre anni; ed alla Professoressa Rossi per la lettura e le critiche costruttive che ha saputo darmi su questa tesi.*

*Grazie alla mia Famiglia.....*

*Grazie a mia madre, che vive per me, perché Marta è sua figlia, ed è fiera di esserlo!*

*Grazie a mio padre, perché per me lo è sempre stato.*

*Grazie a mio fratello, per esserlo sempre.*

*Grazie a mio nonno, perché, come ripeto sempre a tutti, è “l’unico Uomo della mia vita”; e grazie a mia nonna, solo grazie perché l’ultima volta ho fatto un pasticcio.....*

*Grazie ad Angelica ed Hélena, una nuova famiglia.*

*Grazie ad Aldo, che ancora resiste.....*

*Grazie ai miei Amici.....*

*Grazie a Cristina, per tutte le volte che mi hai detto di provarci; e un bacio a Clara.*

*Grazie a Cri, per quando mi dici che andrà tutto bene, e non ci credi neanche tu!*

*Grazie a Marina, perchè anche se ogni tanto scompare, quando deve esserci, c’è!*

*Grazie a Carmine, per quel venerdì di Agosto, per tutte le volte che mi hai visto piangere, e per tutte quelle in cui mi hai fatto ridere!.....Sempre!*

*Grazie a Danilo, perché so che vuoi “solo” vedermi felice, anche se quello che può rendere felice me, alle volte, può far star male te.....*

*Grazie a Luca, anche se quella “promessa di matrimonio” non l’hai più mantenuta.....;*

*Grazie a Roberto, il mio “zietto”, perchè dopo tutte le “buche” che gli ho dato, continua a chiamarmi;*

*a Mara, alla quale auguro tutta la felicità di questo mondo;*

*a Sarah, anche se ora è diverso....., ma non per questo peggiore;*

*a Pia, che ho “scoperto” tardi.....;*

*a Vale, perché è sempre meravigliosamente la stessa!*

*Grazie a Vincenzo, perché comunque ci sei!*

*Grazie ai miei “Colleghi” .....*

*Grazie a Vale e ad Ale, per avermi aiutato quando ne ho avuto bisogno;*

*a Francesca, che è sempre incasinata, anche nella testa.....;*

*a Marco, perché “nonostante tutto” sei importante per me;*

*a Cristina, perché era proprio destino.....*

*Grazie a Toni, che è veramente una persona speciale;*

*a Veronica, che mi ha chiesto cosa stava succedendo.....*

*Grazie a Daniele, per quella canzone che non conoscevo!*

*Grazie a chi si allena con me.....*

*Grazie a Luca, che rimane sempre il Mio Sihing;*

*ad Ivan, che prima o poi spero farà pace con le Donne, con il Mondo e magari anche con se stesso, perché allora potrai veramente essere “troppo buono”!*

*Grazie a Marcello, per tutte le volte che mi hai messo i cerotti.*

*Grazie a Sifu, perché se tu non ci fossi, non ci sarebbe tutto il resto; perché ci metti sempre l'anima, perché sei veramente bravo, perché sembri nato per questo, anche se hai le mani da medico.....*

*E per concludere tutto, ma proprio proprio tutto.....*

*Grazie a Fabio;*

*grazie perché sei una delle poche persone che conosco che crede realmente in quello che fa, che ci mette l'anima, che fa quello che vuole fare, al di là di tutto e di tutti, senza scendere a compromessi, mai! Io ti ammiro per questo, e penso che tu lo sappia.....*

*Grazie per tutto quello che “sento”..... anche quando non dici nulla.....*

*Potrei dirti grazie per un milione di volte, per un milione di ragioni, ma sarebbero, comunque, solo parole. Quindi riassumo tutto in un'unica frase;*

*Grazie per Quaglietta.....*