

RELAZIONE SULL'ATTIVITA' DI RICERCA SVOLTA DURANTE IL PERIODO DI CONGEDO STRAORDINARIO (30 SETTEMBRE 2015 - 9 OTTOBRE 2016) E SU QUELLA CHE SI INTENDE SVOLGERE NELL'ULTERIORE PERIODO DI CONGEDO (23 NOVEMBRE - 23 DICEMBRE 2016) PER IL QUALE SI RICHIEDE AUTORIZZAZIONE.

L'attività di studio e ricerca svolta presso l'*Hepatic Pathogenesis Section of National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA*, durante l'anno di congedo straordinario (30 settembre 2015 - 9 ottobre 2016) concesso con D.R. 1803/2015 del 27/08/2015, ha consentito alla sottoscritta prof. Teresa Pollicino di sviluppare tre diversi studi scientifici, due dei quali già conclusi e sottomessi per la pubblicazione in riviste scientifiche di assoluto prestigio internazionale:

- *Identification of TACSTD2 as a Novel Host Cofactor for Hepatitis C Virus Entry (Submitted)*
- *Comprehensive Molecular Characterization of Hepatitis B Virus Associated Acute Liver Failure (Submitted)*
- *Molecular Characterization of Hepatocellular Carcinoma Associated with of Hepatitis B Virus and of Hepatitis D Virus Coinfection.*

La sottoscritta ha contribuito in maniera sostanziale sia al disegno che alla conduzione di ciascuno dei tre studi e, per i due sottomessi per la pubblicazione, si è presa anche cura della stesura dei manoscritti.

Sinossi degli studi

- Lo studio "*Identification of TACSTD2 as a Novel Host Cofactor for Hepatitis C Virus Entry*" ha consentito di identificare - attraverso l'impiego di strumentazioni *cutting-edge* ed avanzatissime metodiche molecolari - il *tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2)*, quale uno dei geni maggiormente soppressi a livello del carcinoma epatocellulare (HCC) e quale co-recettore utilizzato dal virus dell'epatite C (HCV) per l'infezione delle cellule epatiche. Esperimenti *in vitro*, in colture cellulari di epatocarcinoma e di epatociti primari, hanno permesso di evidenziare che *TACSTD2* interagisce direttamente con i già noti co-recettori di HCV, claudina-1 ed occludina, regolando il loro stato di fosforilazione e la loro localizzazione intracellulare. Il silenziamento dell'espressione di *TACSTD2* causa, difatti, un'importante alterazione della tipica distribuzione lineare a livello della membrana cellulare sia della claudina-1 che dell'occludina, ricapitolando il pattern della loro alterata distribuzione osservato *in vivo*, nell'HCC, attraverso l'utilizzo del microscopio confocale. Dato di assoluto rilievo, il silenziamento di *TACSTD2* causa una drammaticamente inibizione dell'infezione da HCV, agendo livello dell'"*entry*" del virus e con effetto analogo su tutti i genotipi virali. L'identificazione di *TACSTD2* quale nuovo co-fattore dell'ospite coinvolto nell'ingresso del virus nella cellula epatica apre ulteriori nuove strade per il trattamento e la prevenzione dell'infezione da HCV.

- Lo studio "*Comprehensive Molecular Characterization of Hepatitis B Virus Associated Acute Liver Failure*" ha visto l'analisi di sieri e multipli campioni di tessuto epatico ottenuti al momento del trapianto epatico da 4 pazienti affetti da epatite fulminante relata al virus dell'epatite B (HBV). L'epatite fulminante è una rara e drammatica sindrome clinica, la cui patogenesi è ancora ampiamente sconosciuta, che porta a morte la quasi totalità dei pazienti se non sottoposti a trapianto di fegato. Non potendo disporre, per ragioni etiche, di tessuti epatici provenienti da pazienti affetti da epatite acuta B ad evoluzione benigna, come controllo, sono stati utilizzati campioni di tessuto epatico, archiviati al NIH, ottenuti dal modello animale dello scimpanzé affetto da epatite acuta B. L'utilizzo di metodiche molecolari quali, il *gene e miRNA* profiling, la *next-generation sequencing*, l'*antibody-displaying phage library*, e l'analisi fenotipica *in vitro* delle varianti di HBV isolate dai pazienti con epatite fulminante ha consentito di svelare che tale patologia è caratterizzata da una *signature* dominante *B-cell-driven*, associata a massiva infiltrazione intraepatica di cellule della linea linfoide B, con evidenze di deposito del complemento e produzione di altissimi livelli di anticorpi di classe IgG ed IgM in *germline configuration*, diretti esclusivamente e ad altissima affinità verso l'antigene "core" dell'HBV. Di contro, si è osservata una *down-regulation* dell'espressione genica specifica dei linfociti T, l'assenza di produzione di chemochine regolate dall'interferone, ed una *up-regulation* di fattori che sopprimono l'attività dei linfociti T. Tali dati sono si sono rivelati in forte contrasto con quanto riscontrato negli scimpanzé, affetti da classica epatite acuta B, in cui la *signature* dominante era di tipo *T-cell driven*. I dati di next-generation sequencing hanno dimostrato che ciascun paziente era infettato da una popolazione virale geneticamente molto omogenea ma altamente divergente dall'HBV wild-type, soprattutto a livello della regione precore/core del virus dove un alto numero di mutazioni era presente a livello degli epitopi B-cellulari. Tale approfondita analisi ha consentito di delineare l'epatite fulminante da HBV come malattia epatica anomala, non legata alla risposta linfocitaria di tipo T, ma piuttosto ad una fortissima risposta linfocitaria B stimolata dall'antigene "core" dell'HBV e causata dallo "sfortunato" incontro tra un ospite caratterizzato da un rarissimo repertorio di cellule B naïve ed un virus infettante con peculiarità antigeniche "uniche" a livello della proteina core.

- Lo studio "*Molecular Characterization of Hepatocellular Carcinoma Associated with HBV/HDV Coinfection*" ha visto l'impiego di differenti ed avanzatissimi approcci molecolari per l'analisi delle interazioni virus-ospite in 10 pazienti con HCC associato alla co-infezione da HBV e virus dell'epatite D (HDV) che sono stati sottoposti a trapianto di fegato. L'analisi del profilo di

espressione genica è stata eseguita - utilizzando l'Affymetrix Human U133 Plus2, che analizza all'incirca 55.000 geni - su multipli campioni di tessuto epatico (tumore vs. non-tumore) ottenuti da ciascun paziente. Poiché il fegato contiene una popolazione cellulare altamente eterogenea, l'analisi del profilo di espressione genica è stata anche effettuata su una popolazione pura di epatociti ottenuta attraverso *laser-capture microdissection*. L'analisi del profilo di espressione genica, utilizzando gli stessi suddetti approcci molecolari, è stata anche eseguita in multipli campioni di tessuto epatico ottenuti dal fegato di 11 pazienti con HCC-relato monoinfezione da HBV (gruppo controllo). Su tutti campioni di tessuto epatico è stata anche eseguita analisi trascrittomiche utilizzando la tecnologia del RNA-Seq. La variabilità genomica dell'HBV e dell'HDV isolati da tutti i pazienti è stata effettuata attraverso next-generation sequencing.

I risultati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica in pazienti con HCC-relato alla coinfezione HBV/HDV hanno evidenziato la presenza, nel tessuto tumorale di questi pazienti, di un'*up-regolazione* di geni coinvolti nell'attivazione del ciclo cellulare, nel danno del DNA e nella riparazione del DNA suggerendo che l'instabilità genetica possa essere un importante meccanismo implicato nell'epatocarcinogenesi da HDV. Di contro i dati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione genica in pazienti con HCC-relato al solo HBV hanno evidenziato la presenza nel tessuto tumorale di una forte soppressione dei geni coinvolti nelle funzioni metaboliche del fegato.

La mole di dati ottenuti dall'analisi trascrittomiche, eseguita utilizzando la tecnologia del RNASeq ed i dati ottenuti dal Next-generation sequencing sono al momento in fase di elaborazione presso il centro di Bioinformatica degli NIH. Al completamento dell'analisi bioinformatica si renderà necessario un diretto e continuo confronto della sottoscritta con i colleghi presso il suddetto centro, al fine di giungere ad una corretta e finalizzata interpretazione dei dati per la conclusione dello studio sopra descritto. Per tale motivo la sottoscritta avanza richiesta di un ulteriore periodo di congedo straordinario della durata di un mese (23 novembre - 23 dicembre 2016) da trascorrere presso l'*Hepatic Pathogenesis Section of NIAID/NIH, Bethesda, Maryland, USA*.

Messina lì, 10/11/2016

