

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE E GASTROENTEROLOGICHE  
“PG CEVESE”

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

**HCV INTERFERISCE CON LA VIA DI SEGNALE BMP6-SMAD  
E SOPPRIME L'ESPRESSIONE DI EPCIDINA:  
RISULTATI *in vivo* ED *in vitro***

INDIRIZZO: SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

CICLO: XXIII

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Pierpaolo Parnigotto

**Supervisor:** Dott. Diego Martines, Università di Padova  
Prof. Paul Klenerman, Università di Oxford  
Dott. Alexander Drakesmith, Università di Oxford

**Dottoranda:** Dott.ssa Sara Boninsegna

DATA CONSEGNA TESI

31/01/2011

# INDICE

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
IL FERRO E' UN ELEMENTO ESSENZIALE PER LA CELLULA .....	1
METABOLISMO DEL FERRO NELL'UOMO: RUOLO REGOLATORE DELL'EPCIDINA...	2
EPCIDINA ED INFIAMMAZIONE .....	4
INFEZIONE CRONICA DA HCV E METABOLISMO DEL FERRO .....	5
VIA DI SEGNALE MEDIATA DALLA FAMIGLIA DELLE <i>BONE MORPHOGENETIC</i> <i>PROTEINS</i> (BMPs) ED ESPRESSIONE DI EPCIDINA .....	10
<b>IPOTESI E SCOPO DELLO STUDIO .....</b>	<b>16</b>
<i>In vivo</i> .....	16
<i>In vitro</i> .....	16
<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>18</b>
BIOPSIE EPATICHE .....	18
LINEE CELLULARI E COLTURE .....	18
ESTRAZIONE DELL'mRNA DA BIOPSIA EPATICA/CELLULE E SINTESI DEL cDNA PER q(uantitative)R(eal)T(ime)-PCR (qRT-PCR).....	20
MODELLO DI INFEZIONE DA HCV .....	21
IMMUNOFLUORESCENZA.....	21
ELISA .....	23
WESTERN BLOT .....	23
TRATTAMENTO DELLE CELLULE CON BMPs E TNF $\alpha$ .....	24
TRATTAMENTO CON ANTICORPI ANTI-TNF $\alpha$ .....	24
KNOCK-DOWN MEDIATO DA siRNA.....	24
ANALISI STATISTICA .....	25
<b>RISULTATI .....</b>	<b>26</b>
<i>In vivo</i> .....	26
<i>In vitro</i> .....	31
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>38</b>

**RIASSUNTO .....43**

**ABSTRACT .....45**

**BIBLIOGRAFIA.....I-VII**

# **INTRODUZIONE**

## **IL FERRO E' UN ELEMENTO ESSENZIALE PER LA CELLULA**

Molte proteine cruciali nella fisiologia cellulare richiedono adeguate quantità di ferro per funzionare correttamente, ad esempio i componenti della catena mitocondriale trasportatrice di elettroni, l'enzima ferrocetolasi e l'emoglobina, indispensabili per la sintesi dell'eme e per il trasporto di ossigeno, enzimi coinvolti nella sintesi del DNA, nella sua replicazione, riparazione e trascrizione, incluse la ribonucleotide reductasi, la DNA elicasi e l'ATPasi, necessarie per la trascrizione dell'mRNA (1). Questi peptidi sono molto conservati nell'evoluzione, sia nei procarioti che negli eucarioti, e il ruolo cruciale del ferro nel metabolismo cellulare è mantenuto in tutte le forme di vita: il sequestro di ferro è una forma di difesa comune ad una grande varietà di organismi, come piante, uccelli e, come dimostrato recentemente, anche rettili (2). La deficienza di ferro inibisce l'attività delle proteine ferro-dipendenti e ostacola il corretto funzionamento dei processi cellulari. Un organismo carente di ferro è più debole nei confronti delle infezioni (3). Il diffuso utilizzo del ferro nel mondo vivente è dovuto alla sua abilità nel veicolare elettroni, alla sua flessibilità nel legarsi a ligandi diversamente orientati ed alla sua alta biodisponibilità durante i primi stadi dell'evoluzione, quando l'atmosfera era prevalentemente ricca di zolfo. Nell'ambiente "moderno", caratterizzato da grande quantità di ossigeno, il ferro ha bassa biodisponibilità anche se è abbondante, perché è altamente insolubile; per questo si attua una feroce competizione tra ospite e microrganismi patogeni che necessitano di esso al fine di sequestrarlo (4), tanto che si potrebbe pensare che in caso di infezione potrebbe essere vantaggiosa una strategia che preveda la deplezione di ferro (5).

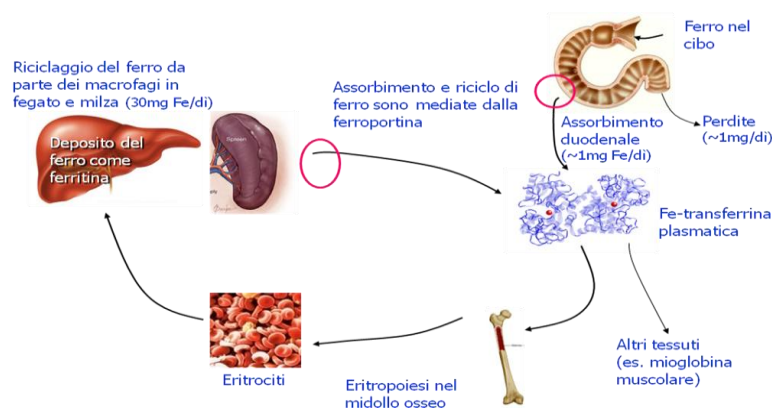
I virus sono microrganismi che dipendono dalla cellula in cui vivono. La replicazione dei virus è associata ad aumento del metabolismo cellulare, poiché dev'essere copiato il genoma virale e devono essere sintetizzate le proteine virali sfruttando i meccanismi cellulari. La propagazione del virus è più efficiente se la disponibilità di

ferro è maggiore (1). Un esempio drammatico di come il ferro possa favorire la crescita dei virus è rappresentato dai mari: quantità di ferro insufficienti limitano la attività biologica in un terzo degli oceani mondiali (6) e la fertilizzazione delle acque con ferro porta ad una fioritura di fitoplancton visibile dal satellite (7). La replicazione virale marina aumenta in proporzione diretta con la crescita delle alghe (8). Il tasso di infezione dei virus marini è stimato attorno a  $10^{23}$  al secondo; tale virulenza può limitare se non evitare del tutto il rifiorire dell'alga per lisi cellulare (8, 9). Perciò, perché sopravvivano sia il virus che le cellule da cui esso dipende, è necessaria una certa quantità di ferro. Analogamente a quanto descritto per i mari, anche nell'uomo c'è un'associazione tra concentrazione del ferro e attività virale.

## METABOLISMO DEL FERRO NELL'UOMO: RUOLO REGOLATORE DELL'EPCIDINA

Il bilancio del ferro è normalmente preservato negli uomini da meccanismi che ne regolano l'assorbimento e l'utilizzo in base alle esigenze dell'organismo. E' noto fin dal 1930 che una dieta ricca di ferro e supplementi di ferro per via endovenosa producono un effetto sul controllo dell'assorbimento intestinale. La secrezione del ferro non può essere regolata e non esistono meccanismi specifici per la rimozione di questo elemento dall'organismo (10, 11). La Fig.1 illustra in modo semplice il ciclo del ferro.

Fig.1: Il ciclo del ferro



L'assorbimento del ferro avviene a livello dell'ileo terminale. Sono state identificate molte proteine che mediano il trasferimento del ferro dall'intestino al sangue (12). Sulla membrana apicale degli enterociti il ferro (non-eme) proveniente dalla dieta è ridotto da ferro ferrico a ferro ferroso dal citocromo b (13); successivamente viene trasportato nell'enterocita attraverso il trasportatore metallico DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*) (14). L'assorbimento del ferro nell'eme è mediato da HCP1 (*Haem carrier protein 1*) (15). In qualunque forma venga trasportato nell'enterocita, il ferro viene rilasciato dalla membrana baso-laterale nel siero attraverso la ferroportina (16-18). Nel sangue il ferro viaggia legato alla transferrina, ed è proprio il complesso ferro-transferrina che raggiunge attraverso la circolazione gli organi ed i tessuti. I recettori della transferrina, presenti sulla membrana cellulare, internalizzano il complesso ferro-transferrina in endosomi debolmente acidi, in cui il ferro ferrico è rilasciato (19, 20). Il ferro ferrico è ridotto quindi dalle reduttasi prima di essere trasportato nel citoplasma dal DMT1. La quantità di ferro che viene assorbito attraverso gli enterociti è il fattore chiave che determina il mantenimento dell'omeostasi. Questa quantità è up-regolata in caso di deficienza di ferro ed anemia, mentre può essere ridotta in caso di eccesso di ferro.

Il meccanismo molecolare che controlla l'assorbimento del ferro non è ancora completamente chiaro, ma tutti concordano sul ruolo fondamentale dell'ormone peptidico epcidina (21). L'epcidina è una proteina di 25 aminoacidi che includono 8 cisteine che formano 4 legami disolfato interni (22, 23). L'epcidina lega la ferroportina, proteina che media il rilascio di ferro (24): questo legame provoca l'internalizzazione e la degradazione della ferroportina mediante la via lisosomiale, prevenendo il rilascio di ferro dalle cellule, quindi sia la dismissione dai macrofagi che l'assorbimento intestinale (3, 24). L'aumento del ferro nell'organismo up-regola la sintesi di epcidina, che blocca l'attività della ferroportina nei macrofagi e negli enterociti; questo meccanismo porta all'accumulo di ferro nel sistema reticolo-endoteliale (21). Inversamente, in condizioni di bassi livelli di ferro ed anemia la sintesi di epcidina è soppressa ed il ferro viene rilasciato dai depositi intracellulari e maggiormente assorbito con la dieta (25). L'alterazione di questo meccanismo può portare a forme patologiche di accumulo di ferro, quali l'emocromatosi, che possono

essere provocate per mutazioni a diversi livelli: HFE (26), emojuvelina (27), ferroportina (28), epcidina (29).

## **EPCIDINA E INFIAMMAZIONE**

L'epcidina è anche una proteina di fase acuta, sintetizzata in situazioni di infiammazione, ad esempio attraverso una via STAT3-mediata che viene attivata dall'IL-6. Le situazioni di infiammazione cronica sostengono solitamente un aumento dell'espressione di epcidina, in modo da portare all'accumulo di ferro nel sistema reticolo-endoteliale attraverso il blocco della ferroportina; questo causa, però, diminuzione della disponibilità di ferro per l'eritronc, con conseguente anemia delle malattie croniche (5). Nelle infezioni questo meccanismo è utile, in quanto previene la disponibilità di ferro per il patogeno, favorendone invece l'utilizzo da parte dell'ospite per la sua difesa (3). I macrofagi sembrerebbero in grado di produrre anche da soli una piccola quantità di epcidina in risposta all'attivazione del TLR4 da parte di batteri (30), portando autonomamente, in modo autocrino, alla down-regolazione della ferroportina e all'accumulo di ferro (31). L'importanza dell'omeostasi del ferro si ripercuote nel corretto funzionamento delle cellule del sistema immunitario, in particolare i macrofagi, che spesso sono coinvolti nei processi di internalizzazione e degradazione di parti del patogeno, mediante il fagolisosoma. Per il completamento del killing del patogeno è necessario un enzima, la NADPH ossidasi, che genera superossidi nel fagolisosoma, attivando una cascata specifica; cambiamenti nel contenuto totale del ferro nei macrofagi, sia in senso di accumulo che in senso di carenza, porta a modificazioni dell'attività della NADPH ossidasi (3). In particolare, l'eccessivo accumulo di ferro nel sistema dei macrofagi è legato a maggiore suscettibilità alle infezioni, come succede ad esempio in soggetti con talassemia, mentre la carenza potrebbe essere anche fattore favorente la difesa (3), tanto da far ipotizzare che la restrizione di ferro potrebbe essere una strategia benefica in situazioni di infezione, anche se non scevra di complicazioni (5).

L'IFN- $\gamma$ , secreto in caso di infezioni dai linfociti, è in grado di modificare l'omeostasi del ferro a livello macrofagico, agendo sulla trascrizione di proteine regolatrici, in particolare: up-regolazione della ferroportina per promuovere l'esportazione del ferro, riduzione del recettore per la transferrina per limitare l'uptake del ferro legato alla transferrina, e aumento della ferridoriduttasi sulla membrana del fagosoma, che porta alla fuoriuscita del ferro dal fagosoma dove è contenuto il patogeno (5). Il risultato è una netta riduzione del ferro disponibile per i patogeni presenti nella cellula.

In conclusione, generalmente nelle malattie croniche, come ad esempio l'artrite reumatoide ed il cancro, si osserva una condizione di iposideremia ed iperferritinemia, dovuta all'azione dell'epcidina sul metabolismo del ferro, conseguente allo stato infiammatorio (32).

Gli epatociti sono la prima fonte di epcidina, che in minima parte può essere prodotta dalle cellule mieloidi (33) e nel rene (34), facendo assumere al fegato un ruolo cruciale nella regolazione dell'assorbimento del ferro a livello intestinale. Pertanto, infezioni virali che danneggiano la funzionalità epatica potrebbero, almeno teoricamente, modificare l'omeostasi del ferro.

## **INFEZIONE CRONICA DA HCV E METABOLISMO DEL FERRO**

Il virus dell'epatite C appartiene alla famiglia delle Flaviviridie, di cui costituisce il terzo genere accanto ai Flavivirus e i Pestivirus; ha un diametro di 30-60 nm con un involucro lipoproteico contenente RNA a singola elica di circa 10.000 basi. Il virus codifica una sola poliproteina di circa 3000 aminoacidi, che viene poi suddivisa in molti peptidi strutturali e non strutturali: le componenti strutturali consistono nel core (C) e in due glicoproteine di superficie (envelope E1 ed E2), oltre che in proteine non strutturali denominate NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 (35).

Il virus replica nel citoplasma degli epatociti. Essendo l'RNA polimerasi priva di attività enzimatica che possa permettere la correzione di errori, il genoma di HCV presenta grande variabilità. Il risultato è che nel siero il virus circola come una



popolazione di quasispecie, la cui sequenza nucleotidica differisce dell'1-5% (36). La diversità delle quasispecie può essere una delle cause dell'alta percentuale di cronicizzazione della malattia e può contribuire alla resistenza immunologica, in quanto le proteine di superficie cambiano rapidamente in risposta alla pressione immunitaria. A causa di queste differenti mutazioni il virus dell'epatite C non è omogeneo, ma si riconoscono almeno 6 genotipi principali, ognuno dei quali comprende vari sottotipi (oltre 50), che a loro volta sono costituiti da numerosissime varianti (isolati e quasispecie) (37).

I genotipi sono importanti soprattutto per la diversità nella risposta alla terapia antivirale attualmente disponibile, rappresentata da interferone peghilato e ribavirina: pur stabilizzandosi complessivamente attorno al 55%, la risposta è del 45% nei pazienti affetti da genotipo 1, del 70% nei genotipi 3, dell'85% nei genotipi 2 (i genotipi più frequenti nella nostra popolazione) (38).

Secondo l'OMS, circa 170.000.000 di persone al mondo sono affette da epatite C, rappresentando il 70% dei casi di epatite cronica (39). Questa patologia è la causa più importante di cirrosi epatica ed epatocarcinoma, nonché la prima di trapianto di fegato. Le zone geografiche in cui l'epatite cronica C è più frequente sono l'area mediterranea, il Nord Africa, l'America Centrale e Meridionale. In Scandinavia meno dello 0,5% della popolazione è infetta, mentre in Egitto lo è più del 20%.

L'infezione cronica da HCV è spesso asintomatica, ma può portare nel tempo ad un danno epatico piuttosto severo solo in una limitata percentuale di casi. E' tuttora in fase di studio come il virus HCV possa portare al danno epatico avanzato ed al tumore del fegato; la causa più probabile è dovuta all'interazione tra sistema immunitario dell'ospite e HCV, che porta ad infiammazione a livello epatico, ed a cofattori quali l'assunzione di bevande alcoliche, l'obesità e patologie associate. Tra i cofattori sembrerebbe avere un ruolo controverso l'accumulo di ferro, che si trova comunemente in pazienti con malattie croniche del fegato (40).

L'eccesso di ferro epatico come agente proinfiammatorio è associato ad aumento della morbilità e mortalità nei pazienti cronicamente infetti (41), in particolare perché favorisce la cirrosi epatica e la predisposizione all'epatocarcinoma (42); nel caso dell'epatite cronica HCV correlata è proposto anche come fattore negativo di risposta al trattamento antivirale (41).

Nelle malattie croniche il ferro è depositato sia a livello di epatociti che di cellule di Kupffer. L'eccesso di ferro negli epatociti porta molto presto a stress ossidativo, tossicità cellulare e genotossicità. L'eccesso di ferro nelle cellule di Kupffer è meglio "tollerato", poiché sono cellule più idonee a metabolizzare quantità più elevate di ferro, ma a lungo andare gli effetti possono essere la perdita dell'azione immunomodulatoria ed infiammatoria, il danno a livello di biologia cellulare, la riduzione dell'attività di difesa contro infezioni virali e dell'immunosorveglianza nei confronti della crescita tumorale, o la riduzione della risposta alla terapia antivirale (43). Potenzialmente, l'eccesso di ferro sia negli epatociti che nelle cellule di Kupffer può rivestire un ruolo nella patogenesi della progressione delle malattie croniche virali e nello sviluppo dell'epatocarcinoma (44).

Le cause di eccesso di ferro possono essere genetiche o acquisite: la più comune mutazione genetica è l'eterozigosi per il gene C282Y HFE; tra quelle acquisite, l'assunzione di alcol o la presenza di infezione da HCV sono le più frequenti (45).

La proteina HFE è una proteina che fa parte del Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe I: lega il recettore della transferrina (46), regola il trasporto del ferro nei macrofagi (47), influenza la sintesi di epcidina (48). Il suo preciso ruolo nel metabolismo del ferro resta tuttora da chiarire. La mutazione C282Y è piuttosto frequente nella popolazione caucasica, ma la maggior parte delle persone anche omozigoti non presenta il fenotipo malato in modo completo (49). Probabilmente è per la sua variabile penetranza che è stato difficile stabilire se la mutazione C282Y influenza la malattia cronica da HCV ed in che misura è responsabile dell'accumulo di ferro, quando presente. Questo dipende principalmente dal fatto che il virus dell'epatite C sembra capace di per se stesso di interferenze che possono portare all'accumulo di ferro.

L'accumulo di ferro in pazienti HCV positivi è presente, a seconda delle casistiche, dal 10 al 36% dei casi (50, 51), ma anche in percentuale maggiore negli stadi avanzati di malattia epatica HCV-correlata (52).

L'infezione HCV è correlata a:

- a) aumento della transferrina saturata
- b) aumento della ferritina sierica
- c) aumento dell'accumulo di ferro (40,53)

d) ridotti livelli di epcidina (54)

e) alterazioni dell'espressione di geni trasportatori del ferro (55,56)

Queste caratteristiche non si osservano a livelli significativi in altre epatopatie virali, ad esempio HBV-correlate (54).

Interessante, inoltre, è la conclusione di uno studio che descrive cosa succede ai livelli di epcidina in caso di risposta sostenuta alla terapia antivirale: sembrerebbe che la risposta sia correlata significativamente con il ripristino della produzione di epcidina a livelli normali (57), come se proprio il virus fosse responsabile della riduzione dei livelli di epcidina. Il dato richiede ulteriori conferme, ma avvalorava l'ipotesi che il virus dell'epatite C sia in grado di per sé di alterare i livelli di epcidina, pur restandone ignoto il motivo.

Probabilmente non è tanto l'epcidina il bersaglio del virus: potrebbe essere solo una conseguenza dell'influenza del virus in altre vie di trasmissione cellulare di segnale, ipotesi questa che verrà discussa in seguito.

Per indagare la relazione tra virus HCV e accumulo di ferro sono stati intrapresi studi sia *in vitro* che *in vivo* su modelli animali, con risultati controversi. Esperimenti su colture cellulari hanno dimostrato che il ferro può indurre geni dell'HCV (58), forse attivando TIF3 (*Translation Initiation Factor 3*) (59). Altri studi hanno osservato, invece, un effetto soppressivo del ferro sulla replicazione virale per inibizione della traduzione di alcune proteine strutturali (60): mentre l'aumento di ferro intracellulare ridurrebbe la replicazione virale, questo non accadrebbe con il ferro legato alla ferritina (60). Gli stessi autori, molto recentemente, hanno dato modo di riflettere sul ruolo del ferro nell'infezione da HCV, dimostrando che la somministrazione di ferro esogeno può inibire la propagazione dell'infezione in cellule Huh7.5 permissive (61). Nell'editoriale che commenta questi risultati, l'autore si chiede perché allora l'eccesso di ferro secondario all'infezione da HCV o ad altre epatopatie croniche non migliori, ma peggiori l'outcome di queste patologie; la spiegazione che viene formulata come ipotesi è che lo stress ossidativo indotto dal ferro giochi un ruolo fondamentale sulla progressione di malattia epatica e che il ferro stesso possa interferire con la risposta immunitaria e la produzione di citochine (62).

Ricordiamo, poi, che l'espressione del replicone HCV (genoma sprovvisto della proteina dell'envelope) in linee cellulari modula proprio l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo del ferro (63).

In modelli animali, nei quali il genoma virale è espresso parzialmente o totalmente, si osserva aumento di ferro epatico, dello stress ossidativo e predisposizione al tumore del fegato (64): topi transgenici, che esprimono la poliproteina virale, tendono all'accumulo di ferro anche senza che ne venga introdotto maggiormente con la dieta; inoltre, presentano ridotti livelli di mRNA codificante epcidina a livello epatico, facendo ipotizzare un ruolo delle proteine virali nell'inibizione della sua espressione (65). L'ipotesi è che lo stress ossidativo produca specie reattive che riducono l'espressione genica di epcidina, ma questo effetto è ancora da confermare (63).

Tutte le considerazioni fatte portano a concludere che l'accumulo di ferro nel fegato, qualora associato all'infezione da HCV, predice un andamento peggiore della malattia a livello epatico. L'accumulo di ferro può essere genetico o acquisito, e addirittura legato alla stessa infezione da HCV attraverso una ridotta espressione di epcidina virus-dipendente. L'aumento di ferro intraepatico potrebbe ipoteticamente favorire la replicazione virale, ma sicuramente induce stress ossidativo, che porta ad infiammazione cronica (1). A prescindere dal meccanismo coinvolto, l'eccesso di ferro peggiora la malattia epatica HCV correlata, dato questo corroborato dal fatto che la salassoterapia e una dieta a basso contenuto di ferro potrebbero migliorare l'infiammazione epatica e produrre minor danno ossidativo (64). Uno studio recente dimostra che si potrebbe ottenere una riduzione di incidenza di epatocarcinoma del 2% in pazienti trattati con salassoterapia (incidenza 0.9%) rispetto ai controlli non trattati (3.9%) (66).

Nonostante questi dati, non esiste un'univocità di conclusioni sul rapporto tra metabolismo del ferro ed epatopatia da HCV, che appare molto più complesso, ragione per cui i risultati della salassoterapia non sono concordi (67, 68): uno dei motivi è che l'accumulo di ferro può essere parenchimale o reticolo-endoteliale, ma l'effetto non è lo stesso. Non sappiamo su quale ferro la salassoterapia vada ad incidere e come essa modifichi il metabolismo del ferro, per cui è difficile stabilire se è utile e in quali pazienti può essere efficace. Per quanto riguarda il ferro come

fattore negativo di risposta al trattamento antivirale, i risultati discordanti rispetto alla salassoterapia fanno emergere molti interrogativi: quali pazienti beneficiano della salassoterapia e quali no? E' sufficiente testare il paziente con esami bioumorali (sideremia, ferritina, saturazione della transferrina) o è necessario indagare il metabolismo del ferro a livello epatico (espressione genica) nei pazienti che potrebbero essere sottoposti a trattamento antivirale? Esiste un ferro “buono” ed un ferro “cattivo” in questi pazienti? Solo la risposta a tali interrogativi permetterà di capire come possiamo agire a livello di metabolismo del ferro per aumentare l'effetto antivirale e di conseguenza la risposta al trattamento.

## VIA DI SEGNALE MEDIATA DALLA FAMIGLIA DELLE BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMPs) ED ESPRESSIONE DI EPCIDINA

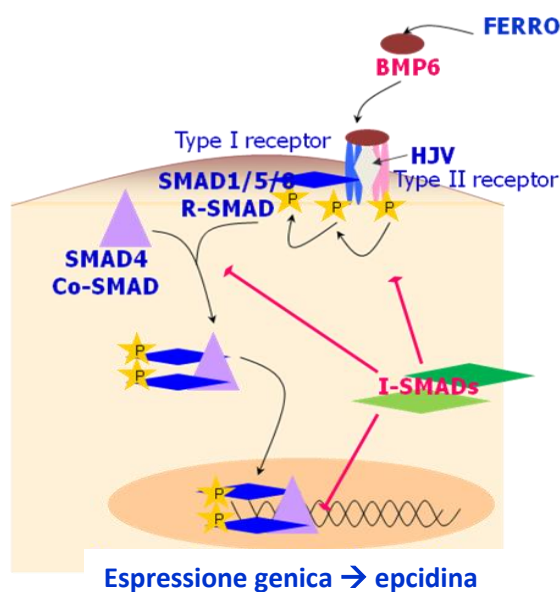


Fig.2: *Via di segnalazione del BMP6 che coinvolge i fattori trascrizionali SMADs*: all'aumentare del ferro disponibile aumenta l'attività del BMP6, che, formando un complesso con il suo corecettore emojuvelina (HJV), provoca fosforilazione di SMAD1/5/8, fattori di trascrizione che, legando SMAD4, traslocano nel nucleo e up-regolano l'espressione di epcidina. Le proteine definite in figura I-SMADs (SMAD6 e SMAD7) sono responsabili di un feedback negativo nei confronti della cascata e vengono prodotte in risposta allo stimolo del BMP6.

Abbiamo già discusso come le citochine infiammatorie, in particolare l'IL-6, possano portare alla produzione di epcidina tramite la via di segnale JAK/STAT3.

Vi è, però, un'altra via di segnale molto importante che porta all'espressione di epcidina, quella rappresentata in Fig.2., inizialmente studiata nell'ambito dell'emocromatosi. Nell'ambito dell'emocromatosi, infatti, si era osservato che diverse mutazioni in differenti geni portavano ad un fenotipo simile di malattia, suggerendo un meccanismo con una base comune. Questo succedeva in particolare per quattro tipi di emocromatosi dovuti a: mutazioni del gene HFE, mutazioni del Tfr2, mutazioni dell'emojuvelina (HJV), mutazioni dell'epcidina (69). Il tratto comune di tutte queste patologie è il peptide epatico epcidina, regolatore centrale del ferro corporeo, che agisce sugli enterociti, sui macrofagi e sulle altre cellule dell'organismo, non permettendo al ferro di fuoriuscire nel plasma, come già descritto. Individui con mutazioni in tali geni presentano ridotta attività dell'epcidina e cioè, in conclusione, incapacità di bloccare efficacemente l'assorbimento del ferro (27). Fino a poco tempo fa non c'era modo di collegare la mutazione nei geni elencati alla ridotta espressione di epcidina. In base ad alcune osservazioni ed analogie con altri tessuti, si è arrivati ad approfondire il significato di una via di segnale prima mai esplorata, coinvolgente alcune proteine dette *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), attualmente elementi riconosciuti come importanti regolatori dell'espressione di epcidina (70).

I BMPs rappresentano un'ampia sottopopolazione della superfamiglia dei ligandi del TGF- $\beta$ , che condividono un modello comune di trasduzione del segnale intracellulare (71). Il segnale inizia quando il ligando forma un complesso con il recettore di tipo 1 o 2 (BMPR1 o BMPR2); il recettore BMPR2 fosforila costitutivamente BMPR1, che a sua volta attiva la cascata di proteine dette SMADs, fosforilandole. La famiglia dei BMPs attiva in particolare SMAD1/5/8 (a differenza del TGF-beta che trasduce il segnale tramite SMAD2 e SMAD3). Le SMADs, attivate a loro volta, formano un complesso eteromero con SMAD4, che si trova nel citoplasma; il complesso trasloca nel nucleo cellulare e modula la trascrizione specifica di alcuni geni. I BMPs hanno diversi ruoli in molti processi fisiologici e patologici, inclusa la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'apoptosi ed il rimodellamento tissutale (72-74).

L'HJV è un membro della famiglia delle proteine dette *Repulsive Guidance Molecule* (RGM), i cui principali esponenti, RGMa ed RGMb, svolgono la loro funzione principalmente a livello del sistema nervoso centrale. L'HJV, invece, è espressa prevalentemente a livello muscolare (scheletrico e cardiaco) e in misura minore a livello epatico (27). RGMa e RGMb sono dei corecettori dei BMPs, perciò inducono la via di segnale dei BMPs (75, 76).

Per analogia, l'ipotesi formulata da Babitt et al. nel 2006, autori del primo studio che ha parzialmente chiarito la trasduzione del segnale indagando su come agisse l'HJV, prevedeva che l'HJV fungesse da corecettore dei BMPs a livello epatico, attivandoli e dando inizio ad una via di segnale che portava all'espressione di epcidina. Nei loro esperimenti su linee cellulari di epatoma dimostrarono che l'HJV interagiva con BMP2 e BMP4 come corecettori e che l'induzione del segnale BMP-mediato, per iperattivazione dell'HJV, portava ad aumento dell'espressione di *HAMP* (gene dell'epcidina); mutazioni nel gene dell'HJV, invece, producevano alterazioni del segnale a livello della cascata dei BMPs (77). L'emojuvelina era proposta, in conclusione, come corecettore dei BMPs, assumendo un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione di epcidina (77).

Per quanto riguarda l'approfondimento della via di segnale *in vivo*, Wang et al. avevano osservato che topi con specifico knock-out per *smad4* presentavano ridotti livelli di epcidina e accumulo intraepatico di ferro (78); inoltre, nello stesso studio, sia il TGF- $\beta$  che BMP4 erano in grado di indurre in misura maggiore l'espressione di epcidina. Successivamente, Babitt et al. hanno dimostrato che topi knock-out per il gene *hfe2*, che manifestano espressione dell'epcidina ridotta e sviluppano fenotipo dell'emocromatosi, presentano un significativamente ridotto livello di SMAD fosforilati (77). Il lavoro di Babitt ha rappresentato un significativo progresso nella comprensione della via di segnale intracellulare attivata dall'HJV, sollecitando ulteriori interrogativi nell'ambito della composita patologia dell'emocromatosi, che manifesterebbe fenotipi diversi a seconda della molecola mutata, con blocco della trasduzione a quel livello (79). A sostegno di questa conclusione, un recente articolo dimostra come l'espressione di BMPs e SMADs sia alterata in biopsie epatiche ottenute da pazienti affetti da emocromatosi basata su mutazione C282Y HFE (80).

La ricerca è ulteriormente progredita nello studio dei BMPs, in particolare relativamente a due membri della famiglia, il BMP6 e il BMP7, il primo dei quali risulta interessante come elemento fondamentale per la formulazione dell'ipotesi che è alla base del nostro studio.

Il BMP6 rappresenta un regolatore essenziale per l'espressione di epcidina, come dimostra uno studio di Andriopoulos et al. condotto *in vivo* su topi: topi knock-out per BMP6 presentavano lo stesso fenotipo di malattia epatica di topi *Hfe2<sup>-/-</sup>* (81). La somministrazione di BMP6 provocava nei topi aumento dell'espressione dell'mRNA epatico codificante per epcidina, riduzione della sideremia e riduzione della saturazione della transferrina sierica (81). La dieta modificava in modo direttamente proporzionale BMP6 ed epcidina (81). *In vitro*, il blocco del segnale a livello di BMP6 con anticorpi specifici produceva riduzione marcata di epcidina, inibendo l'azione dell'HJV; oltre che l'epcidina, anche l'mRNA di *idl*, un gene target di BMP6, risultava ridotto (81). Il BMP6 dimostrava, quindi, di rivestire un ruolo importante come regolatore endogeno dell'espressione di epcidina e, *in vivo*, del metabolismo del ferro. Inoltre, confrontando la diversa risposta ai vari BMPs, il BMP6 risultava il più importante regolatore *in vivo*, rispetto al BMP2 ed al BMP4, che *in vitro* erano preponderanti; non ultimo, nei topi *Bmp6<sup>-/-</sup>* l'espressione di altri BMPs non era aumentata, suggerendo che il ruolo di BMP6 nel metabolismo del ferro non può essere sostituito da nessun altro membro della famiglia (81). Il BMP6 è stato confermato in studi successivi come un elemento, indotto dal ferro a livello epatico, che causa aumento dell'espressione di epcidina attraverso la via del corecettore HJV e degli SMADs intracellulari, confermandone il ruolo chiave nella regolazione del metabolismo del ferro (82).

L'altro dato molto importante è che il BMP7, come è stato recentemente dimostrato da Sakamoto et al., assume *in vitro* effetto antivirale sinergico con l'IFN- $\alpha$  e potere inducente sui geni stimolati dall'interferone in assenza di esso. Lo studio è stato condotto su due modelli di infezione da HCV *in vitro*, rappresentati dal replicone subgenomico HCV e cellule infette da HCV-JFH1: cellule trattate con il BMP7 dimostravano riduzione della produzione di proteine virali e quindi soppressione del virus, senza intaccare la vita della cellula (83). Inoltre, trattando le cellule con IFN- $\alpha$  e BMP7, si osservava una riduzione della replicazione virale in modo sinergico,



quando si utilizzava il trattamento combinato (83). Infine, si dimostrava che l'esposizione delle cellule a BMP7 aumentava l'espressione di MxA e 2-5-OAS, geni inducibili dall'interferone, anche se in misura minore rispetto all'IFN- $\alpha$  da solo (83). Sicuramente non è chiaro a che livello la via attivata dal BMP e quella attivata dall'IFN comunichino tra loro, ma i risultati potrebbero far pensare ad un'influenza sinergica di BMP7 con l'IFN- $\alpha$  lungo la via JAK/STAT (83). Probabilmente i due fattori interferiscono anche ad altri livelli, ad esempio con il segnale delle MAP chinasi (MAPK p38 o ERK1/2) (83, 84). A sostegno di queste ipotesi vi sono studi *in vitro* che dimostrano come, silenziando la chinasi JAK1, l'espressione di epcidina sia di molto soppressa; questa osservazione conferisce importanza alla via JAK/STAT come possibile induttore di epcidina.

Altri elementi essenziali, che finora non abbiamo nominato, sono le SMADs, non tanto quelle che fungono da complesso di traslocazione nel nucleo, ma quelle inibitorie, che producono un feedback negativo sulla via di segnale attivata dai BMPs: SMAD6 e SMAD7, detti anche I-SMAD (*Inhibitors*). Sono, infatti, fattori inibitori, che fungerebbero da feedback negativo nei confronti dell'attivazione delle SMAD inducenti, cioè SMAD 1/5/8 e SMAD4.

Uno studio molto recente su colture cellulari di epatoma Huh7 ha dimostrato come la stimolazione con BMPs e TGF- $\beta$  sia in grado di indurre l'espressione di SMAD7 e conseguentemente di ridurre l'espressione di epcidina (85); lo stesso risultato si otteneva con TNF- $\alpha$ , mentre l'inverso era ottenuto con IL6 (85). Per meglio definire l'effetto inibitore di SMAD7, gli autori hanno allestito un modello di over-espressione di tale gene in colture: l'iperinduzione di SMAD7 neutralizzava la risposta a BMP6, portando a ridotta espressione di epcidina BMP inducibile (85). Il fattore SMAD7 richiede l'attivazione di SMAD4 per essere prodotto, portando allo sviluppo di un feedback negativo, per evitare un'eventuale iperattivazione della via di segnale (85).

Ma come agisce SMAD7? Sembra esistano diversi meccanismi d'azione inibitoria della molecola: a) blocca la fosforilazione dei recettori di TGF- $\beta$  e di BMPs (86-88); b) blocca la fosforilazione di R-SMADs coinvolte nella trasduzione del segnale (89); c) media la degradazione di SMAD4 (90); d) è in competizione con il complesso attivatore di SMADs (formato SMAD1/5/8 e SMAD4) nel legame con il promotore

di geni target (91). Recentemente è stato pubblicato un lavoro di Mleczko-Sanecka basato su esperimenti *in vitro*, in cui viene dimostrata anche un'azione diretta di SMAD7 su un altro motivo del promotore dell'epcidina, rispetto a quello utilizzato da SMAD4 (85).

La conclusione è l'identificazione di SMAD7 come potente inibitore della via BMP/SMADs mediata, effetto che potrebbe essere preventivo nei confronti di eventuale iper-espressione di epcidina e conseguente deficienza marcata di ferro (85).

## **IPOTESI E SCOPO DELLO STUDIO**

L'ipotesi alla base dello studio è che il virus dell'epatite C sia in grado di interferire, direttamente o indirettamente, con la via di segnale BMP6/SMAD1/5/8 che controlla *in vivo* la sintesi di epcidina, ormone regolatore del metabolismo del ferro.

### ***In vivo***

Scopo dello studio è stato valutare su mRNA, estratto da biopsie pre-terapia ottenute pazienti HCV positivi seguiti presso l'Ospedale S. Bortolo di Vicenza:

- 1) l'espressione genica di epcidina (gene *HAMP*), BMP6, SMAD6 e SMAD7, ID1, emojuvelina (HJV), in pazienti HCV positivi rispetto a controlli non epatopatici
- 2) l'espressione genica di epcidina (gene *HAMP*), BMP6, SMAD6 e SMAD7, ID1, emojuvelina (HJV) in pazienti *responders* (SVR) rispetto a pazienti *non responders* (NR) a trattamento antivirale combinato (interferone peghilato+ ribavirina)

### ***In vitro***

Scopo dello studio è stato valutare su colture cellulari di linee di epatoma umane e su modelli di infezione HCV su colture cellulari (vedi, per i dettagli, il capitolo su Materiali e Metodi per dettagli):

- 1) l'espressione genica della cascata BMP6/SMAD 1/5/8 in colture cellulari HCV positive rispetto a colture non infette e la sensibilità di tali cellule al trattamento con BMP6 nella produzione di epcidina

- 2) il ruolo degli I-SMADs (SMAD6 e SMAD7) nel modulare l'espressione di epcidina (gene *HAMP*)
- 3) il ruolo del TNF- $\alpha$  nel modulare i geni coinvolti nella via di segnale del BMP6
- 4) il ruolo di anticorpi anti-TNF- $\alpha$  per ripristinare la sensibilità cellulare al BMP6, come effetto sull'espressione di epcidina

## **MATERIALI E METODI**

### **BIOPSIE EPATICHE**

Le biopsie epatiche sono state ottenute da pazienti HCV positivi prima del trattamento antivirale, allo scopo di stadiare la malattia epatica. La stadiazione è stata fatta secondo Ishak. Dalla biopsia epatica è stato estratto un frammento, posto in Eppendorf, conservato prima in azoto liquido e poi in freezer a -80°C, per la corretta preservazione degli acidi nucleici.

Nessun paziente presentava saturazione della transferrina > 45% né mutazioni positive omozigoti o eterozigoti per i geni dell'emocromatosi. Tutti i pazienti erano HBV e HIV negativi. I pazienti definiti *Sustained Virological Responders* (SVR) presentavano HCV-RNA non rilevabile a 6 mesi dal termine della terapia antivirale, mentre i *Non Responders* (NR) erano tutti coloro che non presentavano riduzione della viremia > di 2 log alla 12<sup>a</sup> settimana.

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico e tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato prima che il materiale fosse utilizzato.

### **LINEE CELLULARI**

Sono state utilizzate linee cellulari di epatoma umane: Huh7, Huh7.5, Hep3B, HepG2. Le cellule sono state coltivate in DMEM o MEM, a seconda della linea utilizzata, con l'aggiunta di siero di vitello (5%), antibiotici, aminoacidi essenziali. Le cellule sono state tripsinizzate ogni 72 ore (o diversamente in base alle esigenze dell'esperimento) ed il terreno di coltura rinnovato. Tutti gli esperimenti su linee cellulari sono stati condotti in parallelo su più fiasche di coltura.

## **Esempio di protocollo per coltura cellulare.**

### **Coltura di cellule della linea Huh7.5**

Terreno di coltura costituito da:

- DMEM (Invitrogen) 500 mL
- Siero di vitello 50 mL
- Penicillina/streptomicina 5 mL
- L-glutamina 5 mL
- Aminoacidi non essenziali 5 mL

Coltura:

Le cellule congelate vengono conservate a temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una volta scongelate e poste in una fiasca da  $25\text{ cm}^2$  a temperatura controllata di  $37^{\circ}\text{C}$ , aderiscono in circa 4 ore. Dopo circa 24 ore si cambia il terreno. Le cellule vengono coltivate nella fiasca e, quando giungono ad essere confluenti all'80-90%, solitamente dopo 72 ore, si prosegue con la tripsinizzazione.

Tripsinizzazione delle cellule:

- Lavare le cellule confluenti sul fondo della fiasca con PBS e aspirare il PBS
- Aggiungere tripsina/EDTA alla fiasca, in quantità sufficiente a coprire appena il fondo della fiasca
- Riporre la fiasca per 2-3 minuti a  $37^{\circ}\text{C}$  (incubatrice), non troppo a lungo per evitare che la tripsina danneggi le cellule
- Aggiungere il terreno di coltura per inibire l'attività della tripsina
- Ottenere una singola sospensione di cellule e prelevare circa 2uL
- Contare la quantità desiderata di cellule

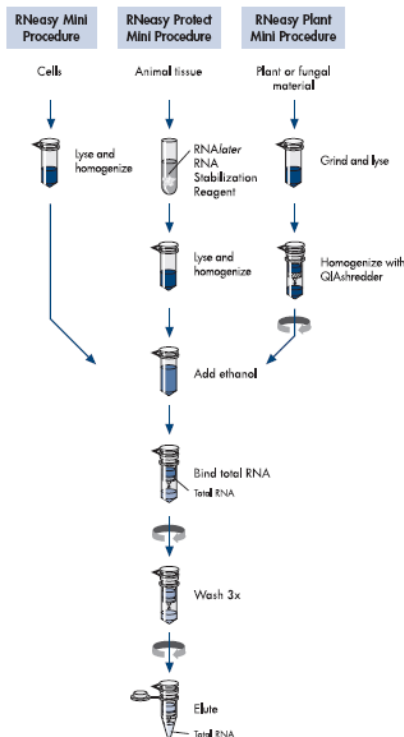
## ESTRAZIONE DELL'mRNA DA BIOPSIA EPATICA/CELLULE E SINTESI DEL cDNA PER q(uantitative)R(eal)T(ime)-PCR

L'estrazione dell'mRNA dalle biopsie epatiche dei pazienti è stata eseguita secondo il protocollo descritto in "Rneasy mini kit". Per le biopsie epatiche si è ottenuta l'omogenizzazione tissutale con "QIAshredders" (Quiagen).

Un riassunto del protocollo è riportato in Tab.1.

E' stato, poi, retroscritto il cDNA con il kit "High Capacity RNA-to-cDNA" (Applied Biosystems). Le reazioni di qRT-PCR sono state eseguite con "Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) diluiti in "Taqman Gene Expression Master Mix" (Applied Biosystems). Sono stati utilizzati i primers indicati in Tab.2. Il cDNA è stato diluito in "Nuclease-free Water" (Ambion) per ottenere una concentrazione finale di 1-3 ng/uL. I campioni sono stati analizzati in duplice copia e il dato quantitativo è relativo all'espressione di GAPDH, la cui concentrazione è stabilita dalla curva standard, allestita precedentemente nello stesso laboratorio con la stessa apparecchiatura.

Tab.1: Purificazione dell'RNA con kit "Rneasy Mini Kit" (QIAGEN)



### 1. LISI ED OMOGENIZZAZIONE

La lisi delle cellule è stata ottenuta per utilizzo di rotore e pipetta, mentre per il tessuto è stato utilizzato un mortaio elettrico. La lisi avveniva in presenza di una soluzione specifica. Il materiale proveniente da biopsie è stato filtrato in apposite colonne, al fine di ottenere un composto omogeneo (QIAshredders)

### 2. AGGIUNTA DI ETANOLO

E' un passaggio indispensabile per il legame specifico dell'RNA con la membrana della colonna

### 3. PURIFICAZIONE DELL'RNA

Passaggi di centrifugazione a >10.000rpm hanno permesso l'allontanamento di contaminanti per ottenere infine RNA di alta qualità in acqua priva di RNasi

<b>Nome del gene</b>	<b>Assay ID</b>
Bone Morphogenetic Protein 6 (BMP6)	<b>Hs01099594_m1</b>
Glyceraldeide-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	<b>Hs99999905_m1</b>
Hepcidin AntiMicrobial Peptide (HAMP)	<b>Hs00221783_m1</b>
Hemochromatosis Type 2 (juvenile) (HJV)	<b>Hs00377108_m1</b>
SMAD family member 6 (SMAD6)	<b>Hs00178579_m1</b>
SMAD family member 7 (SMAD7)	<b>Hs00998193_m1</b>
Tumor Necrosis Factor (TNF superfamily, member 2) (TNF- $\alpha$ )	<b>Hs00174128_m1</b>

Tab.2: *Primers utilizzati per la qRT-PCR nei vari esperimenti, sia in vitro che in vivo*

## **MODELLO DI INFEZIONE DA HCV**

Il modello è stato ottenuto utilizzando cellule Huh7.5, permissive all'infezione HCV, virione Jc1-RNA; la proporzione di particelle virali standard utilizzata rispetto alle cellule era 2/100, cioè "*Multiplicity Of Infection*" (MOI) = 0.02. In alcuni esperimenti sono state utilizzate MOI crescenti per vedere se la quantità di virus utilizzata modificava i risultati. L'infezione veniva proseguita per 9-11 giorni per ottenere una propagazione nel 90% delle cellule.

## **IMMUNOFLUORESCENZA**

Per dimostrare la presenza dell'infezione nelle cellule è stato utilizzato un protocollo di immunofluorescenza che prevedeva, come risulta in Tab.3, fissazione delle



cellule, permeabilizzazione, incubazione con anticorpo primario contro una proteina strutturale virale, infine incubazione con anticorpo secondario, provvisto di sonda immunofluorescente. La conta delle cellule infette era eseguita su immagini ottenute dalla visione attraverso microscopio ad immunofluorescenza (Fig.4).

Tab. 3: *Protocollo per immunofluorescenza*

1. Fissare le cellule con Metanolo: Acetone 1:1 a temperatura ambiente per 9 minuti
2. Eseguire un lavaggio con PBS/T
3. Bloccare le cellule con latte in polvere per 30 minuti
4. Eseguire un lavaggio con PBS/T
5. Incubare con anticorpi di topo anti-HCV core C7-50 (1:300) o anticorpi monoclonali di topo anti-HCV-NS5A a temperatura ambiente per 1 ora su un rocker
6. Eseguire 3 lavaggi con PBS/T per 10 minuti ciascuno
7. Incubare con anticorpi anti-topo coniugati con FITC (fluorescente) a temperatura ambiente al buio per 1 ora
8. Eseguire 3 lavaggi con PBS/T per 10 minuti ciascuno
9. Aggiungere Vectashield/Dapi e guardare al microscopio

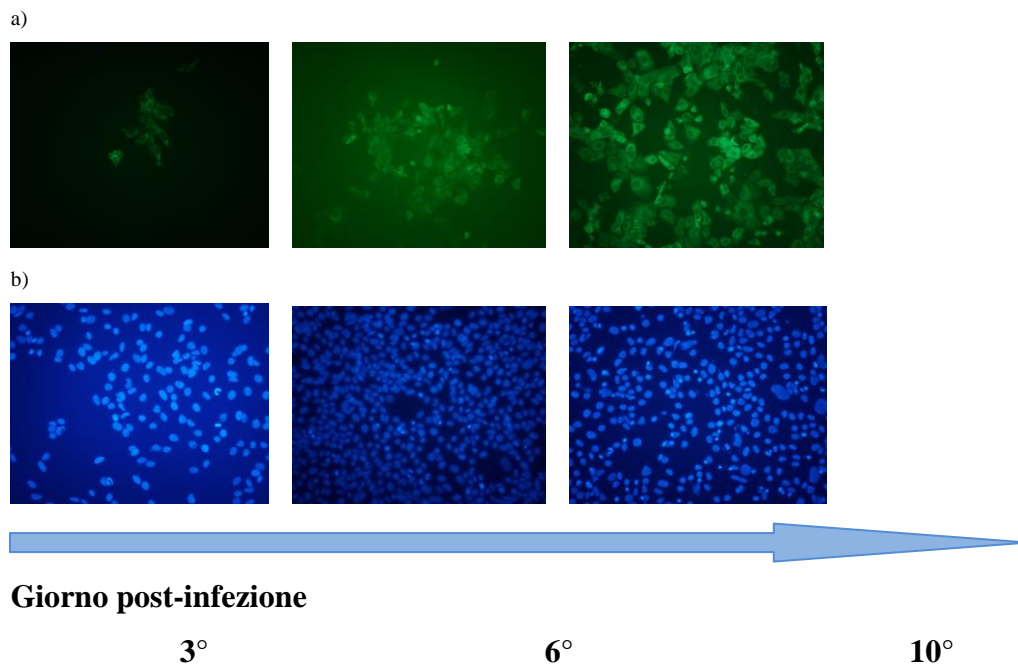


Fig.4: *Visione al microscopio ad immunofluorescenza: a) cellule infette, b) i nuclei colorati con DAPI*

## **ELISA**

Per valutare se alla quantità di *HAMPmRNA* espresso corrispondesse anche una proporzionale concentrazione di peptide epcidina, cellule Hep3B sono state trattate per 12 ore con crescenti concentrazioni di IL6 per indurre diverse quantità di epcidina. Il supernatante è stato analizzato con l'”Hepcidin ELISA kit” (BaChem), secondo le istruzioni. Successivamente il risultato è stato correlato con quello ottenuto dalla qRT-PCR.

## **WESTERN BLOT**

Cellule Hep3B sono state coltivate in terreno MEM- $\alpha$  ed esposte a TNF- $\alpha$  alla concentrazione di 20 ng/mL 48 ore prima dell'aggiunta di BMP6 ad una concentrazione finale di 2 nM. Il lisato è stato ottenuto dopo 1 ora o dopo 18 dall'aggiunta di BMP6. Brevemente: le cellule sono state tripsinizzate e lisate per 20 minuti in ghiaccio in NP40 1% buffer, supplementata con inibitori delle proteasi (Sigma) alla concentrazione 1/500 e con cocktail 2 di inibitore della fosfatasi (Sigma) 1/100. Il lisato è stato centrifugato a 4°C a 13.000 rpm per 5 minuti; il supernatante è stato conservato a -80°C fino ad esecuzione del WB. Il contenuto proteico del lisato è stato normalizzato utilizzando “BCA assay” (Pierce) ed è stato fatto correre su SDS-PAGE mini-gels, sottoposti a corrente in cassetta per WB. I gels sono stati poi trasferiti su membrane di nitrocellulosa (Amersham), che sono state successivamente bloccate per 1 ora a temperatura ambiente con PBS addizionato con latte in polvere al 5%. Le membrane di nitrocellulosa sono state poi incubate per 12 ore a 4°C in TBS-TWEEN contenente BSA 5% con i seguenti anticorpi primari: mouse-anti-beta-actin (controllo positivo) (Sigma), mouse anti-rabbit IgG (controllo negativo) (Dako), rabbit anti-pSMAD1/5/8 (Cell Signaling), rabbit anti-SMAD1 (Cell Signaling) o rabbit anti-H.Pylori (controllo negativo) (Dako). Le membrane sono state lavate e poi incubate per 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari: goat anti-mouse HRP (Dako) 1:750 e donkey anti-rabbit HRP (Santa

Cruz) 1:10.000. Le membrane sono state poi sviluppate utilizzando il reagente ECL (Amersham).

### **TRATTAMENTO DELLE CELLULE CON BMP6 E TNF- $\alpha$**

Cellule Huh7.5, infettate con HCV, come sopra descritto, o cellule pre-trattate con anticorpi anti-TNF- $\alpha$ , come sotto descritto, sono state incubate per il tempo indicato negli esperimenti con diversa titolazione di BMP6 o TNF- $\alpha$  ricombinante (R&D Systems).

### **TRATTAMENTO CON ANTICORPI ANTI-TNF- $\alpha$**

E' stato utilizzato l'anticorpo neutralizzante anti-TNF- $\alpha$  clone 1825 (R&D Systems), supplementando il terreno di coltura delle cellule Huh7.5 infettate alla concentrazione di 0.2 ug/mL, a partire dal secondo giorno dall'infezione fino al termine del tempo previsto di 9-11 giorni.

### **KNOCK-DOWN MEDIATO DA siRNA**

Cellule Hep3B e Huh7 sono state transfettate con "Silencer Select siRNA" contro SMAD6 e/o SMAD7, utilizzando due siRNA per ogni gene target, denominati A e B, ad una concentrazione finale di 5nM di ogni siRNA nella soluzione di transfezione. Il protocollo seguito è stato il "si PORT NeoFX di Ambion". siPORT e siPORT NeoFX erano diluiti in Opti-MEM I medium (Invitrogen). Le cellule venivano testate per l'espressione genica dopo 48 ore dalla transfezione.

Per il knock-down di SMAD6 sono stati usati siRNA s8411 e siRNA costruito con le seguenti sequenze: senso CCACAUUGUCUUACACUGAtt; antisenso: UCAGUGUAAGACAAUGUGGaa. Per il knock-down di SMAD7 sono stati usati, invece, siRNAs s8412 e s8413.

Le cellule venivano anche transfettate per GAPDH (controllo positivo, Silencer Select n.4390849) e per un siRNA su gene non target (controllo negativo, Silencer Select n.4390843), entrambi Ambion. Il controllo negativo era transfettato a concentrazioni corrispondenti al siRNA transfettato per il knockdown di un singolo I-SMAD o per il knockdown di entrambi gli I-SMAD.

## **ANALISI STATISTICA**

I dati ottenuti sono stati analizzati con Microsoft Excel (Microsoft Inc.) e Graphpad Prism (Graphpad Software Inc.). L'analisi statistica e le rappresentazioni grafiche dei dati sono stati ottenuti utilizzando Graphpad Prism.

I test statistici utilizzati sono riportati nella legenda delle figure.

E' stato utilizzato il test ANOVA ad una via ed il t-test a due code, per dati appaiati e per dati non appaiati. Dove la distribuzione non era gaussiana, è stato eseguito il t-test di Mann-Whitney.

## RISULTATI

### *In vivo*

Sono state analizzate in tutto 57 biopsie di pazienti HCV positivi e 8 biopsie di controlli sani, ottenuti da pazienti senza epatopatia nota. Le caratteristiche principali dei pazienti analizzati sono riassunte nella Tab.4.

	Controlli N=8	HCV N=57
Età (anni)	67.4 (53.9 – 81.0), n=7 <sup>c</sup>	44.1 (38.3 – 43.9)
Genere (M/F)	8 / 0	32 / 25
Viremia (IU)	-	1.30 x 10 <sup>6</sup> (7.46 x 10 <sup>5</sup> – 1.85 x 10 <sup>6</sup> )
Genotipo virale (1/3)	-	42 / 15
Stadio di fibrosi (0/lieve/severa) <sup>a</sup>	-	35 / 22 / 0
Risposta a terapia (SVR/NR/altro) <sup>b</sup>	-	17 / 9 / 31

Tab.4: *Caratteristiche cliniche/biumorali/istologiche dei pazienti studiati*

Legenda:

<sup>a</sup> fibrosi: 0 = assente; lieve = METAVIR 1-2 o Ishak 1-3; severa = METAVIR 3-4 o Ishak 4-6.

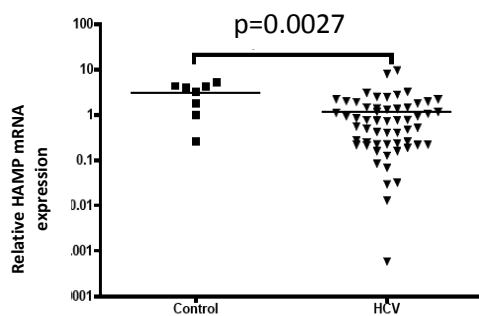
<sup>b</sup> Risposta alla terapia antivirale: SVR = HCV-RNA negativo dopo 6 mesi da fine terapia;  
NR = discesa di HCV-RNA minore di 2 log alla 12<sup>o</sup> settimana; altro = trattamento in corso o relapse.

Nessun paziente presentava omozigosi o eterozigosi per geni dell'emocromatosi, né aumento patologico della saturazione della transferrina. Come si può notare, tutte le biopsie analizzate documentavano una malattia caratterizzata da fibrosi lieve o assente, mentre la distribuzione in base al grading risultava più eterogenea.

Nell'analizzare l'm-RNA estratto dalle biopsie epatiche ci siamo posti i seguenti quesiti:

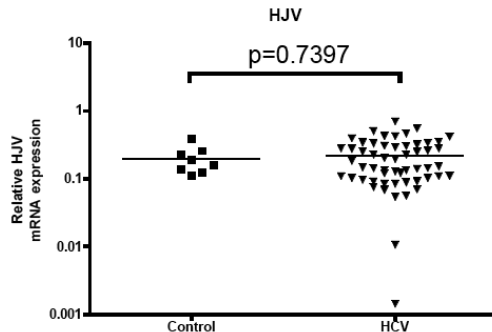
1) C'è differenza nell'espressione di epcidina (gene *HAMP*), BMP6, SMAD 6 e SMAD 7, emojuvelina (HJV) in pazienti HCV rispetto ai controlli?

### Epcidina (*HAMP*)



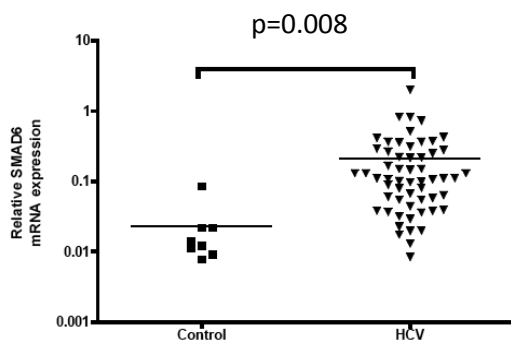
I livelli di mRNA codificanti l'epcidina sono significativamente più bassi in pazienti HCV+ rispetto ai controlli (Mann-Whitney t-test,  $p=0.0027$ )

### Emojuvelina (HJV)



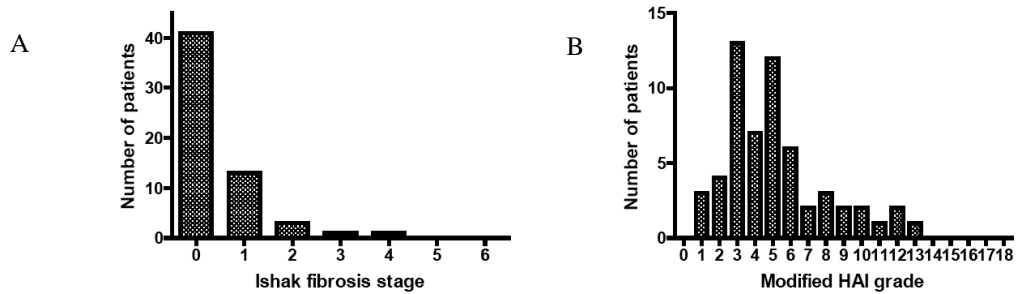
I livelli di mRNA codificante l'HJV non sono significativamente differenti nelle due popolazioni (Mann-Whitney t-test,  $p=0.7$ )

### SMADs

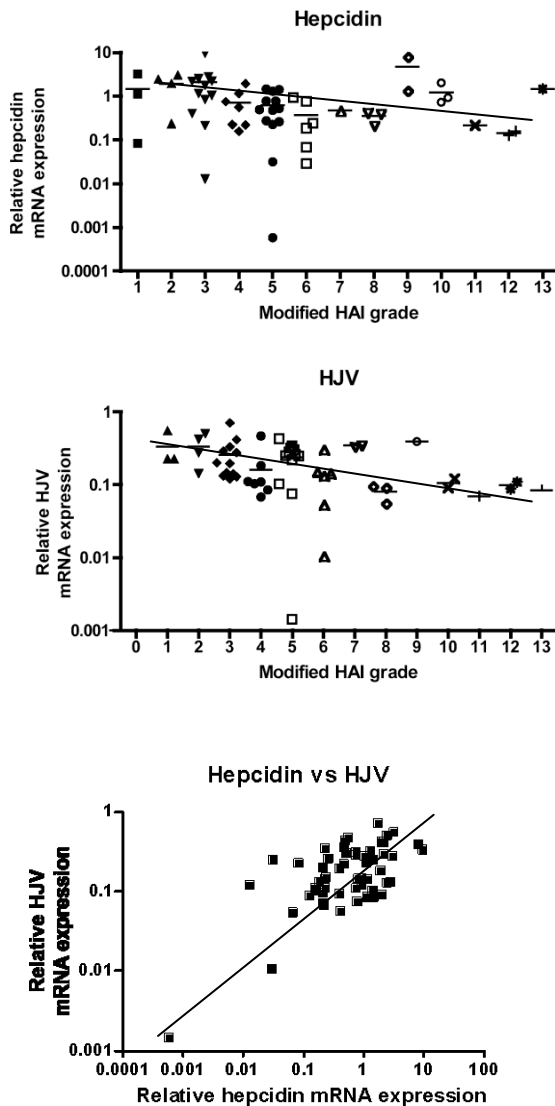


I livelli di mRNA codificanti SMAD6 sono più alti in pazienti HCV+ rispetto ai controlli ( $p=0.008$ ); per SMAD7 vi è tendenza, ma non significatività statistica (Mann-Whitney t-test)

## 2) Esiste correlazione tra espressione genica di epcidina, HJV ed istologia?



Distribuzione delle biopsie analizzate, secondo stadio (A) e grado (B). La maggior parte delle biopsie dimostravano stadi precoci di malattia, mentre il grado era molto eterogeneo.



I livelli di mRNA codificanti epcidina ed emojuvelina sono significativamente più alti in pazienti con grado istologico più basso ( $p=0.01$ )

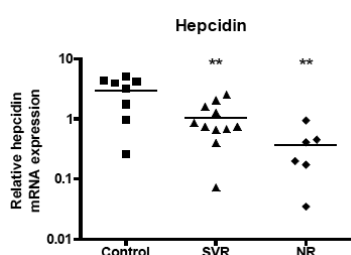
Maggiore espressione di HJV correla in senso direttamente proporzionalmente con maggiore espressione di HAMP ( $p<0.001$ )

### 3) Pazienti *responders* e *non responders* al trattamento antivirale presentano diversa espressione dei geni della via di segnale del BMP6?

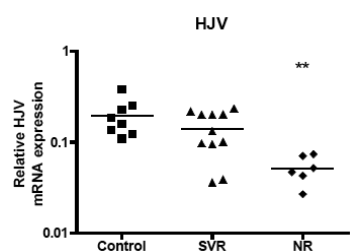
Nella Tab.5 sono riportate le caratteristiche dei pazienti analizzati. Non è stato possibile condurre un'analisi di confronto tra genotipo 1 e genotipo 3 per l'esiguità del campione di genotipo 3.

Caratteristica	SVR=17	NR=9
Età media	36.8 (31.5 – 42.0)	43.7 (37.3 – 50.1)
Genere (M/F)	9/8	4/5
Viremia	$1.06 \times 10^6$ ( $4.97 \times 10^5 - 1.61 \times 10^6$ )	$9.77 \times 10^5$ ( $4.67 \times 10^4 - 1.91 \times 10^6$ )
Genotipo virale (1/3)	11 / 6	7 / 2
Fibrosi (0/lieve/severa)	10 / 7 / 0	3 / 6 / 0

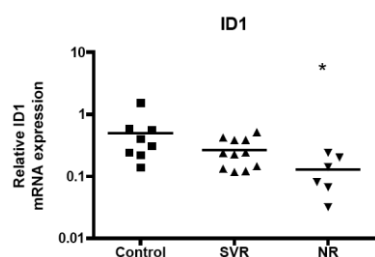
Tab.5: Caratteristiche dei pazienti trattati *responders* (SVR) e *non responders* (NR)



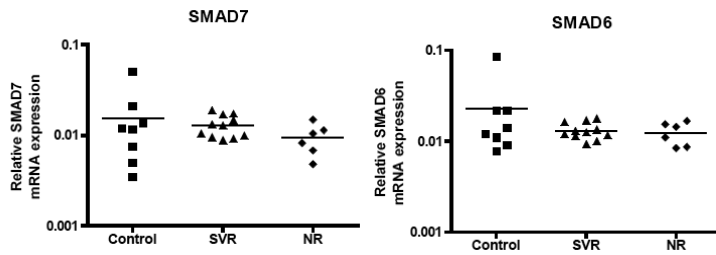
I livelli di mRNA codificante l'epcidina sono significativamente ridotti sia negli SVR che nei NR rispetto ai controlli ( $p=0.0001$ ); l'espressione di HAMP è significativamente più bassa nei NR rispetto ai SVR ( $p=0.008$ ) (test ANOVA ad una via)



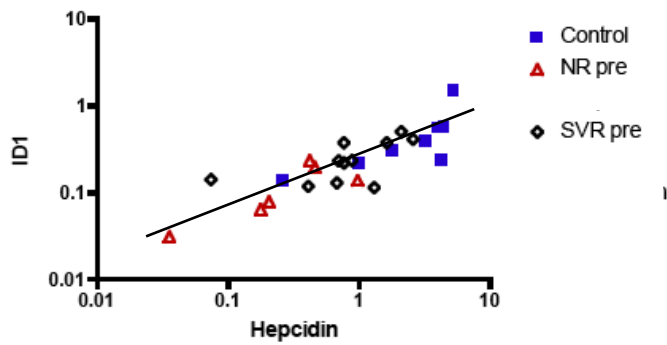
I livelli di mRNA codificante HJV e ID1 sono significativamente ridotti nei NR rispetto ai controlli (rispettivamente  $p=0.0027$  e  $p=0.0515$ ), mentre gli SVR si comportano come i controlli (test ANOVA ad una via)







I livelli di mRNA codificante I-SMADs non si differenziano significativamente nei tre gruppi di pazienti

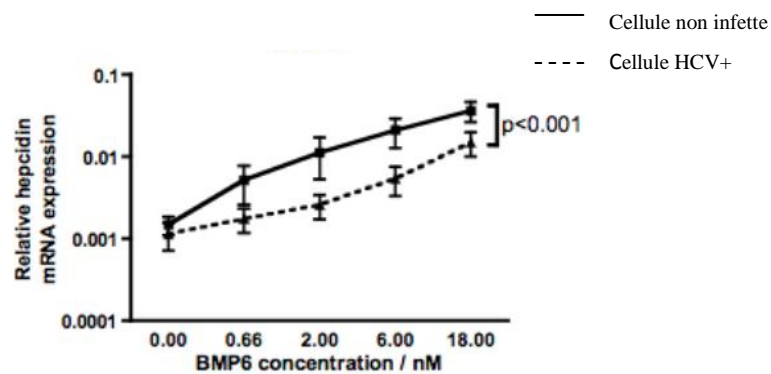


I livelli di mRNA codificanti *IDI* ed epcidina, entrambi geni target del BMP6, erano direttamente proporzionali tra loro nei controlli, negli SVR e nei NR ( $r^2=0.5980$ ). Nel nostro caso questo risultato è servito per confermare che la via di segnale del BMP era compromessa nei pazienti NR piuttosto che nei pazienti SVR, visto che i NR presentavano ridotta espressione di entrambi i geni.

*In vitro*

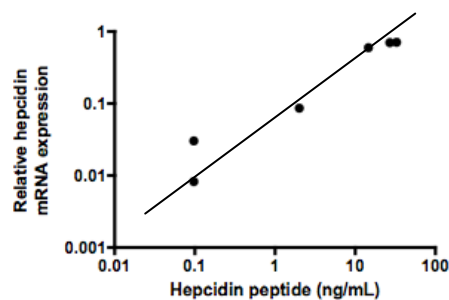
Per quanto riguarda gli esperimenti *in vitro*, abbiamo proceduto per quesiti come segue:

**1) Cellule infette con HCV e cellule non infette sono ugualmente responsive al BMP6 in termini di espressione di gene dell'epcidina?**



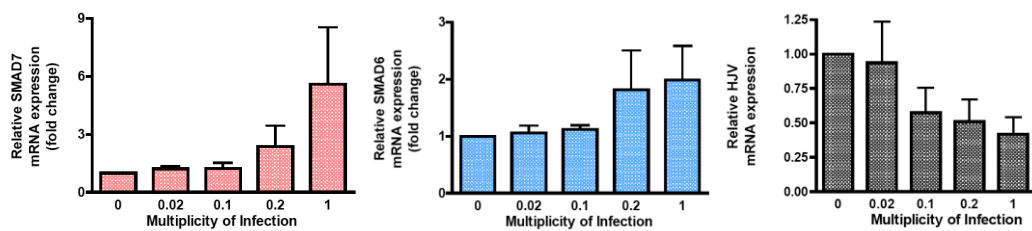
**Espressione di gene dell'epcidina (*HAMP*) indotta da trattamento con BMP6.** Nella figura è rappresentato il confronto dell'espressione del gene *HAMP* tra cellule infette e non infette. Sono state analizzate cellule Huh7.5 infettate con MOI 0.02 per 10 giorni e cellule non infette, entrambe stimulate con concentrazioni crescenti di BMP6, per 12 ore. Il grafico dimostra induzione di epcidina significativamente minore in cellule infette rispetto a cellule non infette (t-test per dati appaiati, ottenuti da 6 esperimenti indipendenti,  $p < 0.001$ ).

**2) L'espressione di mRNA codificante l'epcidina correla con le concentrazioni di proteina?**



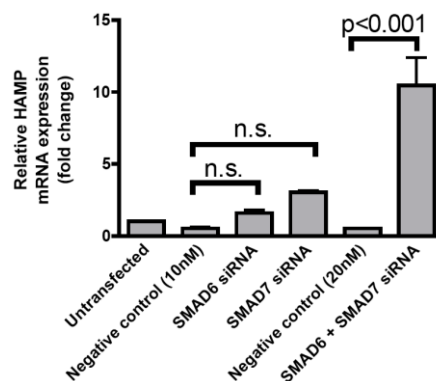
**Confronto tra concentrazioni di epcidina nel sopranatante e livelli di mRNA codificante l'epcidina (ELISA vs qRT-PCR).** Per dimostrare che i livelli di mRNA di *HAMP* corrispondevano al peptide epcidina, cellule Hep3B sono state incubate con BMP6 e nel supernatante è stato eseguito un test ELISA. qRT-PCR e ELISA sono direttamente proporzionali, eccetto ai livelli più bassi di espressione, in cui la sensibilità della qRT-PCR supera la sensibilità della metodica ELISA al peptide. Perciò, il metodo che è stato preferito per la quantificazione dell'epcidina è stato la qRT-PCR.

### 3) La MOI ha un effetto sull'espressione di geni codificanti I-SMADs ed HJV?

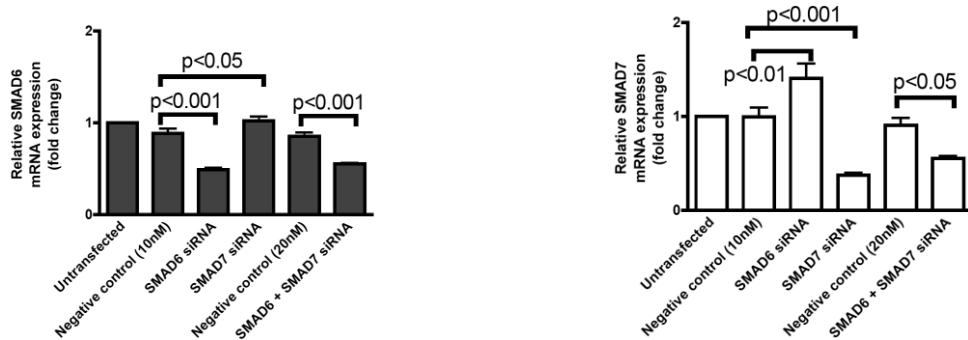


**Espressione di I-SMADs e HJV in cellule infette con diverse MOI.** Come raffigurato nei grafici, al crescere della MOI aumenta l'espressione di I-SMAD (SMAD6 e SMAD7) e decresce l'espressione di emojuelina (t-test per dati appaiati, ottenuto da 6 esperimenti indipendenti).

### 4) Che effetto inibitore esercitano gli I-SMADs sull'espressione di epcidina?



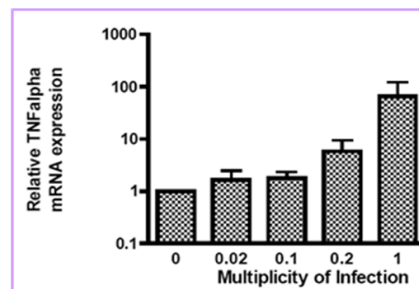
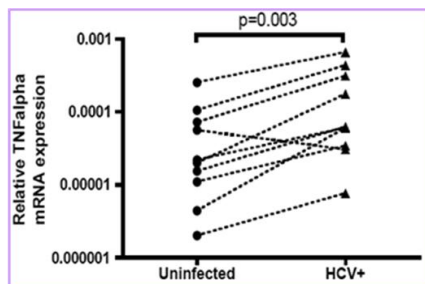
**Effetto del knock-down di SMAD6 e SMAD7 sull'espressione di epcidina.** Huh7 sono state transfettate con siRNAs e sono stati rilevati i livelli di HAMP con qRT-PCR. Il knock-down di uno degli I-SMAD aumenta ma non significativamente l'espressione di HAMP, mentre il knock-down di entrambi porta ad up-regolazione importante di epcidina (ANOVA ad una via, con test di Bonferroni,  $p < 0.001$ ).



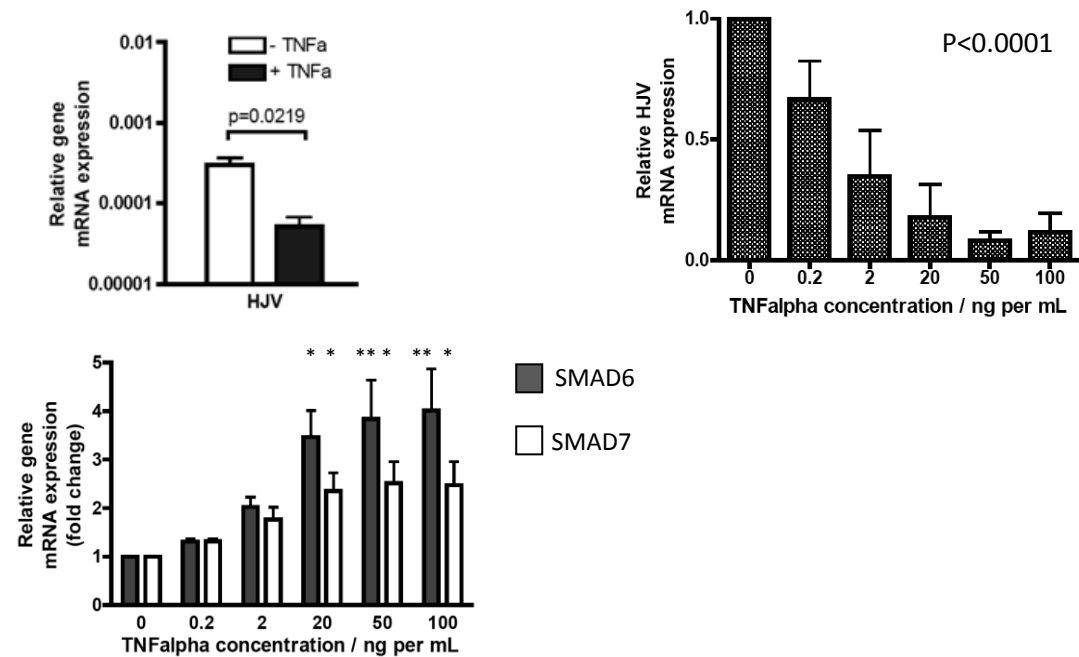
**Effetto del knock-down di SMAD6 e SMAD7 sull'espressione di epcidina.**

Potrebbe esserci un effetto di compensazione tra i due I-SMAD: il knock-down di uno dei due I-SMAD porta ad aumento significativo di espressione dell'altro (ANOVA ad una via, con test di Bonferroni).

**5) TNF- $\alpha$  inibisce la differenziazione BMP indotta negli osteoblasti e può correlare con mancata risposta alla terapia antivirale nei pazienti HCV positivi. TNF- $\alpha$  ha un ruolo nel nostro modello *in vitro*?**



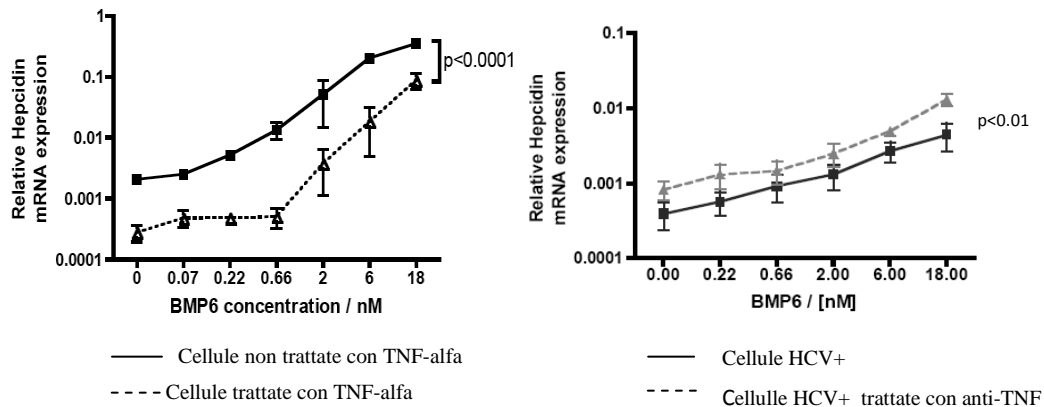
**Espressione di TNF- $\alpha$  da parte di cellule infette.** Cellule Huh7.5 infettate con HCV dimostrano espressione significativamente aumentata di mRNA codificante TNF- $\alpha$  (concentrazione relativa a GAPDH) ( $p=0.003$ ), che aumenta proporzionalmente alla MOI (t-test per dati appaiati, a due code, ottenuti da 10 esperimenti nella prima figura, da 3 esperimenti per ogni MOI nella seconda).



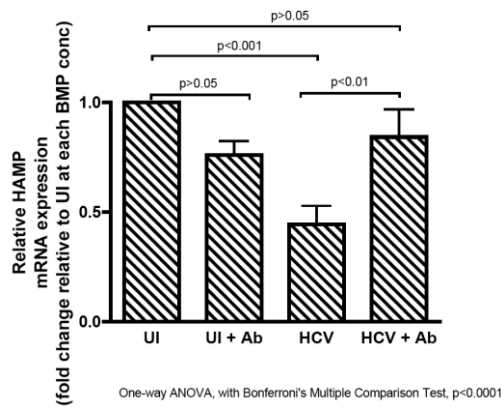
dove “\*” sta per  $p<0.05$ , mentre “\*\*\*” sta per  $p<0.01$

**Esposizione a TNF- $\alpha$  ed espressione di HJV e I-SMADs.** Cellule Hep3B esposte a TNF- $\alpha$  presentano minore espressione di emojuvelina (HJV) (t-test per dati appaiati, dati da 5 esperimenti,  $p=0.02$ ); cellule Hep3B, esposte a concentrazioni crescenti di TNF- $\alpha$  per 48 ore, presentano minore espressione di HJV (ANOVA ad una via) e maggiore espressione di I-SMAD (espressa come quantità in numero di volte maggiore relativamente alle cellule non trattate, dati ottenuti da 5 esperimenti indipendenti).

**6) Anticorpi anti-TNF- $\alpha$  ripristinano la sensibilità cellulare al BMP6 in cellule infette, in termini di espressione di gene dell'epcidina?**

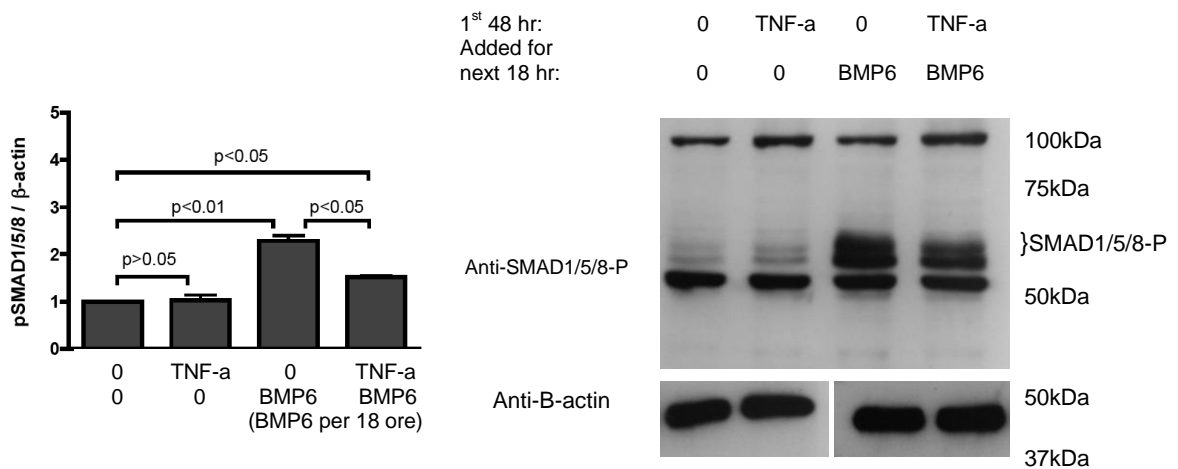


**TNF- $\alpha$  sopprime la risposta al BMP6 negli epatociti infetti, mentre anticorpi anti-TNF- $\alpha$  la ripristinano.** Il pretrattamento per 48 ore di cellule Hep3B con TNF- $\alpha$  ricombinante overnight alla concentrazione di 20 ng/mL sopprime l'espressione di mRNA codificante l'epcidina indotta da concentrazioni crescenti di BMP6 (t-test per dati appaiati, 3 esperimenti,  $p < 0.0001$ ). Il trattamento delle cellule con anticorpi anti-TNF- $\alpha$  a partire dal secondo giorno dopo l'infezione aumenta la responsività delle cellule Huh 7.5 infettate con HCV (test di Friedman, dati ottenuti da 3 esperimenti indipendenti,  $p < 0.01$ ).



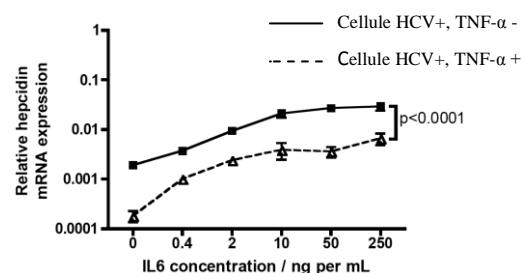
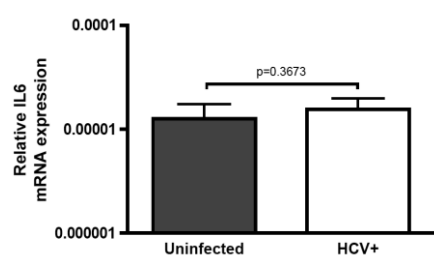
**Effetto degli anticorpi anti-TNF- $\alpha$  su cellule infette e non infette.** Per definire l'effetto degli anticorpi anti-TNF- $\alpha$  sulla risposta di cellule Huh7.5 infettate con HCV, i livelli di espressione di gene dell'epcidina in cellule infette trattate (HCV+Ab) e non trattate con anti-TNF- $\alpha$  (HCV), e di cellule non infette trattate (UI+Ab), sono stati normalizzati per i livelli di espressione di tale gene in cellule non infette (UI), per ogni concentrazione di BMP6 utilizzata nell'esperimento precedente. Gli anticorpi anti-TNF- $\alpha$  ripristinano l'espressione di epcidina indotta da BMP6 nelle cellule infette, ma non in quelle non infette ( $p=0.001$ )

**7) Come varia l'attivazione di SMAD1/5/8 in cellule trattate/non trattate con anti-TNF- $\alpha$ , stimulate con BMP6?**



**Fosforilazione di SMAD 1/5/8 in cellule Hep3B in seguito ad esposizione a TNF- $\alpha$  e a BMP6.** Cellule Hep3B sono state coltivate in presenza o assenza di TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) per 48 ore; poi è stato aggiunto BMP6 (2 nM) per 18 ore. Le cellule sono state lisate e il lisato è stato analizzato con anticorpi contro SMAD1/5/8 fosforilato o con anticorpi anti-beta-actina, come controllo. Dopo 18 ore di incubazione con BMP6, l'intensità della banda del corretto peso molecolare per i fattori SMADs fosforilati dimostrava intensità aumentata dopo il trattamento con BMP6, ma tale up-regolazione era parzialmente inibita dal pre-trattamento delle cellule con TNF- $\alpha$  (ANOVA ad una via con test di comparazione multipla di Bonferroni,  $p=0.0011$ ). Nella seconda figura è riportato un WB rappresentativo di 3, effettuati a 18 ore.

### 8) L'IL-6, induttore di epcidina nelle condizioni di infiammazione, ha un ruolo nel caso di infezione da HCV?



**IL-6 nel contesto di infezione da HCV in presenza di TNF- $\alpha$ .** L'mRNA codificante IL6, testato con qRT-PCR, non era significativamente aumentato nelle colture di Huh7.5 infettate con HCV per 8-10 giorni con MOI 0.02 (media di 7 esperimenti, t-test per dati appaiati). Cellule Hep3B, incubate con TNF- $\alpha$  (20 mg/mL) per 48 h prima di aggiungere una titolazione di IL6 ricombinante, presentavano comunque ridotta espressione di gene codificante l'epcidina (t-test per dati appaiati, ottenuti da 3 esperimenti indipendenti,  $p<0.0001$ ).

Sicuramente le cellule rispondono all'IL-6 aumentando l'espressione di epcidina, ma l'IL-6 non è prodotta in misura maggiore nelle colture infette e non ripristina l'espressione di epcidina in caso di pre-trattamento con TNF- $\alpha$ .



## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

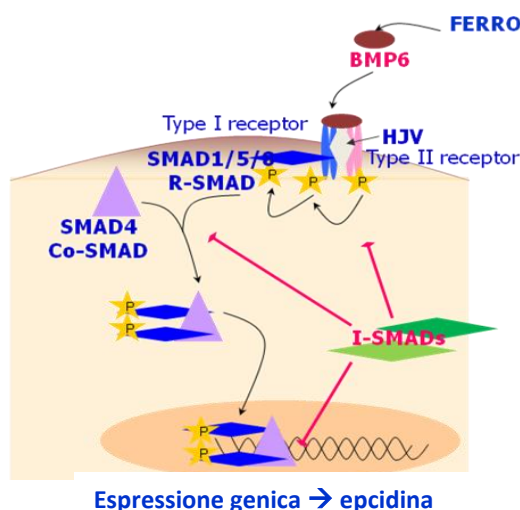
L'epcidina è l'ormone che mantiene l'omeostasi del ferro nell'organismo, regolandone l'assorbimento ed il rilascio dalle riserve, visto che l'escrezione globale di tale elemento non può essere modificata. La regolazione dell'espressione di epcidina è complessa e coinvolge molti fattori, tra cui citochine infiammatorie (ad esempio l'IL-6 tramite la via di STAT3) e i BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), regolatori principali dell'espressione dell'epcidina stessa. Nei topi, l'accumulo di ferro sierico normalmente induce la sintesi di BMP6 nel fegato, ed esso, tramite fosforilazione di SMAD1/5/8, induce l'espressione di epcidina, iniziando il segnale a livello del corecettore del BMP6, chiamato emojuvelina (HJV). L'epcidina riduce l'assorbimento del ferro con la dieta da parte degli enterociti attraverso il blocco del trasportatore del ferro ferroportina; inoltre, bloccando la ferroportina, l'epcidina riduce il rilascio di ferro dai macrofagi. Livelli persistentemente alti di epcidina riducono il flusso del ferro all'eritrono causando anemia, situazione che si verifica nelle condizioni di infiammazione cronica.

L'infezione cronica da HCV, pur essendo una patologia che produce infiammazione cronica, è associata a livelli ridotti di epcidina, con un conseguente accumulo di ferro a livello epatico. Nei pazienti HCV positivi si verifica una situazione simile a ciò che si osserva nell'emocromatosi ereditaria. In questa patologia, il ferro assorbito in eccesso si accumula nel parenchima dei tessuti, tra cui il fegato, e gli organi vengono danneggiati per l'effetto tossico dei radicali liberi. La soppressione di epcidina nelle forme più comuni di emocromatosi sembrerebbe legata a distruzione della via mediata dai BMPs, come descritto in alcuni recenti lavori (78).

Il nostro studio si è proposto di indagare l'effetto dell'infezione cronica da HCV sull'espressione di geni coinvolti nella via di segnale BMP6-SMAD1/5/8, che regola l'espressione dell'epcidina.

Abbiamo, perciò, inizialmente valutato su biopsie epatiche di pazienti affetti da epatite cronica HCV l'espressione genica di epcidina (gene *HAMP*), emojuvelina

(HJV, corecettore del BMP6), e I-SMADs (cioè SMAD6 e SMAD7); questi ultimi sono geni target direttamente regolati dalla via di segnale BMP6-SMAD1/5/8. Essi esercitano un feed-back negativo sulla regolazione dell'espressione dell'epcidina, antagonizzando il corecettore del BMP6, HJV, e inibendo, a più livelli, la trasduzione del segnale SMAD1/5/8 mediato.



**Via di segnalazione del BMP6 che coinvolge i fattori trascrizionali SMADs:** all'aumentare del ferro disponibile aumenta l'attività del BMP6, che, formando un complesso con il suo corecettore emojuvelina (HJV), provoca fosforilazione di SMAD1/5/8, fattori di trascrizione che, legando SMAD4, traslocano nel nucleo e up-regolano l'espressione di epcidina. Le proteine definite in figura I-SMADs (SMAD6 e SMAD7) sono responsabili di un feedback negativo nei confronti della cascata e vengono prodotte in risposta allo stimolo del BMP6.

L'analisi dell'espressione genica eseguita sulle biopsie epatiche di 57 pazienti HCV positivi ha confermato una riduzione evidente di espressione di gene codificante l'epcidina e un aumento di SMAD6 e SMAD7. Abbiamo, inoltre, dimostrato che la riduzione dell'espressione di epcidina ed HJV era associata ad un grado più elevato di attività istologica.

Queste alterazioni erano maggiormente evidenti nelle biopsie dei pazienti resistenti al trattamento antivirale con interferone e ribavirina.

In particolare, nei pazienti non responsivi al trattamento antivirale abbiamo evidenziato un'ancor più ridotta espressione di epcidina, emojuvelina e *ID1* (*ID1* analogamente all'epcidina è indotto dalla via di segnale BMP6-SMAD1/5/8 mediata).

Questi primi dati dimostrano che, nei pazienti HCV positivi, ma ancor più in quelli resistenti al trattamento antivirale, la via di segnale BMP6-SMAD1/5/8, che controlla la sintesi di epcidina, sembra essere alterata.

Gli esperimenti *in vitro* su cellule Huh7.5 hanno evidenziato come cellule infettate con HCV dimostrino meno sensibilità al BMP6 in termini di trascrizione e produzione di epcidina e di HJV. La riduzione dei trascritti di epcidina e di HJV era proporzionale alla MOI, cioè al numero di virioni/cellula. Per cercare di capire con quale meccanismo indiretto HCV potesse conferire alle cellule minore sensibilità al BMP6, abbiamo indagato il ruolo del TNF- $\alpha$  in questa condizione. L'ipotesi formulata è stata che il TNF- $\alpha$  fosse responsabile, almeno parzialmente, della soppressione della via di segnale BMP6-SMAD1/5/8.

E' stato studiato il TNF- $\alpha$  per diversi motivi: 1) è un inibitore della differenziazione BMP-indotta negli osteoblasti (92); 2) alti livelli di TNF- $\alpha$  sono risultati associati a livelli basali di espressione di epcidina ed emojuvelina soppressi, in cellule epatiche (93-95); 3) il TNF- $\alpha$  è indotto nell'infezione da HCV e alti livelli pre-trattamento possono essere correlati a mancata risposta alla terapia antivirale (96, 97).

Il nostro studio ha dimostrato che le colture di cellule infette presentavano aumentata espressione di TNF- $\alpha$ ; l'espressione di TNF- $\alpha$  era associata ad una ridotta espressione di emojuvelina, corecettore del BMP6, e ad una maggiore espressione di SMAD6 e SMAD7, questi ultimi potenti inibitori dell'espressione di epcidina. Inoltre abbiamo osservato che cellule infettate con HCV, pre-trattate con TNF- $\alpha$ , mostravano, in risposta a stimolazione con BMP6, minore attivazione di SMAD 1/5/8, fattori che, una volta fosforilati e traslocati nel nucleo, fungono da attivatori di trascrizione per l'epcidina. Il trattamento con anticorpi anti-TNF- $\alpha$  ripristinava la sensibilità delle cellule infette al BMP6, riportando l'espressione di epcidina ai livelli delle cellule non infette, mentre non modificava la risposta delle cellule non infette.

I risultati ottenuti, quindi, possono portare alla formulazione di un'ipotesi che viene riassunta nella Fig.5: HCV potrebbe essere responsabile direttamente o indirettamente, mediante produzione di TNF- $\alpha$ , della riduzione della via di segnale mediata dal BMP6, attraverso diversi meccanismi: aumento dell'espressione di SMAD6 e 7, inibitori dell'espressione dell'epcidina, ridotta espressione dell'HJV e, di conseguenza, ridotta sensibilità al BMP6.

Quale significato avrebbe la compromissione di questa via di segnale? Vi sono evidenze che BMP7 regola l'espressione di alcuni geni denominati *Interferon Stimulated Genes* (ISG), e sembra avere un effetto antivirale sinergico con IFN- $\alpha$  (81). Si potrebbe, perciò, speculare che il virus HCV potrebbe distruggere la via di segnale BMP/SMAD1/5/8 proprio per antagonizzare un effetto antivirale indiretto del BMP6.

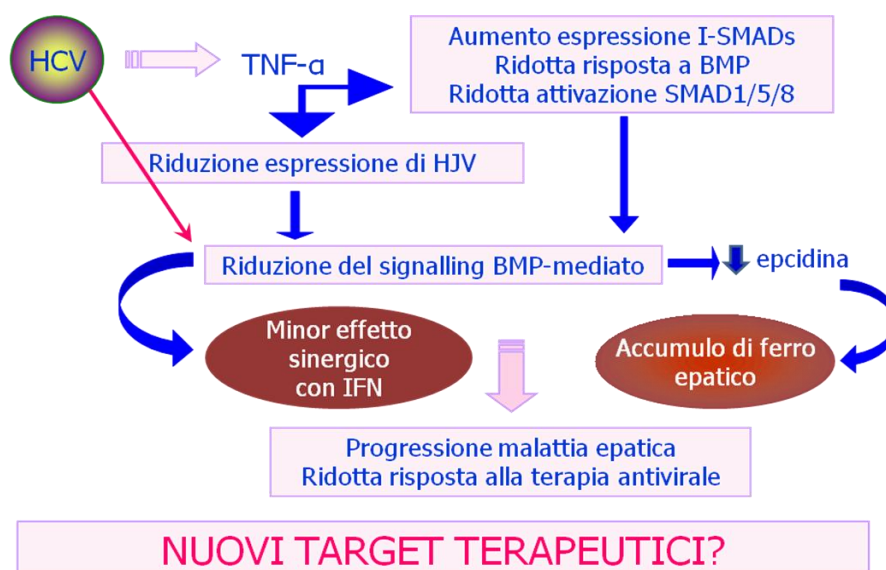


Fig.5: Modello proposto in base ai risultati ottenuti, discusso in questo capitolo

La ridotta sintesi di epcidina e l'eventuale tendenza all'accumulo di ferro nei pazienti HCV positivi, potrebbero essere un evento del tutto collaterale e legato alla ridotta attività di questa via di segnale.

A parziale supporto di questa ipotesi, i nostri dati dimostrano che la distruzione di questa via di segnale è molto più evidente nei pazienti non responsivi a trattamento antivirale. Se le nostre osservazioni fossero confermate, si potrebbero definire nuovi target terapeutici nell'infezione cronica da HCV.

In passato era stato proposto l'utilizzo di anticorpi anti-TNF- $\alpha$  nei pazienti in terapia antivirale (98). Nel nostro studio emerge che il TNF- $\alpha$  potrebbe essere responsabile di ridotta attivazione della via di segnale BMP6-SMAD1/5/8, e che anticorpi anti-TNF- $\alpha$  ripristinerebbero la normale risposta delle cellule infette rispetto alle non infette. Sicuramente il dato necessita di ulteriori conferme, ma gli studi *in vitro* sono

promettenti e uno studio prospettico è già stato progettato per valutare se pazienti con elevati livelli di TNF- $\alpha$  nel siero dimostrano anche alterazione della via di segnale del BMP6 e mancata risposta alla terapia antivirale. In questo caso alcuni pazienti potrebbero beneficiare di anticorpi anti-TNF, eventualmente anche come terapia adiuvante nei primi mesi di trattamento antivirale.

Infine, farmaci agonisti di BMP6 potrebbero avere un ruolo nel trattamento antivirale, analogamente a quanto è stato osservato recentemente in un modello sperimentale di emocromatosi (99).

In conclusione, il nostro studio offre stimolanti osservazioni in merito ad una nuova via di segnale nell'ambito dell'infezione da HCV. Sono necessari approfondimenti per comprendere a fondo il suo ruolo nell'infezione da HCV, soprattutto allo scopo di identificare nuovi target terapeutici.

## RIASSUNTO

### Razionale

Lo stato di infiammazione cronica è spesso associato ad anemia attribuita all'incremento dell'epcidina, ormone regolatore dell'assorbimento del ferro. L'epatite cronica C rappresenta un'eccezione, essendo accompagnata da ridotta espressione di epcidina e predisposizione all'accumulo di ferro. La sintesi di epcidina da parte degli epatociti, che ne rappresentano la fonte primaria, è largamente controllata da proteine dette BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), in particolare il BMP6. Nella via sono implicati altri fattori quali l'emojuvelina, corecettore del BMP6, i fattori trascrizionali SMAD1/5/8, ed i fattori inibitori SMAD6 e SMAD7, che, indotti in risposta all'attivazione della via di segnale stessa, inibiscono l'espressione di epcidina, con un feedback negativo. L'importanza dello studio del ruolo dei BMP è sostenuta dal fatto che recentemente BMP7 ha presentato in uno studio *in vitro* un effetto sinergico con IFN- $\alpha$ , per aumentare l'effetto antivirale e sopprimere la replicazione virale. Si potrebbe ipotizzare, perciò, che il virus dell'epatite C, per contrastare fattori che hanno effetto antivirale, produca come evento collaterale la riduzione di espressione di epcidina, che solo in alcuni casi (compresenza di altri fattori predisponenti genetici, comportamentali, ambientali) potrebbe portare all'accumulo di ferro.

### Materiali e metodi

Con metodica qRT-PCR è stata quantificata l'espressione di emojuvelina, epcidina, BMP6 e SMAD in mRNA proveniente da biopsie ottenute da pazienti HCV positivi, prima di qualsiasi trattamento antivirale e controlli non epatopatici. Inoltre, è stato fatto un confronto tra pazienti HCV positivi con *Sustained Virological Response* (SVR) e pazienti *Non Responders* a terapia antivirale. E' stato poi allestito un modello *in vitro* con cellule di epatoma infette e non infette, per confermare i dati ottenuti *in vivo*.

## **Risultati**

### *In vivo:*

L'espressione di epcidina era significativamente ridotta nei pazienti HCV positivi rispetto ai controlli non epatopatici ( $p=0.002$ ), mentre quella di SMAD6 ( $p=0.008$ ) e SMAD7 ( $p=n.s.$ ) era aumentata.

L'espressione del gene dell'epcidina e di ID1, target della via di segnale di BMP6/SMAD1/5/8, era significativamente ridotta nei pazienti NR confrontati coi pazienti SVR (rispettivamente  $p=0.008$  e  $p=0.05$ ), come anche quella di emojuvelina ( $p=0.0027$ ).

### *In vitro:*

I risultati in esperimenti su colture cellulari hanno confermato alterazioni simili a quelle ottenute *in vivo* riguardo all'espressione dei geni coinvolti nella via di segnale analizzata: cellule infette con HCV erano meno sensibili all'azione del BMP6, in termini di espressione di epcidina. L'inibizione della via di segnale in presenza di infezione da HCV era dovuta, almeno parzialmente, all'azione del TNF- $\alpha$ . Il TNF- $\alpha$  sopprimeva l'induzione di epcidina da parte di BMP6, mentre anticorpi anti-TNF- $\alpha$  ripristinavano la risposta cellulare a BMP6 in colture infettate.

## **Conclusioni**

Il virus dell'epatite C interferisce con una nuova via di segnale: la via attivata dal BMP6, coinvolgente i fattori trascrizionali SMAD1/5/8, cruciale nella regolazione dell'espressione di epcidina, ormone regolatore del metabolismo del ferro nell'organismo.

Il virus HCV inibisce la via di segnale sia direttamente che indirettamente, attraverso produzione di TNF- $\alpha$ .

La comprensione dell'interazione tra HCV e i fattori implicati nella via di segnale BMP6/SMAD1/5/8 è importante anche per definire eventuali nuovi target terapeutici in corso di infezione da HCV.





# ABSTRACT

## Background

Chronic inflammatory states are often associated with anaemia that is attributed to increased levels of the iron regulatory hormone hepcidin. An exception is chronic hepatitis C virus (HCV) infection, which is accompanied by reduced hepcidin and predisposes to hepatic iron accumulation that exacerbates disease. Hepcidin synthesis by hepatocytes is largely controlled by bone morphogenetic proteins (BMP) and the SMAD signalling cascade. This pathway involves different factors: BMP6, emojuvelin (the BMP6 coreceptor), SMAD 1/5/8 (transcriptional factors) and the inhibitors SMAD6 and SMAD7 (which act through a negative feedback loop). Recently, BMP7 showed a synergistic effect with IFN-alfa in suppressing viral replication, in HCV+ cell cultures treated with both these drugs. So, our hypothesis is that HCV could influence the BMP6-SMADs signalling, in order to antagonize the possible antiviral effect of BMP6; in this case, low expression of hepcidin in HCV infection should be only a secondary event, given that hepcidin is the main target gene of the BMP6-SMADs pathway.

## Materials and Methods

We assessed mRNA quantification by qRT-PCR for mRNA encoding hepcidin, emojuvelin, BMP6, SMAD6 and SMAD7 in biopsies obtained from HCV chronically infected patients, before antiviral treatment. We compared the gene expression in HCV+ patients vs controls and in non responders vs responders to antiviral therapy.

We confirmed the *in vivo* results by an *in vitro* viral replication model of HCV infection.

## Results

### *In vivo*

We found altered gene expression of components of the BMP6-SMADs pathway in liver biopsies from HCV positive patients: HCV positive patients showed significantly low levels of hepcidin and high levels of SMAD6 and SMAD7 in comparison to controls.

Pre-treatment biopsies from patients non-responsive to antiviral therapy showed reduced levels of the BMP co-receptor HJV ( $p=0.0027$ ), reduced levels of both the BMP target genes hepcidin ( $p=0.008$ ) and *ID1* (0.05).

*In vitro*

An *in vitro* virus replication model showed similar alterations in BMP pathway gene expression, and HCV infected cells exhibited a blunted hepcidin response to BMP6. BMP pathway inhibition was caused at least in part by virally-induced TNF-alpha. TNF-alpha suppressed induction of hepcidin by BMP and neutralizing anti-TNF-alpha antibodies restored the response to BMP6 by HCV+ infected cells.

**Conclusions**

HCV interferes with the BMP6/SMAD1/5/8 pathway both directly and indirectly, through the enhancement of TNF- $\alpha$ .

The identification of BMP signal inhibition by HCV that correlates with hepcidin suppression and treatment response suggests new options for antiviral therapy.

## BIBLIOGRAFIA

1. Drakesmith H & Prentice A. *Viral infection and iron metabolism*. Nature Rev Microbiol, 6: 541-552 (2008)
2. Merchant M et al. *Iron withholding as innate immunity mechanism in the America alligator (Alligator Mississippiensis)*. J Exp Zool, 307A: 401-406 (2007)
3. Ward RJ et al. *Iron and the immune system*. J Neural Trasm, Sept 2010
4. Schaible UE & Kaufmann SH. *Iron and microbial infection*. Nature Rev Microbiol, 2, 946-953 (2004)
5. Collins HL. *Withholding iron as a cellular defence mechanism – friend or foe?* Eur J Immunol, 38: 1803-1806 (2008)
6. Boyd PW et al. *Mesoscale iron enrichment experiments 1993-2005: synthesis and future directions*. Science 315: 612-617 (2007)
7. Boyd PW et al. *A mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization*. Nature, 407: 695-702 (2000)
8. Suttle CA. *Marine viruses – major players in the global ecosystem*. NatureRev Microbiol, 5: 801-812 (2007)
9. Suttle CA. *Viruses in the sea*. Nature, 437: 356-361 (2005)
10. McCance RA & Widdowson EM. *Absorption and excretion of iron*. Lancet, 2: 680-684 (1937).
11. McCance RA & Widdowson EM. *The absorption and excretion of iron following oral and intravenous administration*. J Physiol, 94: 148-154 (1938)
12. Andrews NC & Schmidh PJ. *Iron homeostasis*. Annu Rev Physiol, 69: 69-85 (2007)
13. McKie AT et al. *An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. Science, 291: 1755-1759 (2001)
14. Gunshin H et al. *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 388: 482-488 (1997)
15. Shayeghi M et al. *Identification of an intestinal heme transporter*. Cell, 122, 789-801 (2005)
16. Abboud S & Haile DJ. *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J Biol Chem, 275, 19906-19912 (2000)

17. Doovan A et al. *Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 403: 776-781 (2000)
18. McKie AT et al. *A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation*. Mol Cell, 5: 299-309 (2000)
19. Dautry-Varsat A et al. *pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis*. Proc Natl Acad Sci USA, 80: 2258-2262 (1983)
20. Klausner RD et al. *Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle*. Proc Natl Acad Sci USA, 80: 2263-2266 (1983)
21. Nemeth E & Ganz T. *Regulation of iron metabolism by hepcidin*. Annu Rev Nutr, 26: 323-342 (2006)
22. Krause A et al. *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett, 480: 147-150 (2000)
23. Nicolas G et al. *Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice*. Proc Natl Acad Sci USA, 98: 8780-8785 (2001)
24. Nemeth E et al. *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 306: 2090-2093 (2004)
25. Nicolas G et al. *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation*. J Clin Invest, 110: 1037-1044 (2002)
26. Feder JN et al. *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis*. Nature Genet, 13: 399-408 (1996)
27. Papanikolaou G et al. *Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1 q-linked juvenile hemochromatosis*. Nature Genet, 36: 77-82 (2004)
28. Njajou OT et al. *A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis*. Nature Genet, 28: 213-214 (2001)
29. Roetto A et al. *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis*. Nature Genet, 33: 21-22 (2003)
30. Peyssonauz C et al. *TLR-4 dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens*. Blood, 107: 3727-3732 (2006)
31. Theurl I et al. *Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes*. Blood, 111: 2392-2399 (2008)
32. Weiss G. *Modification of iron regulation by the inflammatory response*. Best Prac Clin Res Haematol, 18: 183-201 (2008)

33. Peyssonaux C et al. *TLR-4 dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens*. *Blood*, 107: 3727-3732 (2006)
34. Nemeth E et al. *Hepcidin, a putative mediator of anemia in inflammation, is a type II acute-phase protein*. *Blood*, 101: 2461-2463 (2003)
35. Major M, Feinstone SM. *The molecular biology of hepatitis C*. *Hepatology*, 25: 1527-1538 (1997)
36. Martell M et al. *Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution*. *J Virol*, 66, 3225-3229 (1992)
37. Bukh J et al. *Genetics heterogeneity hepatitis C virus: quasispecies and genotypes*. *Semin Liver Dis*, 15: 41-63 (1995)
38. Hoofnagle JH. *Course and outcome of hepatitis C*. *Hepatology*, 36, S21-S29, 2002.
39. Shepard CW et al. *Global epidemiology of hepatitis C virus infection*. *Lancet Infect Dis*, 5, 558- 567, 2005.
40. Di Bisceglie A et al. *Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis*. *Gastroenterology*, 102: 2108-2113 (1992)
41. Fujita N et al. *Hepatic iron accumulation is associated with disease progression and resistance to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis*. *C J Gastroenterol Hepatol*, 22: 1886-1893 (2007)
42. Kowdley KV. *Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology*, 127: S79-S86 (2004)
43. Pietrangelo A. *Hemochromatosis gene modifies course of hepatitis C viral infection*. *Gastroenterology*, 124: 1509-1523 (2003)
44. Pietrangelo A. *Iron in NASH, chronic liver diseases and HCC: How much iron is too much?* *J Hepatol*, 50: 249-251 (2009)
45. Pietrangelo A. *Hemochromatosis: an endocrine liver disease*. *Hepatology*, 46: 1291-1301 (2007)
46. Parkkila S et al. *Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hemochromatosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13198-13202 (1997)
47. Drakesmith H et al. *The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 15602-15607 (2002)
48. Piperno A et al. *Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis*. *Blood*, 110: 4096-4100 (2007)
49. Beutler E. *Penetrance of 845G → A (C282Y) HFE hereditary hemochromatosis mutation in USA*. *Lancet*, 359: 211-218 (2002)

50. Boucher E et al. *Liver iron concentration and distribution in chronic hepatitis C before and after interferon treatment.* Gut, 41: 115-120 (1997)
51. Metwally MA et al. *Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection.* Am J Gastroenterol, 99: 286-291 (2004)
52. Tharburn D et al. *The role of iron and hemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C.* Gut, 50: 248-252 (2002)
53. Haque S et al. *Iron overload in patients with chronic hepatitis C: a clinicopathologic study.* Hum Pathol, 27: 1277-1281 (1996)
54. Fujita N et al. *Hepcidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C.* Mol Med, 13: 97-104 (2007)
55. Saito H et al. *Up-regulation of transferrin receptor 1 in chronic hepatitis C: implication in excess hepatic iron accumulation.* Hepatol Res, 31: 203-210 (2005)
56. Takeo M et al. *Up-regulation of transferrin receptor 2 and ferroportin mRNA in the liver of patients with chronic hepatitis C.* J Gastroenterol Hepatol, 20: 562-569 (2005)
57. Fujita N et al. *Patients with chronic hepatitis C achieving a SVR to peginterferon and ribavirin therapy recover from impaired hepcidin secretion.* J Hepatol, 49: 702-710 (2008)
58. Kakizaki S et al. *Iron enhances hepatitis C virus replication in cultured human hepatocytes.* Liver, 20: 125-128 (2000)
59. Theurl I et al. *Iron regulates hepatitis C virus translation via stimulation of expression of translation initiation factor 3.* J Infect Dis, 190: 819-825 (2004)
60. Fillebeen C et al. *Iron inactivates the RNA polymerase NS5B and suppresses subgenomic replication of hepatitis C virus.* J Biol Chem, 280: 9049-9057 (2005)
61. Fillebeen C et al. *Iron inhibits replication of infectious hepatitis C virus in permissive Huh 7.5.1 cells.* J Hepatol, 53: 995-999 (2010)
62. Mueller S. *Increased iron in HCV infection: collateral damage or antiviral defense?* J Hepatol, 53: 990-992 (2010)
63. Fillebeen C et al. *Expression of subgenomic hepatitis C virus replicon alters iron homeostasis in Huh7 cells.* J Hepatol, 47: 12-22 (2007)
64. Furutani T et al. *Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein.* Gastroenterol, 130: 2087-2098 (2006)
65. Nishina S et al. *Hepatitis C virus induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription.* Gastroenterol, 134: 226-238 (2008)

66. Kato J et al. *Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C.* J Gastroenterol, 42: 830-836 (2007)
67. Kato J et al. *Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet.* Cancer Res, 61: 8697-8702 (2001)
68. Di Bisceglie AM et al. *Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C who have previously not responded to interferon: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial.* Hepatol, 32: 135-138 (2000)
69. Camaschella C. *Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders.* Blood, 106: 3710-3717 (2005)
70. Darshan D & Anderson GJ. *Interacting signals in the control of hepcidin expression.* Biometals, 22: 77-87 (2009)
71. Shi Y & Massague J. *Mechanism of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.* Cell, 113: 685-700 (2003)
72. Hogan BL. *Bone Morphogenetic Proteins: multifunctional regulators of vertebrates development: a cocktail of modulators.* Genes Dev, 10: 1580-1594 (1996)
73. Zhao GQ. *Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse.* Genesis, 35: 43-56 (2003)
74. Balemans W & Van Hul W. *Extracellular regulation of BMP signalling in vertebrates: a cocktail of modulators.* Dev Biol, 250: 231-250 (2002)
75. Samad TA et al. *DRAGON, a bone morphogenetic protein coreceptor.* J Biol Chem, 280: 14122-14129 (2005)
76. Babitt JL et al. *Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor.* J Biol Chem, 280: 29820-29827 (2005)
77. Babitt JL et al. *Bone Morphogenetic Protein signalling by hemojuvelin regulates hepcidin expression.* Nature Genetics, 38: 531-539 (2006)
78. Wang RH et al. *A role of SMAD4 in iron metabolism through positive regulation of hepcidin expression.* Cell Metab, 2: 399-409 (2005)
79. Anderson GJ & Frazer DM. *Iron metabolism meets signal transduction.* Nature Genetics, 38: 503-504 (2006)
80. Bolondi et al. *Altered hepatic BMP signalling pathway in human HFE hemochromatosis.* Blood Cells Mol Dis 2010 (in press)

81. Andriopoulos B Jr et al. *BMP-6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism.* Nat Genet, 41: 482-487 (2009)
82. Camaschella C. *BMP6 orchestrates iron metabolism.* Nat Genet, 41: 386-388 (2009)
83. Sakamoto N et al. *Bone Morphogenetic Protein-7 and interferon-alpha synergistically suppress hepatitis C virus replicon.* Bioch Biophys Res Comm, 357: 467-73 (2007)
84. Kalvakolanu DV. *Alternate interferon signalling pathways.* Pharmacol Therap, 100: 1-29 (2003)
85. Mleczko-Sanecka K et al. *SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression.* Blood, 115: 2657-2665
86. Murakami G et al. *Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signalling by SMURF and inhibitory SMADs.* Mol Biol Cell, 2003: 14, 2809-2817 (2003)
87. Shi W et al. *GADD34-PP1c recruited by SMAD7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor.* Cell J Biol, 164: 291-300 (2004)
88. Ebisawa T et al. *SMURF1 interacts with transforming growth factor beta type I receptor through SMAD7 and induces receptor degradation.* J Biol Chem, 276: 12477-12480 (2001)
89. Nakao A et al. *Identification of SMAD7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling.* Nature, 389: 631-635 (1997)
90. Morén A et al. *Degradation of the tumour suppressor SMAD4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases.* J Biol Chem, 280: 22115-22123 (2005)
91. Zhang S et al. *SMAD7 antagonizes transforming growth factor beta signalling in the nucleus by interfering with functional SMAD-DNA complex formation.* Mol Cell Biol, 27: 4488-4499 (2007)
92. Mukai T et al. *TNF-alpha inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signalling.* Biochem Biophys Res Commun, 356: 1004-1010 (2007)
93. Nemeth E et al. *IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin.* J Clin Invest, 113: 1271-1276 (2004)
94. Aigner E et al. *Pathways underlying iron accumulation in human non-alcoholic fatty liver disease.* Am J Clin Nutr, 87: 1374-1383 (2008)
95. Krijt J et al. *Expression of Rgmc, the murine ortholog of hemojuvelin gene, is modulated by development and inflammation, but not by iron status or erythropoietin.* Blood, 104: 4308-4310 (2004)
96. Mbow ML & Sarisky RT. *What is disrupting IFN-alpha's antiviral activity?* Trends Biotechnol, 22: 395-399 (2004)
97. Larrea E et al. *Tumour necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C.* Hepatology, 23: 210-217 (1996)



98. Zein NN. *Etanercept as an adjuvant to interferon and ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus infection: a phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study.* J Hepatol, 42: 315-322 (2005)
99. Corradini E. *BMP6 treatment compensates for the molecular defect and ameliorates hemochromatosis in Hfe knockout mice.* Gastroenterology, 139: 1721-1729 (2010)