

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA APPLICATA E FISIOPATOLOGIA
Ciclo XIX- MED 09**

**ANALISI GENOMICA DEL VIRUS DELL'EPATITE
B NELL'INFEZIONE OCCULTA E POTENZIALE
RUOLO NELLA CARCINOGENESI EPATICA**

**Presentata da:
Dott.ssa Romina Cassini**

**Coordinatore Dottorato:
Prof Carlo Franzini**

**Relatore:
Prof.Mauro Bernardi**

**Correlatore:
Dott.ssa MS De Mitri**

Esame finale anno 2008

INDICE

Introduzione	1
Virus dell'epatite B	3
Organizzazione genomica	6
Ciclo di replicazione	13
Varianti genomiche	16
Carcinoma epatocellulare	20
Epatite B occulta	25
Obiettivo della tesi	29
Pazienti	29
Metodi	31
Risultati	38
Discussione	45
Bibliografia	50

INTRODUZIONE

L'epatite virale è un processo infiammatorio che interessa il fegato e può essere causato da diversi fattori, quali farmaci, malattie autoimmuni, esposizione a tossici e virus.

Tra i virus identificati e riconosciuti come responsabili della maggior parte delle epatiti virali acute e croniche vi sono il virus dell'epatite A (HAV), B (HBV), C (HCV), Delta (HDV) ed E (HEV) i quali differiscono tra loro per dimensione, peso molecolare, genoma, ciclo replicativo, assetto antigenico, vie di trasmissione ed evoluzione clinica dell'infezione (**Tabella 1**).

L'HBV è la seconda causa di epatite virale. E' stato stimato che, nel mondo, due miliardi di individui sono infettati da HBV e circa 400 milioni sono portatori cronici del virus.

La principale via di contagio dell'epatite B è la trasmissione percutanea di sangue infetto o emoderivati. Tuttavia, grazie ai controlli di screening, nei paesi industrializzati, la trasfusione di sangue non è più la principale via di trasmissione (<2-3%). Un problema di importanza crescente è, invece, lo scambio di aghi tra coloro che fanno uso di droghe per via endovenosa e il rischio aumenta al 60-70% se il sangue proviene da un soggetto HBeAg e HBV DNA positivo. La trasmissione parenterale può essere anche inapparente, quando la penetrazione del virus avviene attraverso l'utilizzo di strumenti professionali non adeguatamente sterilizzati. Anche il trapianto di organi e tessuti rappresenta una via di trasmissione del virus.

Tra le vie non percutanee la trasmissione sessuale e quella perinatale rivestono un'importanza determinante.

L'epatite virale di tipo B ha un periodo di incubazione che va da 45 a 120 giorni. Circa il 90% dei soggetti infettati va incontro ad una infezione primaria asintomatica mentre nel rimanente 10% dei casi, l'infezione

primaria risulta sintomatica. Circa l'1% dei casi può sviluppare la forma fulminante, fatale nell'80% dei casi.

Il 90% dei casi di epatite acuta volge a guarigione, mentre il 10% delle infezioni primarie evolve verso la cronicizzazione.

Circa il 30% delle epatiti croniche evolve verso la cirrosi, che rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma epatocellulare (10% dei casi).

Tabella 1 Caratteristiche cliniche e virologiche dei virus epatitici maggiori

Virus	HAV	HBV	HCV	HEV
Classificazione	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	Caliciviridae
Genoma	RNA	DNA	RNA	RNA
Trasmissione:				
Oro-fecale	Sì	No	No	Sì
Sessuale/verticale	Possibile	Sì	Raramente	Possibile
Sangue	Possibile	Sì	Sì	Possibile
Incubazione(gg)	15-50	30-180	15-150	15-60
Cronicizzazione	No	Sì	Sì	No

VIRUS DELL'EPATITE B

L'HBV appartiene alla famiglia degli *hepadnaviridae*, piccoli virus a DNA muniti di envelope caratterizzati da uno spiccato epatotropismo e da uno spettro d'ospite ristretto . La famiglia degli *hepadnaviridae*, oltre che dall'HBV, è rappresentata anche da:

- il virus dell'epatite della marmotta (woodchuck hepatitis virus: WHV);
- il virus dell'epatite dello scoiattolo (ground squirrel hepatitis virus: GSHV);
- il virus dell'epatite B dell'anatra (duck hepatitis B virus: DHBV);
- altri virus ancora non ben caratterizzati in grado di infettare sia mammiferi (ad esempio alcune specie di scimmie) che uccelli (ad esempio l'airone).

Tutti questi virus hanno una struttura simile, grossolanamente circolare, un genoma a DNA parzialmente bicatenario e una peculiare ed insolita strategia replicativa .

Malgrado le ricerche sull'HBV siano estremamente difficoltose per la mancanza sia di linee cellulari in grado di supportare l'infezione sia di animali di laboratorio adeguati in considerazione del ristretto spettro d'ospite del virus, le tecniche di biologia molecolare e l'uso degli altri *hepadnavirus* con i relativi ospiti come modelli animali hanno consentito notevoli progressi nella comprensione della struttura del virus, del suo ciclo replicativo e della patogenesi dell'infezione.

Da un punto di vista morfologico, l'HBV si presenta sotto forma di tre distinte particelle: una particella sferica di circa 42 nm di diametro, "*particella di Dane*", corrispondente al virione maturo ed infettante, e due particelle sferiche o filamentose di circa 22 nm di diametro, prive di DNA ma munite degli antigeni di superficie. **Fig.1**

L' *envelope* è di natura lipoproteica ove sono immerse le glicoproteine di superficie che nel loro insieme rappresentano l'HBsAg. All'interno vi è

un nucleocapside icosaedrico di approssimativamente 30 nm di diametro, che contiene il DNA genomico (HBV-DNA), l'antigene core (HBcAg) e la polimerasi virus-specifica (DNA-pol) **Fig.2 (A,B)**

Fig. 1: HBV osservato al TEM. Accanto alle “particelle di Dane” si osservano formazioni tubulari e sferiche di piccole dimensioni. (Almeida e Waterson, American Jou of Med. Sciences, 1975)

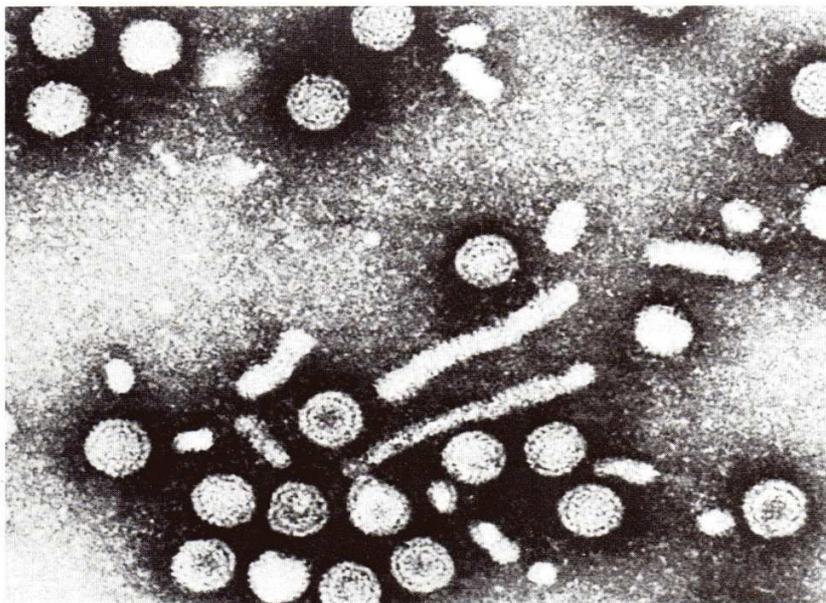
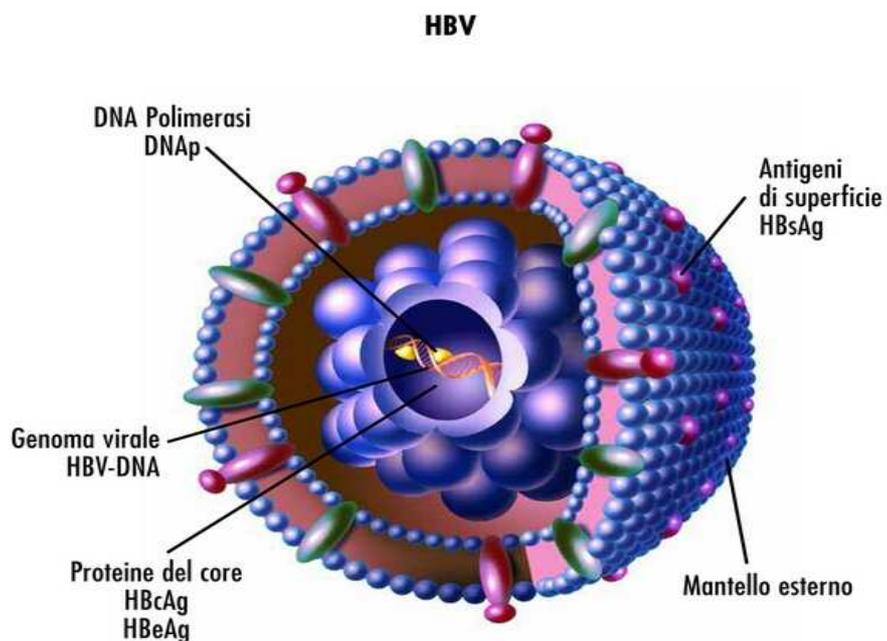
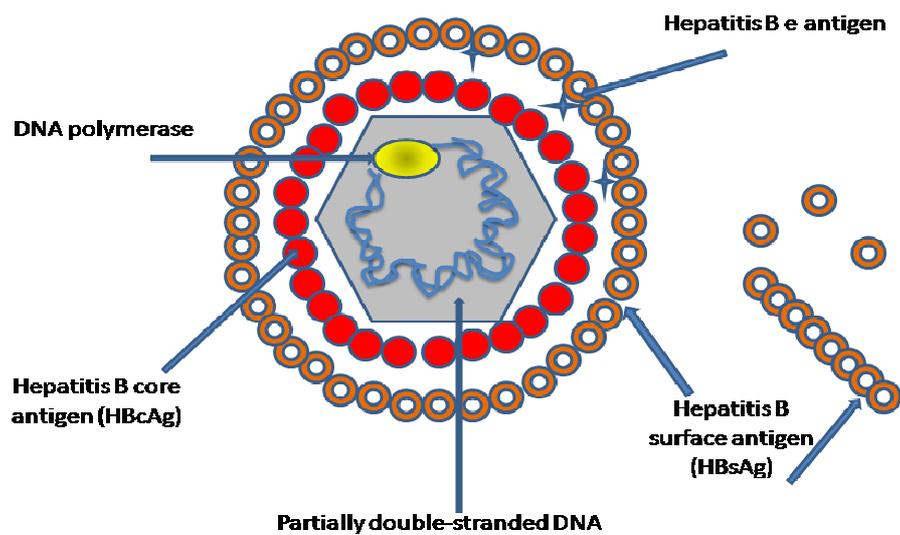


Fig. 2: Struttura tridimensionale (A) e schematica (B) dell'HBV

A



B



Organizzazione genomica

Il genoma è rappresentato da una molecola di DNA circolare parzialmente bicatenario con una catena più lunga L(-) della lunghezza di 3200 nt e una catena più corta S(+) di lunghezza variabile da 1700 a 2800 nt. (**Fig. 3 A, B**).

Nella catena L- sono stati identificati quattro geni codificanti organizzati in quattro ORFs (open reading frame) parzialmente sovrapposti:

-ORF E (regioni pre-S1, pre-S2 ed S) contiene 389 o 400 codoni (in base al genotipo) e, avendo tre start per la traduzione, codifica per le tre proteine dell'envelope che nel loro insieme costituiscono l'HBsAg. E' sovrapposto all'ORF della polimerasi;

-ORF C (gene pre-Core/Core) codifica per le proteine del nucleocapside (HbcAg) e per l'antigene secretorio HbeAg. E' parzialmente sovrapposto all'ORF della polimerasi e all'ORF dell'X;

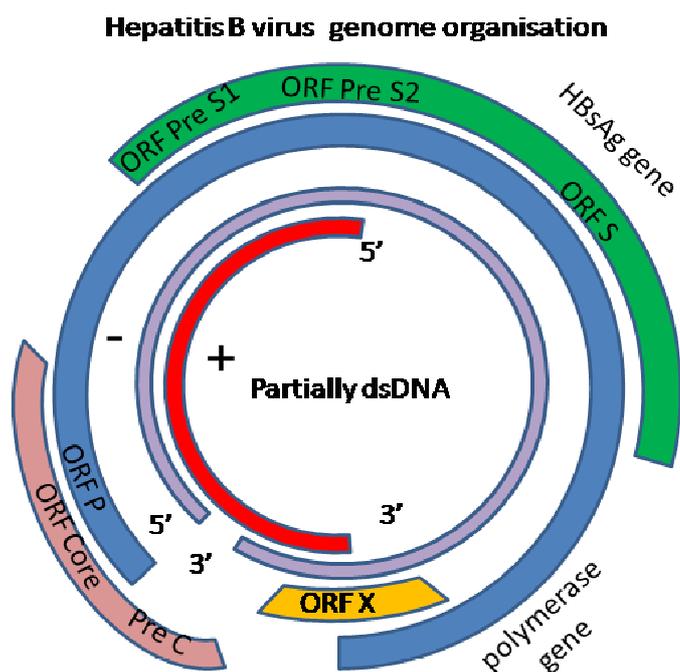
-ORF P (gene P) codifica per la DNA polimerasi - trascrittasi inversa ed essendo il più lungo dei quattro ORF risulta sovrapposto parzialmente agli altri tre;

-ORF X (gene X) codifica per la proteina X, con funzione verosimilmente regolatrice della replicazione virale, sovrapposto con l'ORF C e ORF P.

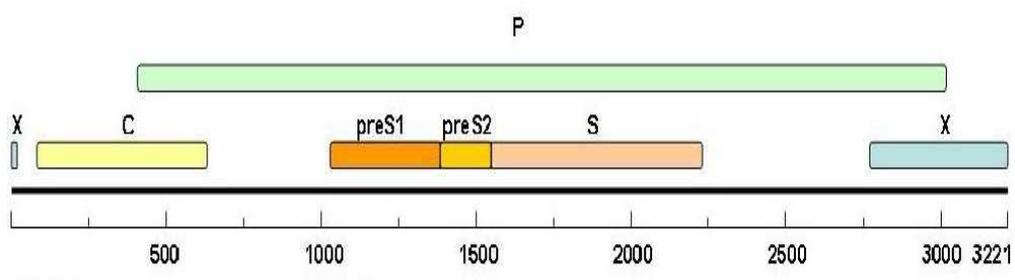
La trascrizione degli ORFs è diretta da 4 promotori: l'Enhancer II/basal core promoter (BCP), il promoter pre-S1, il promoter S ed Enhancer I/promoter X (Locarnini, 2005).

Fig.3: Rappresentazione genomica schematica (A) e linearizzata (B) dell'HBV DNA

A



B



Il genoma dell'HBV presenta un tasso di mutazioni tra 1×10^5 e 3×10^5 per sito/anno a causa della mancata attività di proof-reading della polimerasi virale. Nell'ambito della casualità tendono, comunque, a selezionarsi mutazioni a livello di siti e regioni che conferiscono un vantaggio replicativo al virus o un vantaggio mimetico rispetto all'ospite (Carman and Thomas, 1992).

Gene S

Il gene S presenta tre start codon che consentono la produzione di tre proteine di diverso peso molecolare: la *major protein* o HBsAg (gene S), la *middle protein* (S + preS2) e la *large protein* (S + preS2 + pre S1).

La regione pre-S1 risulta particolarmente variabile e questo si riflette nella sintesi di diversi sottotipi dell'HBsAg. Il maggior determinante antigenico è l'antigene comune gruppi-specifico "a", sempre presente; altri, come l'antigene d / y, w / r, o ancora altre sub-unità individuate più recentemente, possono anche essere assenti. Si riconoscono pertanto 4 principali sierotipi di HBsAg: adw, adr, ayw e più raramente, ayr. Accanto alla classificazione sierotipica, sulla base della eterogeneità nucleotidica, sono stati individuati 8 genotipi (A-H) con divergenza nucleotidica di circa l'8% (Kidd-Ljunggren, 2002), la cui distribuzione è di tipo geografico :

- genotipo A: Europa Occidentale, USA, Africa centrale e India;
- genotipo B: Giappone, Indonesia, Cina e USA;
- genotipo C : Asia dell'Est, Corea, Polinesia, Giappone e Stati Uniti;
- genotipo D : bacino del Mediterraneo, India, USA;
- genotipo E : Africa Occidentale;
- genotipo F : America Latina e in Polinesia;
- genotipo G : USA ed Europa;
- genotipo H : America Latina (Kao et al, 2002).

I diversi genotipi sono correlati con la diversa evoluzione della malattia epatica (Chu, 2002)

L'HBsAg è costituito da 226 aa; può essere presente sia in forma glicosilata (gp27) che in forma non glicosilata (p24).

La proteina contiene tre domini idrofobici transmembrana e due idrofilici. Si è osservato sperimentalmente che la maggior parte delle mutazioni avvengono nei due domini idrofilici poiché le due regioni sono esposte all'attacco degli anticorpi dell'ospite e di conseguenza le mutazioni rappresentano un *escape* alla pressione immunitaria (Echevarria and Avellana, 2006; Sheldon et al, 2006).

La *middle protein* è una glicoproteina formata da 281 aa, 226 dei quali sono codificati dal gene S e 55 dal gene pre-S2 che lo precede. La traduzione del secondo start-codon determina la sintesi di 2 glicoproteine gp33 e gp36. Gli aminoacidi codificati dalla regione preS2 sono idrofilici e contengono una regione localizzata sulla superficie dell'envelope che ha un forte potere immunogenico. Recenti studi mettono in evidenza che la regione pre-S2 codifica per una famiglia di proteine ad attività regolatoria, dette "pre-S activators" con funzione verosimilmente oncogenetiche (Lupberger, 2007).

La *large protein* di circa 389 aa è il prodotto dell'intero ORF dell'envelope sotto il controllo del promoter S-1 che è posto a monte della regione pre-S1.

La regione pre-S1 codifica per 108 aa aggiuntivi. Anche questa proteina è presente nelle due forme, quella glicosilata gp 42 e non glicosilata p39. Anche questa regione assume lunghezza diversa, da 389 a 400 aa, a seconda dei sottotipi virali.

Gene C

Il gene C presenta due segnali di inizio della trascrizione e può codificare

due proteine: HbcAg e HBeAg

L' **HbcAg** è formato da 183 o 185 aminoacidi a seconda del genotipo. La porzione N-terminale, di 149 o 151 aa in base al genotipo, forma il cosiddetto dominio di assemblaggio del capsido virale, mentre la porzione C-terminale di 34 aa, ricco in residui di arginina, è responsabile del sistema di packaging del complesso pregenoma/trascriptasi inversa. Delezioni nel dominio C-terminale impediscono l'encapsidazione dell'intermedio replicativo.

La formazione del nucleocapside in corso di infezione richiede un'alta concentrazione di dimeri della proteina core. Durante la sua formazione viene legato al complesso RNA pre-genomico/ Polimerasi ma anche a fattori cellulari quali chaperonine e proteine kinasi che fosforilano i residui di serina presenti nel dominio ricco di arginina della proteina core (Enomoto et al, 2006) .

La regione pre-C (nt 1814-1901) a monte del gene core contiene una struttura secondaria detta *epsilon* o *encapsidation signal*, necessaria per l'encapsidazione dell'RNA pregenomico e per l'inizio della sintesi del DNA virale all'interno dei capsidi immaturi. Mutazioni in questo dominio potrebbero dunque influenzare il meccanismo di replicazione e persistenza virale (Lok et al,1994).

La proteina C + pre-C viene sottoposta ad alcuni tagli proteolitici e secreta all'esterno della cellula, in forma non corpuscolata. Poiché espone epitopi antigenici peculiari viene indicata come antigene "e" (**HBeAg**). Non sembra indispensabile per il completamento del ciclo biologico virale ma si pensa abbia un possibile ruolo nell'attacco del core all'envelope. Tuttavia, l'HBeAg ha un significato clinico importante poiché la sua persistenza nei pazienti infettati è associata ad attiva replicazione virale, alta infettività e potenziale cronicizzazione.

Gene P

Il gene P è costituito da 834-845 codoni e presenta almeno 4 domini: N-terminale; spaziatore, altamente variabile; il dominio della polimerasi e C-terminale.

La proteina codificata dal dominio N-terminale ha funzione di primasi.

Il dominio della polimerasi codifica per la DNA-polimerasi DNA- e RNA-dipendente, che determina la retrotrascrizione dell'RNA- pre-genomico in DNA. Esso contiene un motivo aminoacidico (YMDD) essenziale per l'attività dell'enzima: la presenza di mutazioni in questa sequenza è responsabile della comparsa di mutanti HBV resistenti al trattamento antivirale con analoghi nucleosidici inibitori della transcriptasi (Yokosuka, 2006).

Il dominio C-terminale, infine, codifica per l'RNasi H, che taglia l'RNA degli ibridi RNA-DNA formati durante la trascrizione inversa dell'RNA pregenomico.

Gene X

Il gene X viene trascritto indipendentemente dagli altri trascritti virali sotto il controllo dell'enhancer I e promotore X. Tra i geni virali è quello che maggiormente si riscontra integrato nel DNA dell'ospite e questo è fra i motivi per cui, soprattutto nel decennio scorso, si è pensato avesse un ruolo diretto nell'epatocarcinogenesi (Leupin, 2005)

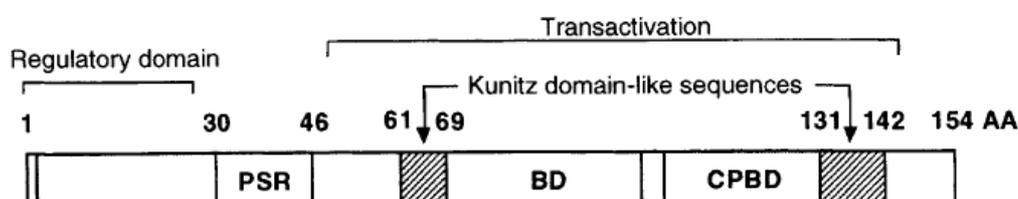
Codifica per una proteina di 154 aminoacidi a cui sono state attribuite numerose funzioni, tra cui la capacità di modulare la trascrizione e la trasduzione del segnale all'interno della cellula, le pathway di degradazione delle proteine, l'apoptosi e la stabilità genica.

Il ruolo della proteina X, essenziale nel ciclo replicativo del WHV (Zoulim, 1994), rimane enigmatico rispetto all'HBV. Alcuni riportano che la replicazione dell'HBV è indipendente dalla sua espressione

(Blum,1992; Stockl, 2003); altri,invece, ne attribuiscono un ruolo rilevante (Melegari,2005) anche se gli studi sui topi transgenici non confermano questa ipotesi (Refenberg,2002).

Recenti studi hanno dimostrato che l'interazione tra l'HBx e le subunità del proteosoma è necessaria per la transattivazione della proteina X e per la replicazione efficiente dell'HBV; questa interazione potrebbe sopprimere il processo di presentazione dell'antigene nelle cellule HBV infette (Tang et al, 2006). **Fig.4**

Fig. 4: Domini funzionali della proteina HBx (Sirma, 1999).



BD = dominio basico

PSR = regione ricca in prolina/serina

CPBD = dominio di legame con la proteina cellulare

Ciclo di replicazione

L'HBV, pur essendo un virus a DNA, replica come un retrovirus attraverso la trascrizione inversa di un intermedio a RNA, detto RNA pre-genomico.

Subito dopo l'infezione e l'esposizione del genoma, il DNA virale viene trasferito nel nucleo, dove enzimi cellulari operano la conversione del rcDNA (relax and circular) virale in DNA completamente bicatenario e superspiralizzato (cccDNA, covalently closed circular DNA) tramite la sintesi della parte mancante dell'elica S (+). Poiché il cccDNA rappresenta lo stampo per la trascrizione dell'RNA pregenomico, la sua formazione indica l'inizio di infezione.

A questo punto l'RNA-polimerasi II cellulare inizia la trascrizione del cccDNA con la formazione di due classi di RNA rappresentate rispettivamente da una serie di RNA messaggeri sub-genomici e da una serie di molecole di RNA (+) pre-genomici in cui è trascritta l'intera sequenza della catena polinucleotica completa (-) del genoma del virus infettante.

Gli RNA messaggeri e gli RNA pre-genomici sono quindi trasferiti nel citoplasma. La traduzione degli RNA messaggeri sub-genomici porta alla produzione delle proteine virus specifiche che verranno inserite nell'involucro pericapsidico e della proteina X.

Gli RNA pre-genomici, invece, sono bifunzionali poiché rappresentano sia i messaggeri per la produzione delle proteine del capsido (core) e della polimerasi, sia gli stampi per la sintesi del DNA della progenie virale.

Dopo la sintesi delle proteine tradotte dagli RNA pre-genomici, questi ultimi vengono encapsidati dalle proteine del core in una struttura che prende il nome di provirione, al cui interno vengono trascritti in DNA, ad opera della DNA-polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa) virus

specifica, con la formazione di un complesso intermedio RNA/DNA . La polimerasi dirige la trascrizione a livello del *pregenomic encapsidation signal*, detto “epsilon” (ϵ) costituito da una serie di sequenze invertite ripetute organizzate in una struttura secondaria costituita da uno stem prossimale bipartito ove ci sono tre siti instabili per il mancato appaiamento delle basi, un bulge centrale, uno stem distale, un loop apicale ed un residuo U non appaiato.

La polimerasi virale opera, a questo punto, la rimozione dello stampo di RNA pregenomico e la successiva sintesi (parziale) della catena complementare di DNA (attività di polimerasi DNA-dipendente). La sintesi del filamento S (+) non sarà completato a causa delle proteine del nucleocapside che si legano all’elica L (-), quindi il genoma virale della progenie sarà circolare, rilassato e parzialmente bicatenario (Seeger and Mason, 2000).

Il provirione, a questo punto, è un virione definitivamente formato nelle sue strutture essenziali, che acquisisce l’involucro pericapsidico dalle membrane del reticolo endoplasmatico in cui sono inserite le glicoproteine virali di superficie e, seguendo la pathway secretoria, è liberato all’esterno della cellula (Bruss, 2007). **Fig. 5**

Un aspetto caratteristico della replicazione degli *hepadnavirus* è rappresentato dal fatto che alcuni virioni, una volta completata la sintesi del genoma, anziché essere avviati all’acquisizione dell’involucro pericapsidico e all’esportazione all’esterno della cellula, vengono riciclati mediante il loro trasferimento nel nucleo cellulare dove il genoma virale, viene ulteriormente trascritto, con l’innesco di un ulteriore ciclo replicativo. Questo meccanismo consente una notevole amplificazione della quantità di progenie virale prodotta da una singola cellula, e spiega la presenza di antigeni virali nel nucleo delle cellule infette. Dopo la penetrazione nella cellula ospite, quindi, l’HBV DNA esiste in due stati:

libero, che rappresenta la forma intermedia di replicazione, o integrato nel genoma cellulare.

G. Raimondo et al. | *Journal of Hepatology* 46 (2007) 160–170

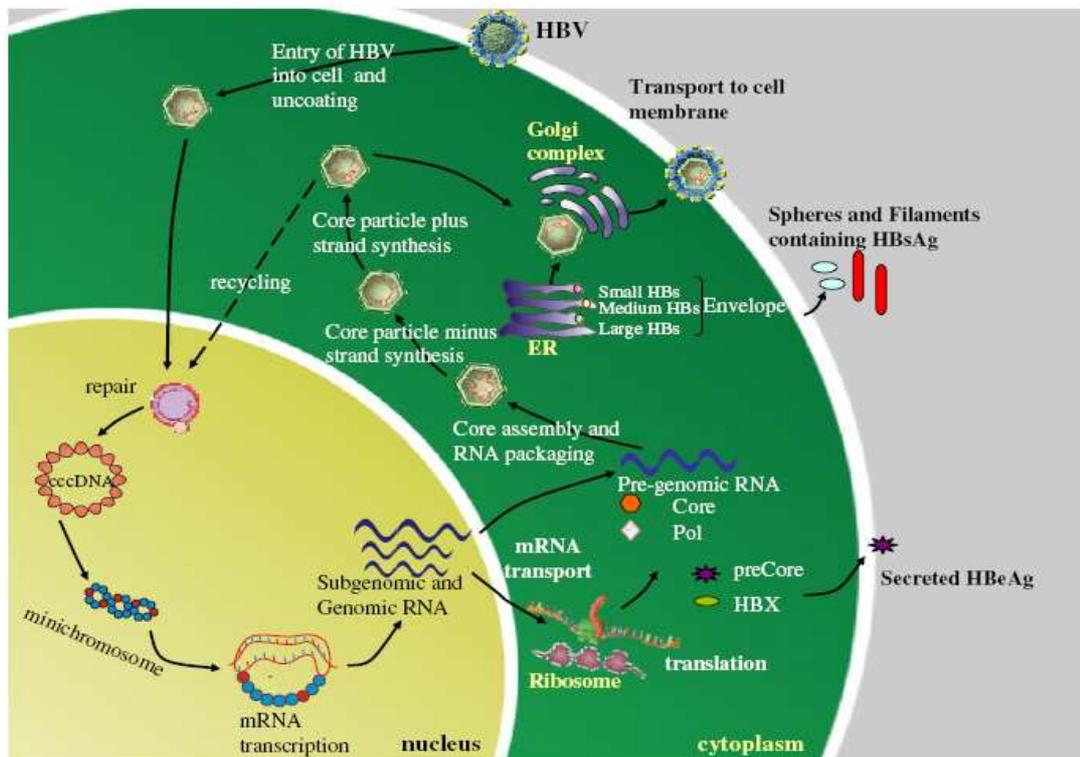


Fig. 1. Schematic representation of HBV life cycle.

Figura 5: Rappresentazione schematica del ciclo di replicazione dell'HBV (Raimondo, 2007)

Varianti genomiche

L'elevato numero di copie virali prodotte durante la replicazione del virus e la mancanza dell'attività di proofreading della polimerasi sono le cause dell'elevata eterogeneità genomica dell'HBV. Il tasso di errore della polimerasi è dell'ordine di 10^{10} nt/giorno (Zoulim,2004).

Inoltre, le pressioni del sistema immunitario e della terapia antiretrovirale portano alla comparsa di mutanti escape .

Varianti S: una categoria importante di mutanti HBV è quella degli *escape mutants*, nei quali si osserva una singola sostituzione di una Glicina con un' Arginina in posizione 145 del determinante immunodominante "a" comune a tutti i sottotipi di HBsAg. Questa mutazione causa un cambiamento conformazionale critico con conseguente perdita dell'attività neutralizzante degli anti-HBs. Questo specifico mutante HBV/a è stato descritto nell'immunizzazione attiva e passiva, in cui la pressione immunologica umorale potrebbe favorire la comparsa di questa mutazione.

Negli ultimi anni sono stati identificati due tipi di antigeni di superficie HBV con delezioni nelle regioni pre-S1 e pre-S2. Questi mutanti sono trattenuti nel reticolo endoplasmatico e sfuggono alla risposta immunitaria. I mutanti pre-S2, sono prevalenti in pazienti con infezione cronica HBeAg positivi e nel 60% di HCC. Sembra che i mutanti LHBs possano indurre uno stress ossidativo nel reticolo endoplasmatico aumentando il danno al DNA (attraverso l'induzione delle chaperonine del reticolo) e l'instabilità genomica; inoltre, possono causare una up-regulation della ciclossigenasi 2 e della ciclina A, provocando la progressione del ciclo cellulare e la proliferazione degli epatociti. Si può dunque ipotizzare che i mutanti pre-S abbiano un potenziale ruolo nello

sviluppo dell'epatocarcinoma (Wang et al 2006).

Altre importanti mutazioni dell'HBsAg sono state osservate nel Complesso Maggiore di Istocompatibilità classe I , tra i codoni 28 e 51 (Locarnini, 2005).

Varianti pre-C:

La letteratura descrive ampiamente le seguenti mutazioni del gene PreCore-Core:

- **G1896A**: introduce uno stop codon (TAG) che blocca la sintesi dell' HBeAg. Questa mutazione è localizzata a livello dello stem prossimale dell'encapsidation signal (ϵ), regione responsabile dell'encapsidazione dell'RNA pre-genomico, quindi fondamentale nella replicazione virale (Lok, 2000).**Fig 6**

Questo tipo di mutazione ha la duplice funzione di stabilizzare lo stem dell' ϵ a favore di un miglior successo replicativo, introducendo una mutazione compensatoria rispetto al lato opposto dello stem stesso(U1858C), dall'altro conferisce al virus capacità di mimetizzarsi nell'ospite poiché uno degli antigeni virali (l'HBeAg) non viene secreto. Questo tipo di variante (e-minus) correla con un' epatopatia grave che progredisce rapidamente verso la cirrosi e che non risponde alle terapia antivirale. Attualmente circa il 90% dei portatori cronici di HBsAg in Italia e circa il 6% dei casi nei paesi Asiatici ha selezionato la variante e-minus;

- **G1899A** opposta a T1855. Sono mutazioni di tipo compensatorio in grado di stabilizzare lo stem dell' ϵ ai fini di una migliore fitness virale;

- doppia variazione nucleotidica a livello delle posizioni 1762 (A \rightarrow T) e 1764 (G \rightarrow A) del BCP spesso prodotte in associazione alle mutazioni pre-core genotipo-dipendenti. Queste mutazioni determinano una riduzione della trascrizione dell'mRNA pre-C/C, quindi, una

diminuzione della produzione dell'HBcAg . (Hunt et al, 2000);
 -un'altra frequente mutazione nucleotidica che si traduce in cambiamento di un aa, riguarda il codone 97 con sostituzione di Fenilamina o Isoleucina in Leucina. Questi mutanti sono stati associati alla ritenzione intracellulare degli intermedi replicativi strutturali dell'HBV. Altre mutazioni relative all'HBcAg, come la cP5T e cL60V, sono associate a bassi livelli di secrezione dell'HBV (LePogam,2000; Sheldon, 2005).

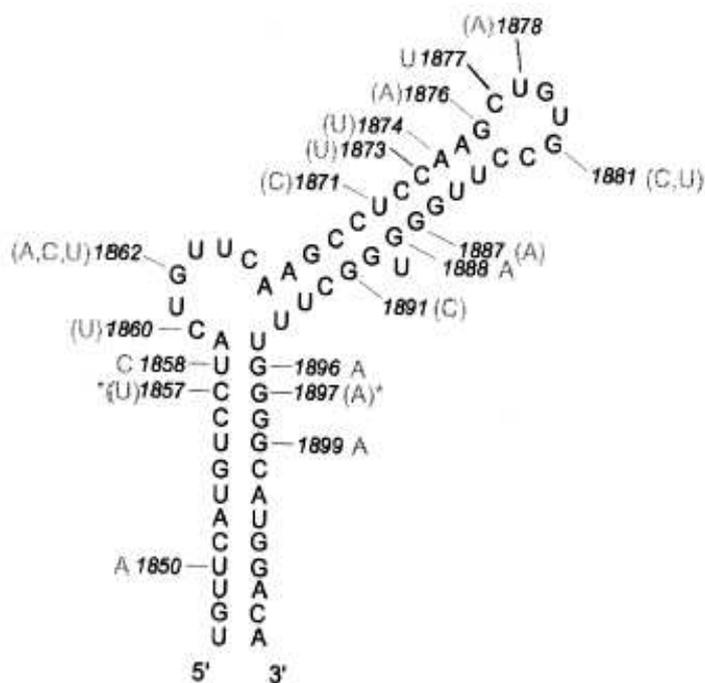


Fig.6: Rappresentazione schematica dell'encapsidation signal (Flodell, 2002).

Varianti X: il basal core promoter (BCP: nt 1742-1802) si sovrappone al gene X e, dunque, le mutazioni descritte precedentemente in posizione 1762 (A→T) e 1764 (G→A) del BCP causano anche modificazioni nel gene X. Inoltre, molte delezioni/inserzioni nel BCP causano un frame-shift del gene X portando alla formazione di protine X troncate, che mancano del dominio C-terminale, necessario per l'attività transattivante della proteina X. La loro importanza nello sviluppo dell'epatocarcinoma cellulare è ancora sconosciuta (Bouchard, 2004; Locarnini, 2005).

CARCINOMA EPATOCELLULARE

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è uno dei tumori maligni più comuni nel mondo (5% di tutti i tumori) e rappresenta la terza causa di morte tra i tumori.(Parkin,2000)

Gli studi epidemiologici hanno messo in luce che circa il 50% degli HCC è correlato all'infezione da HBV.(Geller,2002).

La carcinogenesi associata all'HBV è un processo multifattoriale, che include meccanismi diretti ed indiretti che interagiscono in modo sinergico.

Meccanismi indiretti

Benché la patogenesi non sia completamente definita, numerosi dati suggeriscono che il danno epatico sia nelle forme acute che in quelle croniche, consegue alla risposta immunitaria dell'ospite all'infezione.

Nei paesi Occidentali il 70-90% degli HCC si sviluppa su un fegato cirrotico (Colombo,1991; Tsukuma,1993). La stretta correlazione tra cirrosi e HCC suggerisce che l'infiammazione cronica del fegato e l'aumentato turn over epatocitario causano l'accumulo di critiche mutazioni nel genoma dell'ospite, aumentando il rischio di trasformazione maligna (Nakamoto,1998; (Kirosawa,2002)

Nei paesi Asiatici spesso il tumore compare su fegati non cirrotici, suggerendo un ruolo diretto dell'HBV nell'epatocarcinogenesi

Meccanismi diretti

Un concetto del tutto nuovo nella patogenesi dell'epatite cronica da HBV è emerso da alcune osservazioni rese possibili dagli studi di biologia molecolare. Il virus dell'epatite B, considerato per anni un soggetto passivo nei confronti della risposta immunitaria dell'ospite, assumerebbe un ruolo attivo modificando per esempio, sotto la spinta immunologia, la propria espressività genetica (varianti e-minus ed escape mutants). (Harryson, 2002).

Inoltre, tra i fattori di rischio per lo sviluppo dello HCC HBV-relato ci sono la mutagenesi inserzionale, la carica virale, il genotipo, alcune proteine virali e le varianti genetiche del virus

L'integrazione dell'HBV DNA nel genoma dell'ospite non è essenziale per la replicazione virale ma permette al virus di persistere e di generare dei riarrangiamenti genomici, delle delezioni nei siti di inserzione e traslocazioni cromosomiche che rappresentano il primo step della carcinogenesi. (Moradpour, 2005; Blum, 1987). Molte delle delezioni dei segmenti cromosomici comprendono anti-oncogeni come la p53, Rb, ciclica D1 e p16. (Peng, 2005).

Tali alterazioni genomiche vengono trasmesse alla progenie durante il processo di duplicazione, determinando l'immortalizzazione delle cellule "iniziate".

L'HBV è classificato in 8 genotipi (A-H) sulla base di una divergenza nucleotidica dell' 8% circa lungo la sequenza dell'intero genoma. (Lai, 2006). Ci sono molti studi che riportano una stretta correlazione tra genotipo e decorso clinico della malattia, rapidità di sieroconversione dell' HBeAg, comparsa di patterns mutati nelle regioni PreC/Core e BCP, risposta alla terapia, nonché correlazione con la comparsa dell'HCC. I ricercatori Asiatici indicano il genotipo C come fattore di rischio per lo sviluppo dell'HCC (Orito, 2001; Ding, 2001). Studi longitudinali hanno confermato che il genotipo C e un'alta carica virale nel siero rappresentano dei biomarkers predittivi rispetto alla comparsa di HCC. (Chan, 2004).

Alcuni gruppi di ricercatori occidentali (Sanchez-Tapias, 2002) hanno associato il genotipo D ad un danno epatico più severo e ad una più rapida progressione verso il tumore rispetto ai genotipi A B e C. Il

meccanismo alla base di tale evidenza va cercato nel fatto che i mutanti e-minus prevalgono nel genotipo D , conferendo capacità di mimetici al virus nell'ospite. La persistenza dell'alta viremia nei pazienti e-minus potrebbe favorire l'evoluzione della malattia verso il tumore.(Tong, 1992)

Inoltre, il virus produce alcune proteine regolatrici, HBx e "Pre S activators", in grado di agire come transattivatori (Lupberger, 2007) di un ampio spettro di geni cellulari.(Murakami, 2005) **Fig.7**

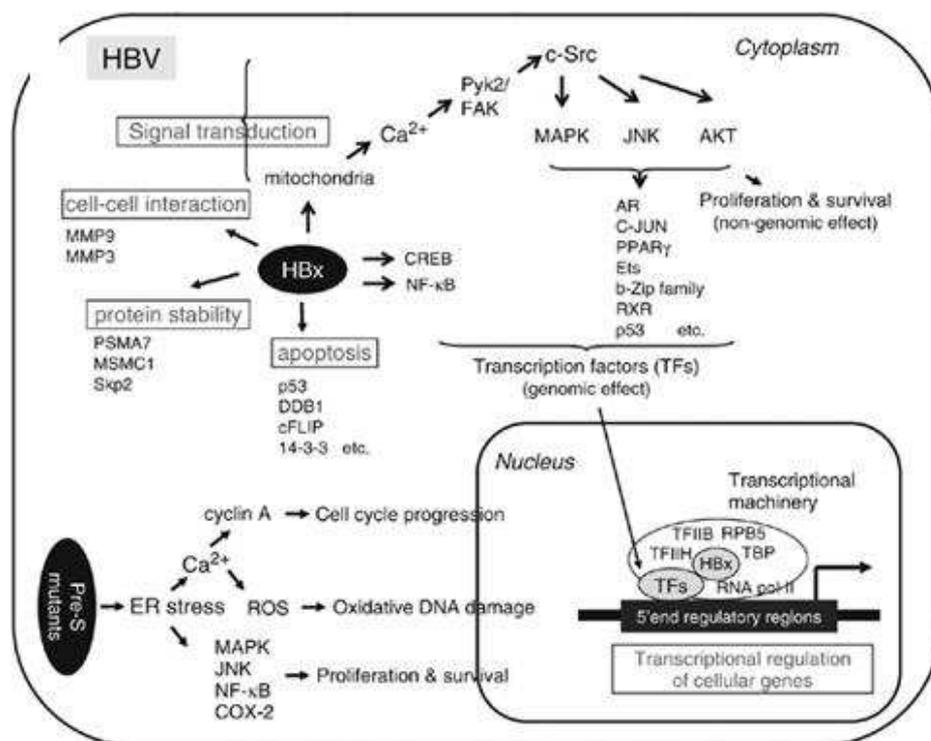


Fig.7: Proteine dell'HBV coinvolte con l'epatocarcinogenesi (Tan,2008)

Fin dalla sua identificazione, la proteina X è stata considerata cruciale nel processo di epatocarcinogenesi.(Cougot,2005; Chen,2006; Staib,2003) I dati della letteratura ,infatti, sono concordi nell'attribuirle la capacità di interferire con le cascate del segnale a monte del complesso di trascrizione cellulare.(Madden,2001) Queste cascate del segnale inducono la trascrizione di fattori come AP-1 (activator protein-1) , NF-kB (nuclear factor kappa B) , SP1 e oct-1. (Zhang,2006; Waris,2003). Alcuni ricercatori, però, sostengono che , in sinergia con le proteine virali PreS2, induca dei meccanismi anti-proliferativi (Friedrich,2005). Un esempio di come la proteina X interferisca con le cascate del segnale a favore dello sviluppo dell'HCC è dato dagli studi su l'interazione con la PKC(fosfochinasi C).Anche in questo caso i dati sono contrastanti. Da una parte, ci sono dei gruppi che suppongono che la PKC attivi NF-kB e AP-1 attraverso un meccanismo HBx- dipendente. (Kekule,1993; Luber,1993). D'altra parte ci sono dei lavori che sottolineano che la proteina X non interagisce con la PKC e che , comunque, la PKC non sia essenziale per l'attivazione da parte della proteina X dei fattori di trascrizione suddetti. (Luber,1993; Muratami,1994).

Ci sono poi evidenze che essa interferisca con una serie di steps coinvolti nel processo di riparazione del DNA.(Becker,1998; Wentz,2000), incrementando le mutazioni critiche nel genoma dell'ospite. Comunque l'analisi della frequenza delle mutazioni nei topi transgenici non conferma questa ipotesi (Madden,2000). Altri gruppi studiano l'interazione con la p53,poiché sembra sia in grado di inibirne la trascrizione (Lee,2000) o di legarla direttamente (Elmore,1997; Ueda,1995), anche se il significato fisiologico di questo legame diretto è ancora sconosciuto.

Oltre alla proteina X, il genoma dell' HBV codifica per una famiglia di proteine regolatrici che sono i " Pre-S2 activators" che sono il prodotto di

geni troncati in 3'.(Schluter,1994) che nella forma wt codificano per la proteina strutturale MHBs. Sequenze pre-S2/S troncate sono state individuate nei siti di integrazione in pazienti con HCC.(Tai,2002) Questa famiglia di proteine è in grado di interferire con le cascate del segnale attraverso l'interazione con le chinasi responsabili dell'attivazione dei fattori di trascrizione.. Per ciò, attraverso l'attivazione delle cascate del segnale, i Pre-S2/S activators causano un proliferazione epatocitaria aumentata.

Inoltre, un aumentata produzione degli antigeni di superficie dell'HBV causa un loro accumulo all'interno dell'epatocita , generando stress cellulare , cofattore nell' epatocarcinogenesi. (Momosaki,2003)

Un altro aspetto dello status dell'HBV che correla con l'epatocarcinogenesi è rappresentato dalla comparsa di mutazioni lungo il genoma del virus a causa dell'incapacità della polimerasi virale di correggere i propri errori. Le mutazioni che la progenie eredita sono quelle che rappresentano un vantaggio per la fitness del virus stesso, in termini di successo replicativo, persistenza nell'ospite e mimesi. Tra queste, la doppia mutazione nel BCP (1742-1849) in posizione 1762 e 1764 causano una down-regulation dell'mRNA preCore e una up-regulation della replicazione virale. La conseguenza è la comparsa di mutanti e-minus e una aumentata carica virale, fattori di rischio per lo sviluppo dell'HCC (Buckwold,1996; Liu,2006).

Recentemente sono state segnalate anche le mutazioni nucleotidiche in posizione 1753 e 1653 del BCP e dell'EnhancerII rispettivamente come potenziali biomarkers dello sviluppo dell'HCC. Entrambe inducono un'abrogazione nella produzione dell'HbeAg (Yuen,2004; Ito, 2006, Chou,2008)

EPATITE B OCCULTA

L'infezione occulta del virus epatico B è definita come la persistenza del genoma virale nel tessuto epatico, e in alcuni casi anche nel siero spesso in quantità non rilevabili, in individui HBsAg negativi

Durante l'infezione occulta la carica virale è generalmente inferiore alle 10^4 copie/ml (Chemin, 2005).

Le basi molecolari dell'infezione occulta sono strettamente correlate al caratteristico ciclo vitale del virus HBV. La stabilità e la lunga persistenza delle molecole di cccDNA virale, associate alla lunga emivita degli epatociti fanno sì che, una volta instauratasi, l'infezione continui per tutta la vita in maniera subclinica (Wursthorn, 2006). La ragione per cui i portatori dell'infezione occulta siano HBsAg negativi, nonostante sia presente nel loro fegato l'episoma virale, rimane ancora argomento di studio. Alcuni riportano che alcuni casi sono infettati da varianti S che producono un HBsAg modificato non rilevabile dalle comuni tecniche di determinazione dell'HBsAg, oppure che inducono un'inibizione dell'espressione del gene S stesso. Tuttavia, l'eterogeneità genomica del virus potrebbe non influenzare lo stato di infezione occulta che sembrerebbe principalmente causato dalla soppressione della replicazione e dell'espressione genica virale (Raimondo, 2000).

I meccanismi responsabili dell'inibizione dell'attività dell'HBV rimangono al momento poco chiari e tutte le ipotesi proposte sono basate essenzialmente su evidenze indirette. I dati disponibili indicano che la risposta immunitaria dell'ospite, le co-infezioni con altri agenti infettivi, e fattori epigenetici possono avere un ruolo importante nel causare l'infezione occulta.

Per quanto riguarda la risposta immune dell'ospite, numerose evidenze mostrano che le citochine sintetizzate nel fegato, come il $TNF\alpha$ e l' $INF\gamma$ potrebbero inibire fortemente l'espressione genica dell'HBV a livello

post-trascrizionale (Chou, 2007).

La coinfezione con altri agenti virali potrebbe inibire la replicazione e l'espressione genica dell'HBV. La più alta prevalenza di infezione occulta da HBV è stata riscontrata in pazienti con infezione da HCV, e studi in vitro hanno dimostrato una potente inibizione della replicazione HBV da parte della proteina "core" dell'HCV (Schuttler, 2002).

Non si può infine escludere che anche agenti infettivi non virali possano sopprimere l'attività dell'HBV.

Una viremia HBV molto bassa, tuttavia, non necessariamente implica che la quantità di genoma virale presente nel fegato sia non patogena. Gli studi sulla presenza dell'infezione occulta sia nel fegato che nel siero hanno mostrato che un'alta percentuale di soggetti HBsAg negativi nel siero risultano positivi nel tessuto epatico e che la quantità dell'HBV DNA epatico è spesso paragonabile a quella di individui HBsAg positivi. Inoltre, sebbene l'infezione occulta HBV sia significativamente associata alla presenza di anticorpi anti-HBc e anti-HBs, è stato osservato che in oltre il 20% dei portatori di HBV occulta si riscontra una negatività per tutti i markers sierici dell'infezione HBV (Torbenon, 2002). Al momento non sono chiare le ragioni biologiche della completa sieronegatività di questi pazienti, ma è clinicamente evidente che esistono due categorie di soggetti con infezione occulta: gli individui positivi agli anticorpi anti-HBV e, anche se in minor parte, quelli negativi per tutti i marcatori sierici per l'HBV.

Diagnosi

L'approccio metodologico più corretto è la ricerca del DNA virale nel tessuto epatico, ottenibile con una ago biopsia che, però, non può essere eseguita come esame di routine (Rodriguez-Torres, 2007). Per questo, la maggior parte dei dati disponibili sull'infezione occulta provengono da studi effettuati su campioni ematici (Raimondo, 2007).

In commercio non sono disponibili test validi e standardizzati per lo studio dell'infezione occulta. Tra l'altro le tecniche utilizzate nei diversi lavori scientifici sono molto diverse per specificità e sensibilità e i risultati ottenuti sono spesso in contraddizione. La metodica migliore è l'analisi del DNA attraverso la "nested" PCR con l'utilizzo di primers oligonucleotidici specifici per almeno tre diverse regioni del genoma HBV. Sono considerati positivi per infezione occulta da HBV solo i casi in cui si riescono a rilevare sequenze virali in almeno due diverse regioni del genoma.

Prevalenza e trasmissione

L'infezione occulta HBV è diffusa in tutto il mondo, sebbene la sua distribuzione rifletta la prevalenza generale dell'HBV nelle varie aree geografiche e nelle varie popolazioni.

Gli individui con infezione da HCV sono la categoria con la maggior prevalenza di epatite B occulta. L'HBV DNA è rilevabile in circa un terzo dei soggetti HCV positivi e HBsAg negativi nel bacino del Mediterraneo e questa prevalenza è ancor più alta nei paesi dell'Est asiatico.

Gli studi condotti su pazienti in emodialisi e su individui HIV positivi forniscono dati discordanti con tassi che vanno dallo 0% al 36% per i primi e dallo 0% all'89% per i secondi. Le discrepanze sembra dipendano dalla diversa sensibilità e specificità dei test utilizzati nei diversi studi (Brechot, 2001).

I portatori di infezione occulta potrebbero rappresentare una fonte di trasmissione di HBV attraverso le trasfusioni di sangue .

L'infezione occulta HBV potrebbe inoltre essere trasmessa durante i trapianti di organi, in particolare nel caso di trapianto ortotopico di fegato (OLT), poiché gli epatociti sono un serbatoio del virus attivo.

Riattivazione dell'infezione B occulta

Lo stato di soppressione della replicazione virale e dell'espressione genica tipico dell'infezione occulta da HBV potrebbe non essere costante e potrebbe portare allo sviluppo di una tipica epatite B acuta che spesso ha un decorso clinico severo e, raramente, fulminante. Questo evento si è spesso osservato in individui con una condizione di immunosoppressione indotta da terapie e/o correlata a malattie che coinvolgono il sistema immunitario (Larghi, 2003). Infatti, per la mancanza del controllo immunologico, i portatori di infezione occulta possono mostrare una riattivazione della replicazione virale e, una volta ricostituita la sorveglianza immunitaria, il danno epatocitario mediato dai linfociti T citotossici può portare allo sviluppo di un'epatite rapidamente progressiva.

L'identificazione precoce di una riattivazione virologica permetterebbe di iniziare una terapia antivirale specifica.

L'infezione occulta potrebbe favorire o accelerare la progressione della patologia epatica cronica in individui affetti da HCV in una sorta di sinergismo come molti studi suggeriscono (Squadrito, 2006; Cacciola, 1999; Chemin, 2005). L'infezione occulta sembra indurre anche resistenza alla terapia antivirale con interferone.

L'infezione occulta HBV è un fattore di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma (Brecht, 2004; Pollicino, 2004; Donato, 2006) soprattutto in pazienti HCV positivi nei quali la terapia per eradicare il virus è stata inefficace (Miura, 2008). La lunga persistenza del virus negli epatociti, induce una lieve ma persistente necroinfiammazione epatica che, in concomitanza con altre cause di danno epatico, potrebbe favorire o accelerare la progressione verso la cirrosi e l'epatocarcinoma in pazienti HBsAg negativi, attraverso gli stessi meccanismi oncogenetici dell'HBV nell'infezione manifesta (Pollicino, 2007).

OBIETTIVI DELLA TESI

Sulla base di evidenze che indicano l'infezione occulta da HBV come fattore di rischio per lo sviluppo di HCC (Brechot, 2004; Pollicino, 2004; Donato, 2006) e sulle scarse conoscenze riguardo la caratterizzazione genomica dell'HBV nei casi di HCC con infezione occulta, abbiamo analizzato la prevalenza di tale infezione nel tessuto epatico di pazienti con HCC e HBsAg negativi sottoposti a resezione epatica. Successivamente, abbiamo analizzato l'eterogeneità del genoma dell'HBV attraverso la caratterizzazione molecolare delle regioni che la letteratura indica come oncogenetiche (X, pre-C/C e BCP) al fine di individuare un pattern mutazionale peculiare dell'infezione occulta.

PAZIENTI

Lo studio per la ricerca e la caratterizzazione genomica dell'HBV nell'infezione occulta è stato condotto sul tessuto epatico di 52 pazienti HBsAg negativi con HCC (**gruppo A**) sottoposti a resezione epatica.

Abbiamo selezionato due gruppi di controllo HbsAg positivi: il primo costituito da 27 pazienti con HCC (**gruppo B**) e il secondo da 23 pazienti con cirrosi epatica senza evidenza di tumore (**gruppo C**), dei quali era disponibile il siero.

Sono stati esclusi dallo studio pazienti con altri fattori di rischio per carcinogenesi (abuso alcolico, emocromatosi, sovra-infezione da HDV o co-infezione da HIV).

I parametri clinici e virologici dei tre gruppi di pazienti sono espressi nella **Tab. 2**

Tab. 2: Parametri clinici e virologici dei pazienti studiati.

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C
N. pazienti	52	27	23
Sesso M/F	35/17	24/3	15/8
Età (media)	51	68	46
(range)	(45-69)	(58-79)	(31-62)
HBsAg +	0	27	23
HBcAb +	40	27	23
(%)	(77)	(100)	(100)
Anti-HCV + (%)	50 (96)	0	0

Gruppo A: pz con HCC e HBsAg negativi;

Gruppo B: pz con HCC e HBsAg positivi

Gruppo C: pz. con cirrosi e HBsAg positivi

METODI

Allestimento di aliquote di siero: i campioni di sangue, prelevati in maniera sterile e previa acquisizione di consenso informato, giunti in laboratorio sono stati sottoposti a centrifugazione a +4° C al fine di separare la parte corpuscolata dal siero. Quest'ultimo, suddiviso in aliquote etichettate, è stato conservato a -20°C.

Estrazione di DNA da siero: 100 l di siero sono stati incubati a 37°C /2 h con una miscela contenente 850 l di tampone di lisi (10 mmol/l di NaCl 5 M, 10mmol/l di Tris HCl 1 M, 10 mmol/l di EDTA 250 mM, 0.5% di SDS al 10%) e 50 µl di proteinasi K.

Al fine di liberare gli acidi nucleici dai legami proteici, le proteine vengono rimosse mediante tre steps di purificazione:

- con fenolo tamponato con TRIS HCl 0.1 M a pH 8 (1:10);
- fenolo-cloroformio (1:1);
- cloroformio-alcool isoamilico (24:1), per separare la fase acquosa da quella organica.

Gli acidi nucleici, contenuti nel sovrantante, sono stati precipitati con l'aggiunta di NaCl 5 M e 2 volumi di etanolo 100% incubando – 20°C over night.

Dopo centrifugazione a 6000 rpm /+4C / 45 min, il pellet è stato risospeso in etanolo al 70%. Dopo ulteriore centrifugazione con le stesse condizioni, il pellet è stato seccato con speed-vacuum per circa 10 min.

Infine, il pellet contenente il DNA è stato risospeso in 200 µl di soluzione TE (TRIS HCl pH 7,5 10 mM, EDTA pH 8 0.1 mM) e conservato a -20°C.

Estrazione di DNA da tessuto epatico: il DNA è stato estratto dal tessuto epatico congelato in azoto liquido al momento della resezione e conservato a -80°C. I tessuti, polverizzati ancora congelati, sono stati incubati a 37°C overnight con una miscela contenente 1 ml di tampone di lisi (10 mmol/l di NaCl 5 M, 10 mmol/l di Tris HCl 1 M, 10 mmol/l di EDTA 250 mM, 0.5% di SDS al 10%) e 30 µl di proteinasi K.

I passaggi successivi sono sovrapponibili alla procedura descritta precedentemente.

Estrazione di RNA da siero e da tessuto: l'acido nucleico è stato estratto utilizzando il metodo al tiocianato di guanidinio-fenolo-cloroformio in un'unica fase, parzialmente modificato (Chomczynsky and Sacchi, 1987). In breve, 200 µl di siero e circa 50 mg di tessuto epatico polverizzato sono stati mescolati con 800 µl di buffer contenente 4 mol/l di tiocianato di guanidinio, 25 mmol/l di citrato di sodio, 0.5% di sodio-lauroylsarcosinato, 1% di 2-mercaptoetanololo. A questa miscela sono stati aggiunti 2 mol/l di Na acetato, 800 µl di fenolo saturato con H₂O trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) e 150 µl di cloroformio con alcol isoamilico (49:1).

Prelevato il surnatante contenente già l'RNA purificato, si procede alla precipitazione con isopropanolo e 20 mg di glicogeno come carrier. Dopo l'incubazione a -20°C per almeno 3 ore, il pellet è stato purificato con etanolo al 75%, disidratato nello speed-vacuum e risospeso in 10 µl di H₂O trattata con DEPC e 20 U di inibitore delle ribonucleasi (RNAguard, Amersham Pharmacia Biotech). L'RNA estratto è stato conservato a -20°C.

PCR (Polymerase Chain Reaction): per la ricerca nel siero e/o nel tessuto epatico delle sequenze genomiche virali è stata utilizzata la

tecnica di doppia amplificazione polimerasica a catena detta nested-PCR (n-PCR) che permette di amplificare in modo esponenziale anche una sola copia di DNA virale presente nel siero e/o tessuto epatico.(**Fig.6**)

Il processo di amplificazione si svolge sotto il controllo di una DNA polimerasi termo-resistente: tale enzima catalizza la reazione di amplificazione nella porzione del genoma virale compresa fra due sequenze nucleotidiche che fungono da “primers” (senso e antisenso), non complementari fra loro ma complementari alla regione da amplificare. La sequenza target viene ad essere riprodotta con cinetica esponenziale in quanto, dopo ogni ciclo, gli stessi prodotti di amplificazione fungono da substrato per i cicli successivi. Durante la prima amplificazione si utilizzano due primers oligonucleotidici esterni, nella seconda, prendendo il prodotto di amplificazione come target, si amplifica con due primers interni al primo prodotto di amplificazione.

La tecnica PCR è stata utilizzata per lo studio delle regioni S, X e preCore-Core dell’HBV utilizzando primers specifici.

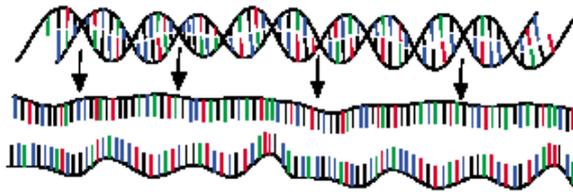
Sono stati considerati positivi per infezione occulta da HBV solo i casi in cui l’HBV DNA è stato rilevato con l’utilizzo di almeno due diversi set di primers.

La reazione di amplificazione si svolge in presenza dell’enzima Taq polimerasi, due primers opposti (senso e antisenso), una miscela di desossinucleotidi trifosfato (dNTP), il tampone Taq polimerasi (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl), MgCl₂, H₂O sterile e DNA target.

Sono state prese tutte le precauzioni raccomandate dalla letteratura per evitare risultati falsamente positivi dovuti a contaminazione (Kwok and Higuchi, 1989).

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps



Step 1 : denaturation

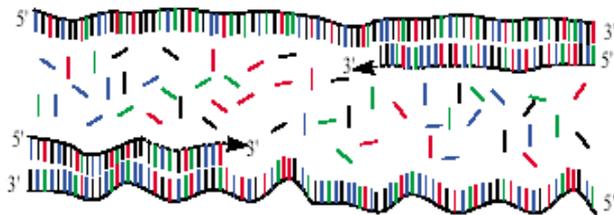
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's

(Andy Vierstraete 199)

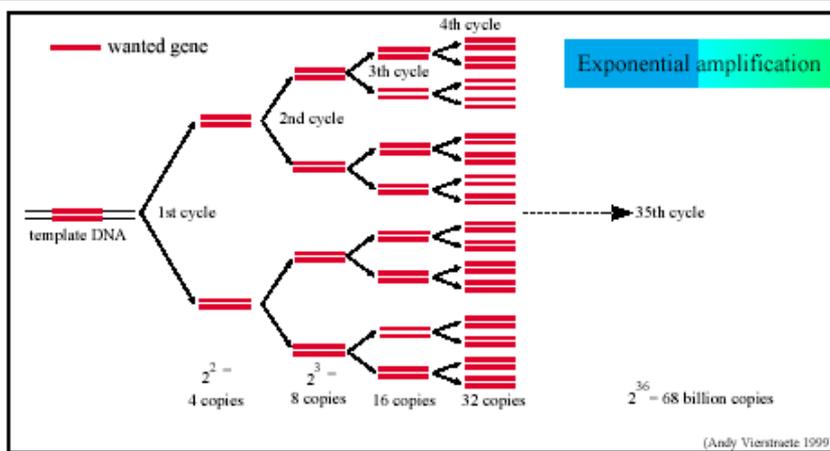


Fig 6.: Rappresentazione schematica della reazione polimerasica a catena

Sequenza e localizzazione dei primers HBV

I primers specifici (**S**: senso; **AS**: antisenso) sono complementari alle regioni S, preCore-Core e X del genoma virale.

Le sequenze specifiche sono:

Regione S

Primers Esterni

S: 5' - GCG CTG CAG TTC CTA TGG GAG TGG GCC- 3' (637-654)

AS: 5' - GCG AAG CTT TTA GGG TTT AAA TGT ATA CCC -3' (824-844)

Primers Interni

S: 5' - GGA TCC GTC CGT TTC TCC TGG CTC AG - 3' (658-677)

AS: 5' - CGC AAG CTT AAG AAA ATT GGT AAC AGC GG - 3' (796-815)

Regione pre-Core/Core

Primers Esterni

S: 5' - CTT CGC TTC ACC TCT GCA CG - 3' (1584-1604)

AS: 5' - ACC ACC CAC CCA GGT AGC TA - 3' (2123-2104)

Primers Interni

S: 5' - TTA CAT AAG AGG ACT CTT GG - 3' (1650-1669)

AS: 5' - AGA AGA TCT CGT ACT GAA GG - 3' (1992-1973)

Regione X

Primers Esterni

S: 5' - CCA TAC TGC GGA ACT CCT AGC - 3' (1266-1286)

AS: 5' - CGT TCA CGG TGG TCT CCA T - 3' (1628-1608)

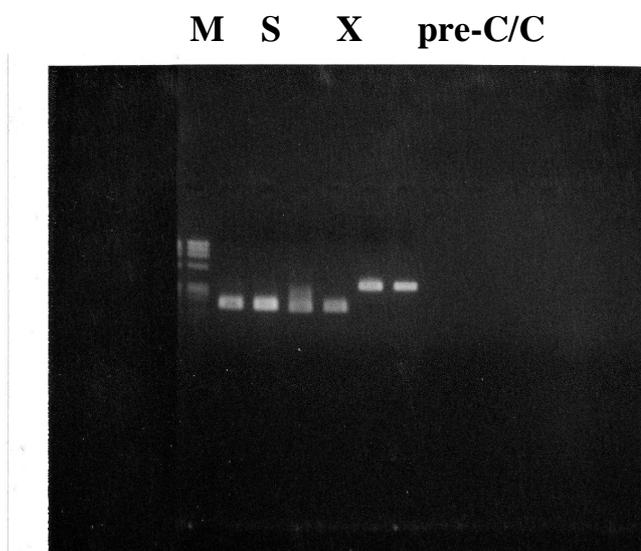
Primers Interni

S: 5' - GCT AGG CTG TGC TGC CAA CTG - 3' (1380-1400)

AS: 5' - CGT AAA GAG AGG TGC GCC CCG - 3' (1540-1520)

Analisi qualitativa: elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% in tampone TBE (Tris, acido borico, EDTA) colorato con bromuro di etidio. I campioni positivi alla PCR erano evidenziati alla luce UV come bande fluorescenti corrispondenti alla taglia del frammento amplificato. I controlli negativi ed i campioni negativi non presentano alcuna banda. Il peso molecolare del prodotto amplificato è stato determinato dal confronto con un marcatore di peso molecolare (Phi X 174; GIBCO BRL) depositato sul gel insieme agli altri campioni. (**Fig.7**)

Fig. 7: Analisi qualitativa delle regioni HBV amplificate



M = marker ϕ X RF/DNA HIND III

C = regione Core

S = regione S

X = regione X

Sequenziamento diretto

I prodotti di amplificazione delle regioni BCP, X, Pre-C, purificati con un adeguato sistema di microcolonne (Amicon, Millipore), sono stati sottoposti a sequenziamento diretto mediante un sequenziatore automatico (ABI 373 automated sequencer) utilizzando il sistema PRISM Dye terminator Cycle sequencing (Prekin Elmer Cetus, Foster City). Sono stati utilizzati i primers senso ed antisenso interno delle regioni di interesse.

Sono stati considerati validi solo i risultati confermati in almeno due differenti esperimenti.

Le sequenze genomiche sono state analizzate usando il programma Sequencer 3.0 analysis (Gene Codes Corp., Ann-Arbor; MI). La sequenza dei nucleotidi ottenuta è stata allineata con l'isolato prototipo mediante il programma Clustal W1.6 software (Thompson, 1994).

Analisi statistica

Il confronto tra i gruppi per i dati non parametrici sono stati analizzati con il test del X^2 o con il test esatto di Fischer, quando richiesto.

RISULTATI

Analizzando i parametri clinici è emerso che:

- il sesso maschile prevaleva nei tre gruppi (A: 67%, B: 89%, C:65%);
- l'età media dei pazienti con HCC ed infezione occulta da HBV (51aa) era significativamente più bassa rispetto al gruppo di HCC HBV e sovrapponibile al gruppo con HBV senza tumore (46aa);

L'analisi virologica è stata condotta attraverso la ricerca di sequenze di HBV DNA e HCV RNA nel tessuto epatico di pazienti del gruppo A e nel siero di pazienti dei due gruppi di controllo. I risultati sono stati i seguenti:

- 27 pazienti del gruppo A sono risultati positivi per l'infezione occulta (52%). La positività è stata documentata con il rilievo di HBV DNA mediante n-PCR in almeno due delle regioni genomiche virali esaminate (S, X, Pre-C). In particolare, tutti i 27 pazienti con infezione occulta sono risultati positivi per la presenza di sequenze genomiche della regione S; 25 positivi anche per la regione X e 20 per la regione Pre-C. Le sequenze genomiche delle tre regioni, S, X, Pre-C, erano contemporaneamente rilevabili in 15 casi. Abbiamo rilevato la presenza di HCV RNA in tutti questi pazienti;
- i gruppi di controllo con evidenza sierologia di infezione attiva HBV sono risultati tutti HBV DNA positivi e HCV RNA negativi.

Abbiamo proceduto alla caratterizzazione genomica dell'HBV nell'infezione occulta attraverso l'analisi molecolare di regioni che sono implicate nella carcinogenesi epatica: X ,pre-C/Ce BCP .

Con lo scopo di rilevare sequenze peculiari dell'infezione occulta o correlate allo sviluppo di HCC, l'eterogeneità di tali regioni è stata

comparata con le sequenze virali isolate dai due gruppi di controllo HBsAg positivi con e senza evidenza di HCC.

Analisi del pattern mutazionale della regione X

La sequenza esaminata comprende la regione regolatoria (AA 16-30), una porzione intermedia ricca di serine e proline (PSR: AA31-45) e la porzione iniziale della regione transattivante (AA 46-56).

Non abbiamo rilevato inserzioni o delezioni come segno dell'integrazione del genoma virale in quello dell'ospite. Nel complesso la regione esaminata presenta un uniforme grado di eterogeneità nei tre gruppi.

Le mutazioni che abbiamo rilevato coinvolgono gli stessi siti nei tre gruppi di pazienti e cioè in posizione **1461, 1484, 1509, 1511 e 1512**. In particolare, la mutazione sinonima T1461G/C che determina la sostituzione dell'aminoacido in posizione 30 al termine della regione regolatoria con un cambiamento di una Fenilalanina con Valina (se T→G) o con una Leucina (se T→C) è presente in modo significativo nel gruppo A (56%) rispetto al gruppo B (26%; p=0.025) e al gruppo C (9%; p=0.001)

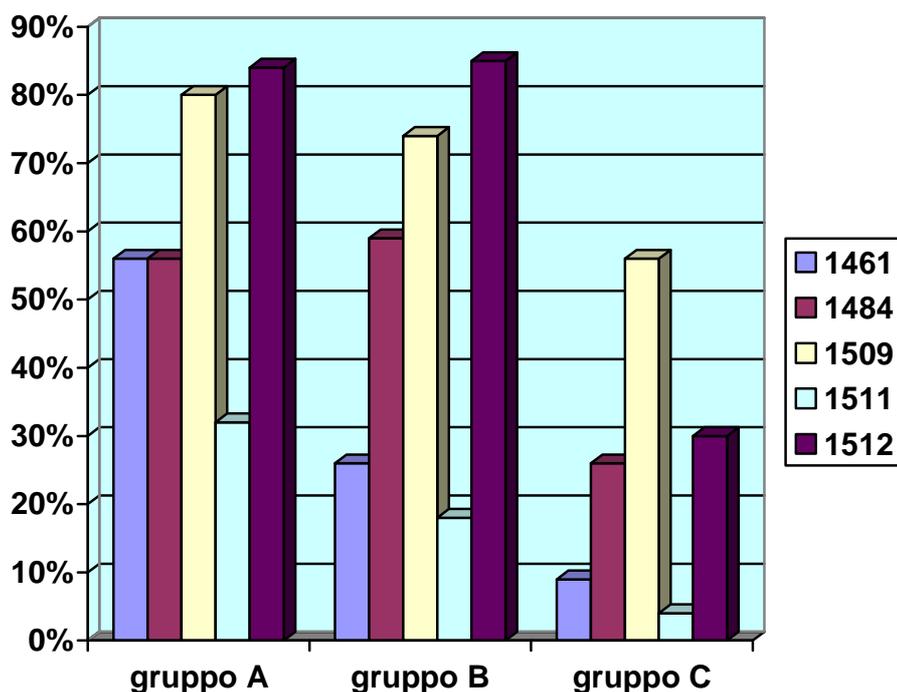
La mutazione C1484A è presente in maniera significativa nei gruppi A (56%) e B (59%), cioè i gruppi con HCC indipendentemente dall'infezione occulta o manifesta, rispetto al gruppo C (26%; p=0.019).

Interessanti le mutazioni sinonime in tre siti contigui T1509C, G1511A e T1512G. Esse compaiono in maniera significativa nei due gruppi con HCC rispetto al gruppo di controllo con cirrosi (T1509C p=0.080; G1511A, p=0.014; T1512G, p<0.001). **Tab. 3**

La presenza simultanea di queste mutazioni si palesa significativamente nel gruppo di pazienti con infezione occulta (32%) rispetto al gruppo B (4%, $p= 0.080$).

Tali mutazioni esprimono un fenotipo aminoacidico mutato poiché due Serine (AA 46-47) vengono sostituite con una prolina e una Alanina proprio a livello dell'inizio della porzione transattivante della proteina X. Questo inaspettato risultato ci induce a ipotizzare che tale pattern di mutazioni(CCAG) , espresso significativamente nei pazienti con infezione occulta, possa giocare un ruolo nel coinvolgimento della proteina X nella carcinogenesi legato all'infezione occulta.

Tab. 3 : pattern di varianti del gene X



Gruppo A: HCC- HBV occulto

Gruppo B: HCC-HBsAg +

Gruppo C: cirrosi-HBsAg +

Profilo mutazionale del gene pre-C/C

Lo studio molecolare della regione pre-C e della porzione prossimale del Core (nt 1695-1992) ha rilevato sequenze genomiche nel fegato di 20 dei 27 pazienti con HCC e infezione occulta .

La caratterizzazione molecolare è stata condotta anche sul BCP e sullo stem dell'encapsidation signal .

L'analisi della variabilità virale della regione pre-C/C, intesa come media del numero di mutazioni nucleotidiche ha rilevato una significativa tendenza all'accumulo di mutazioni nei gruppi con HCC, indipendentemente dalla tipologia di infezione (occulta o manifesta) rispetto al gruppo senza evidenza di tumore (media n° mutazioni: gruppo A: 8.3; gruppo B: 8.8; gruppo C 3.2; p= 0.004). **Tab.4**

Anche il nostro studio ha confermato l'alta prevalenza della doppia mutazione **A1762T** e **G1764A** nel BCP dei pazienti con HCC sia nei casi con infezione occulta (70%) sia con infezione manifesta (54%) rispetto ai casi con cirrosi senza tumore (16%; p=0.01). All'interno dei tumori, comunque, vi è una prevalenza significativamente superiore nei casi con infezione occulta (p = 0.006). **Tab. 5.**

Si segnala, inoltre, la presenza di una singola mutazione A1762T nel BCP in 4 casi del gruppo A.

Lo studio del pattern di mutazioni nello stem dell'ε ha messo in evidenza che:

- la mutazione **G1896A** è espressa uniformemente nei tre gruppi di pazienti (A:60%, B:68%, C:59%). **Tab. 4**

Nella valutazione della presenza contemporanea di entrambe le varianti, BCP e pre-C stop codon, si è rilevato che esse sono espresse più

frequentemente nei casi di HCC con infezione occulta (83%) rispetto ai casi di HCC con infezione attiva (31%; $p = 0.008$). **Tab. 5**

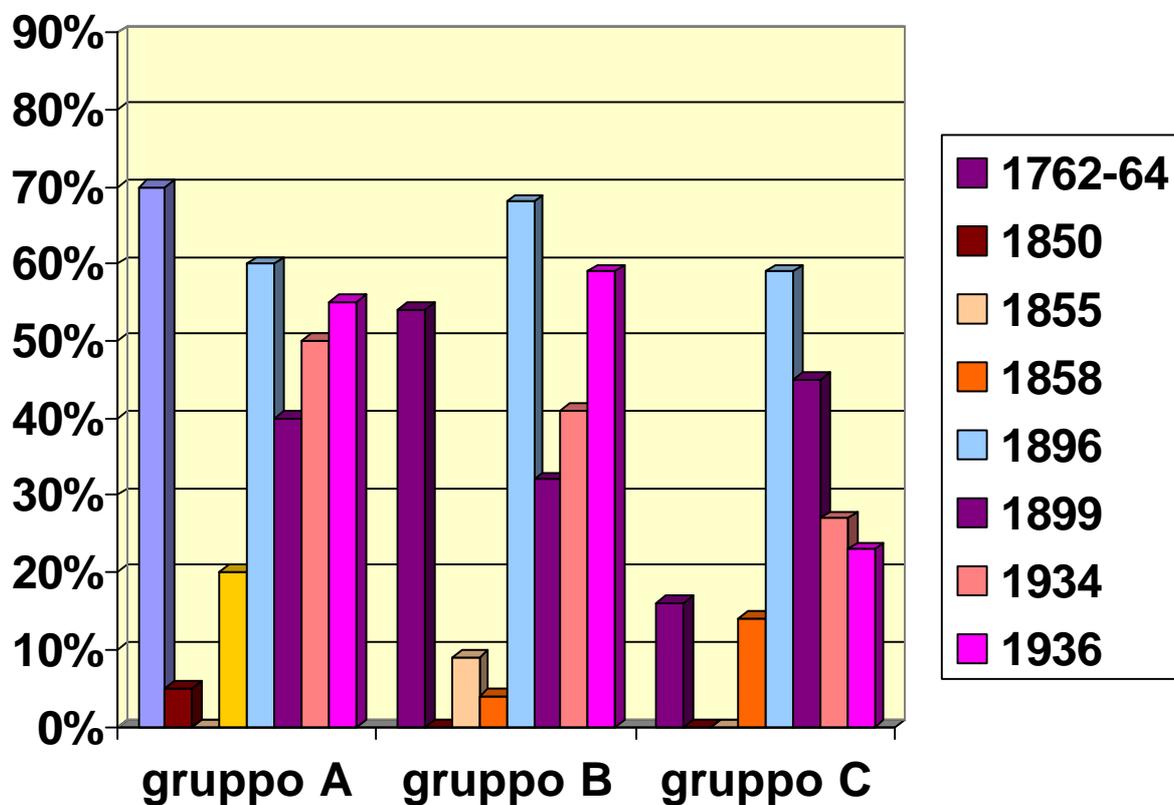
- nell'ambito delle mutazioni compensatorie dello stem, la distribuzione della mutazione **G1899A** era sovrapponibile nei tre gruppi(A:40%,B: 32%, C: 45%). **Tab. 4**

- la mutazione **C1858T** è risultata poco frequente nei tre gruppi (A:20%,B: 4%, C: 14%) così come estremamente rara è risultata la mutazione T1855G essendo espressa solo in due casi di HCC- HbsAg positivi.

- nel loro insieme le mutazioni descritte determinano l'appaiamento delle basi opposte dello stem. In particolare è emerso che la tendenza alla stabilizzazione dell' ϵ è determinata prevalentemente dalle mutazioni nelle posizioni 1896 e 1899 nei casi senza tumore (36%) rispetto ai due gruppi con HCC (gruppo A: 20% e gruppo B: 23%).

L' analisi della mutazioni porzione iniziale del gene Core ha messo in evidenza che la presenza delle varianti attigue **A1934T** e **T1936C**. La mutazione A1934T è espressa prevalentemente nel gruppo dei tumori (A:50% e B: 41%) rispetto al gruppo delle cirrosi (27%; $p = ns$). La variante T1936C si correla con la presenza di HCC sia con infezione occulta (55%) che attiva (59%), in quanto significativamente meno frequente nel gruppo senza tumore (23%; $p = 0.031$).

Tab. 4: pattern di mutazioni del gene PreCore-Core

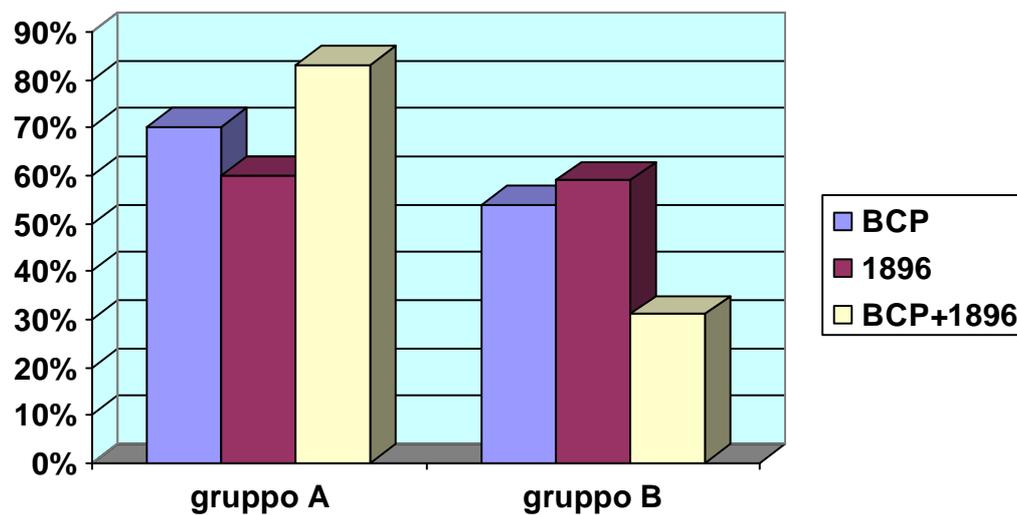


Gruppo A: HCC- HBV occulto

Gruppo B: HCC-HBsAg +

Gruppo C: cirrosi-HBsAg +

Tab. 5: confronto delle prevalenze delle mutazioni più frequenti nel gene PreC-C



Gruppo A: HCC- HBV occulto

Gruppo B: HCC-HBsAg +

DISCUSSIONE

L'epatocarcinoma cellulare (HCC) è uno dei tumori più comuni nel mondo e l'incidenza è in aumento nei paesi più industrializzati di Nord America, Europa e Asia (Lee, 1997). Solitamente si presenta come complicanza terminale di una epatite cronica di lunga durata causata, prevalentemente, da infezione con i virus HBV e/o HCV (Borsch, 1999). Molte sono le ipotesi per spiegare le ragioni per cui in alcuni pazienti l'epatite cronica HBV relata evolva verso l'HCC. Fattori legati all'ospite come la risposta immune, la predisposizione genetica allo sviluppo di HCC ma anche fattori propri del virus come un' elevata carica virale nel siero, il genotipo, le mutazioni del genoma virale e il ruolo di alcune proteine virali dimostrate essere pro-oncogenetiche sono stati correlati con la progressione verso il tumore.

L'infezione occulta da HBV è caratterizzata dalla persistenza del DNA virale negli epatociti di pazienti HBsAg negativi. La letteratura riporta che circa il 30% dei pazienti con un'epatopatia cronica HCV-relata presenta un' infezione occulta da HBV. In questi casi l'infezione occulta potrebbe avere agire come cofattore nella patogenesi epatica (Sheu, 1992).

L'obiettivo del nostro studio è stato rilevare il ruolo dell'infezione occulta da HBV nella carcinogenesi epatica attraverso l'analisi della prevalenza e la caratterizzazione molecolare del virus B di pazienti con HCC e HBsAg negativi sottoposti a resezione epatica al fine di rilevare sequenze wild type o mutate peculiari dell'infezione occulta o correlate con lo sviluppo di HCC. L'eterogeneità virale dell'HBV occulto è stata esplorata nelle regioni genomiche coinvolte nella replicazione e nella persistenza virale (X, PreC/C e BCP) e, successivamente, il pattern

mutazionale è stato comparato con le sequenze virali isolate dai due gruppi di controllo HBsAg positivi con e senza evidenza di HCC.

Abbiamo rilevato che poco più della metà dei casi con HCC-HCVrelato e HBsAg negativi sono risultati positivi per l'infezione occulta da HBV.

Analizzando i parametri clinici dei tre gruppi di pazienti è emerso che l'età media dei pazienti con HCC e infezione occulta era significativamente più bassa rispetto al gruppo con HCC e infezione attiva ma sovrapponibile all'età media dei casi con infezione attiva senza tumore. Questo suggerisce che la presenza di genomi HBV intraepatocitari potrebbe agire come co-fattore nella patogenesi del danno epatico e accelerare il processo di carcinogenesi, analogamente a quanto abbiamo rilevato nello studio della infezione HBV/HCV (De Mitri, 2006).

I nostri risultati suggeriscono che il virus B, anche nel caso di infezione occulta, rimane un fattore di rischio per lo sviluppo di HCC. Questo è in accordo con i modelli animali in cui l'infezione con gli hepadnavirus può generare il tumore epatico dopo l'apparente clearance del virus (Korb, 1989). I modelli sperimentali hanno dimostrato che, nell'infezione occulta, il virus persiste sotto forma di episoma libero nel nucleo dell'epatocita, suggerendo che piccole quantità di virus replicante inducono una infiammazione epatica più o meno lieve ma continua per tutta la vita (Michalak, 1999). Così, in accordo con i dati della letteratura clinici e sperimentali (Torbenon, 2002; Korb, 1989), anche nel nostro studio, l'alta prevalenza di infezione occulta HBV in HCC HBsAg negativi suggerisce che l'HBV è in grado di mantenere il proprio ruolo oncogenetico.

Le mutazioni genetiche dell'HBV possono contribuire alla persistenza virale nel tumore con un equilibrio tra l'effetto citopatico del virus, la capacità di escape dalla risposta immunitaria dell'ospite e l'efficienza replicativa e, potenzialmente, contribuire al ruolo del virus nel processo di trasformazione neoplastica delle cellule epatiche (Chen and Oon, 2002).

Dall'analisi dell'eterogeneità virale è emersa una certa stabilità del gene X, mentre, per quanto riguarda il gene pre-C/C nei casi con HCC, indipendentemente dall'infezione occulta o manifesta, si è confermata una significativa tendenza ad accumulare mutazioni.

In particolare, riguardo il gene X (aa 16-56), abbiamo esaminato la regione regolatoria (regulatory domain; aa 16-30), la porzione intermedia: PSR (proline/serine rich region; aa 31-45) e la porzione iniziale della regione transattivante (aa 46-56). La presenza di mutazioni puntiformi nella regione regolatoria, maggiormente espresse negli HCC con infezione occulta, indicherebbe un'alterazione dell'attività regolatoria dell'X che potrebbe tradursi in modificazioni funzionali della proteina come una maggiore potenzialità transattivante o in una maggiore capacità di interazione con geni cellulari (*c-jun*, *c-myc*, *c-fos*).

Le mutazioni espresse più frequentemente, T1461G/C e C1484A sono risultate significativamente più frequenti nei casi con HCC. In particolare, la mutazione sinonima T1461G/C che determina una variazione dell'aa 30 al termine della regione regolatoria con un cambiamento della Fenilalanina in Valina (se T → G) o in Leucina (se T → C), è prevalente nei casi di HCC con infezione occulta rispetto ai due gruppi di controllo. Invece, la mutazione non-sinonima C1484A è significativamente presente nei casi con HCC indipendentemente dalla presenza di infezione occulta o attiva.

Inoltre è stato individuato, in posizione 1509, 1511, 1512, un pattern di mutazioni sinonime contigue TCGT → **CCAG** (aa 46-47: SS → PA), significativamente espresso nei casi con HCC e infezione occulta. Poiché questo cluster di mutazioni **CCAG** coincide con l'inizio della sequenza funzionale che attribuisce proprietà transattivanti alla proteina X, pensiamo che possa in qualche modo giocare un ruolo nel coinvolgimento della proteina X nel processo di carcinogenesi epatica da HBV occulto.

L'analisi dell'eterogeneità della regione pre-C/C, che codifica per l'antigene "e", è stata condotta anche sul suo promoter (BCP) le cui mutazioni sono strettamente correlate all'HCC negli isolati orientali (Tong, 2006) e sull' ϵ , responsabile del processo di capsidazione virale, step essenziale per la replicazione (Lok, 1994).

L'alta prevalenza di mutanti **A1762T/G1764A** nel BCP tra i pazienti con HCC ha confermato i dati della letteratura che identificano tali varianti come fattori di rischio nello sviluppo di HCC HBV-relato (Kao, 2003), ma rilevare la presenza di varianti BCP in percentuale significativamente superiore nei casi di HCC con infezione occulta ha confermato la peculiarità dell'HBV di mantenere le sue proprietà pro-oncogenetiche .

Per quanto riguarda lo studio di mutanti e-minus, causati dalla mutazione **G1896A**, coinvolti nella patogenicità virale (Brunetto, 1999) e delle altre mutazioni compensatorie (T1850, T1855, T1858, G1899), non sono emerse differenze significative tra i tre gruppi di pazienti. In un recente studio abbiamo rilevato una maggiore prevalenza dell'instabilità dell'epsilon nei casi di HCC con co-infezione HBV/HCV come potenziale espressione di replicazione virale difettiva (De Mitri, 2006). Tale prevalenza non si conferma in questo studio poichè il grado di instabilità è uniforme nei tre gruppi di pazienti, suggerendo che non

esiste differenza nell'efficienza replicativa del virus tra HBV occulto e HBV attivo, per quanto riguarda le attività di encapsidazione dell'RNA pre-genomico.

Infine, due mutazioni nella porzione iniziale del Core, in posizione 1934 e soprattutto quella in posizione 1936, sono risultate prevalentemente espresse nei casi con HCC rispetto ai casi senza tumore, indipendentemente dallo status dell'HBV.

In conclusione, i nostri risultati hanno rilevato che sequenze genomiche di HBV sono presenti in HCC senza evidenza sierologica di infezione attiva. La letteratura riporta che la persistenza dell' HBV occulto causa una necroinfiammazione lieve ma continua che contribuirebbe all'evoluzione verso la cirrosi e alla progressione verso il tumore epatico. Questo però contrasta con l'età dei pazienti con HCC e infezione occulta che è significativamente inferiore rispetto a quella dei pazienti con HCC e infezione manifesta. Questo dato, già rilevato in letteratura nei casi di HCC con co-infezione HBV/HCV (De Mitri, 2006), supporta l'ipotesi che l'HBV occulto rappresenta un co-fattore nella progressione verso il tumore .

Il rilievo di pattern di mutazioni di regioni genomiche, coinvolte nella persistenza virale e nella carcinogenesi epatica, in HCC con infezione occulta spesso sovrapponibile a quello di HCC con infezione attiva, suggerisce che l'HBV occulto conserva la capacità di sintetizzare proteine virali (HBx, HBc) con le stesse proprietà pro-oncogenetiche.

Di conseguenza, potrebbero essere gli stessi meccanismi indiretti e diretti coinvolti nella epatocarcinogenesi HBV relata.

Il nostro studio potrebbe essere completato attraverso l'analisi proteomica dei mutanti dell' HBV occulto per meglio chiarirne il ruolo oncogenetico.

BIBLIOGRAFIA

Almeida JD, Waterson AP. **Hepatitis B antigen – an incomplete history.** *Am J Med Sci* 1975; 270: 105-14

Becker, Lee, Butel, Slagle. **Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair** *Virol*, 1998; 72: 266-72

Blum, Offensperger, Walter. **Hepatocellular carcinoma and hepatitis B infection: molecular evidence for monoclonal origin and expansion of malignantly transformed hepatocytes.** *J Cancer Res Clin Oncol* 1987; 113: 466-72

Blum, Zhang, Galun, Von Weizsacker, Garner, liang, Wands. **Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro.** *J Virol* 1992; 66: 1223-27

Bonino F, Brunetto MR. **Hepatitis B virus heterogeneity, one of many factors influencing the severity of hepatitis B.** *J Hepatol* 1993; 18: 5-8

Borsh FX, Ribes J, Borrás J. **Epidemiology of primary liver cancer.** *Semin Liver Dis* 1999; 19: 271-85

Bouchard MJ, Schneider RJ. **The enigmatic X gene of hepatitis B virus.** *J Virol* 2004; 78: 12725-34

Brechot C. **Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms.** *Gastroenterology* 2004; 127: S56-61

Brechot C, Thiers V, Kremdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. **Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely “occult”.** *Hepatology* 2001; 34: 194-203

Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F. **Hepatitis B virus mutants.** *Intervirology* 1999; 42: 69-80

Bruss V. **Hepatitis B virus morphogenesis.** *World J Gastroenterol* 2007; 13: 65-73

Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. **Effects of naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication.** *J Virol* 1996; 70: 5845-51

Buckwold, Xu, Yen. **Effect of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication.** *J Gen Virol*,1997;78:2055-65

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando A, Raimondo G. **Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease.** *NEJM* 1999; 341: 22-26

Carman WF, Thomas HC. **Genetic variation in hepatitis B virus.** *Gastroenterology* 1992; 102: 711-9

Chan,Sung. **Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus** *Semin Liver Dis* 2006;26:153-61

Chan, Hui, Wong. **Genotype C hepatitis B infection is associated with increased risk of hepatocellular carcinoma.***GUT* 2004;53:1494-8

Chemin I, Trepo C. **Clinical impact of occult HBV infections.** *J Clin Virol* 2005; 34: S15-21

Chen WN and Oon CJ. **Hepatitis B virus mutants: an overview.** *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: S497-99

Chomczynsky P and Sacchi N. **Single step method of RNA isolation by acid guanidinium tiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159

Chou YC, Cheu ML, Hu CP, Chen YL, Chong CL, Tsai YL, Liu TL, Jeng KS, Chang C. **Transforming growth factor-beta 1 suppresses hepatitis B virus replication primarily through transcriptional inhibition of pregenomic RNA.** *Hepatology* 2007; 46: 672-81

Chou, Yu, Wu. **Temporal relationship between hepatitis B virus enhancerII/basal core promoter sequence variation and risk of hepatocellular carcinoma.** *GUT* 2008; 57:91-7

Chu CJ, Lok AS. **Clinical significance of hepatitis B genotypes.** *Hepatology* 2002; 35: 1274-1276

Colombo, De Franchis, Del Ninno. **Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis.** *N Eng J Med* 1991;325:675-80

Cougot, Neuveut, Buendia. **HBV induced carcinogenesis.** *Clin Virol* 2005;34Suppl1:S75-S78

De Mitri MS, Cassini R, Morsica G, Bagaglio S, Androne P, Loggi E, Muratori P, Bernardi M. **Virological analysis, genotypes and mutational patterns of the HBV precore/core gene in HBV/HCV-related hepatocellular carcinoma.** *J Viral Hepat* 2006; 13: 574-81

Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, **Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis b virus carriers in Shanghai,China.***Intervirol*2001;44:43-7

Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G. **Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence.** *Oncogene* 2006; 25: 3756-70

Echevarria JM, Avellon A. **Hepatitis B virus genetic diversity.** *J Med Virol* 2006; 78: S36-42

Eeles RA, Warren W, Stamps A. **The PCR Revolution.** *Eur J Cancer* 1992; 28: 289-93

Elmoor, Hancock, Chang, Wang. **Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interaction in the modulation of apoptosis** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ;94 :14707-12

Enomoto M, Sawano Y, Kosuge S, Yamano Y, Kuroki K, Ohtsuki K. **High phosphorylation of HBV core protein by two alpha-type CK2-activated cAMP-dependent protein kinases in vitro.** *FEBS Lett* 2006; 80: 894-99

Fattovich G. **Natural history of hepatitis B.** *J Hepatol* 2003; 39: S50-8

Flodell S, Schleucher J, Cromsigt J, Ippel H, Kidd-Ljunggren K, Wijmenga S. **The apical stem-loop of the hepatitis B virus encapsidation signal folds into a stable tri-loop with two underlying pyrimidine bulges.** *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 4803-11

Frietrich, Wollersheim, Brandeburg. **Induction of antiproliferative mechanism in hepatitis B virus producing cells.** *Hepatol* 2005;43:696-703

Geller. **Hepatitis B and hepatitis C.** *Clin Liver Dis* 2002;6:317-34

Luber, Lauer, Weiss. **The hepatitis B virus transactivator HBx causes elevation of diacylglycerol and activation of PKC.** *Res Virol* 1993;144:311-21

Harrison. **Principi di medicina interna.** 2002 (XV edizione)

Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. **HBV virological assessment.** *J Hepatol* 2006; 44: S71-6

Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. **Clinical relevance of hepatitis B viral mutations.** *Hepatology* 2000; 31: 1037-44

Kao, Chen, Lai **Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C.** *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4068-71

Kao JH. **Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics.** *J Gastroenterol Hepatol* 2002 Jun; 17(6): 643-50

Kekule, Lauer, Weiss. **Hepatitis transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway.** *Nature* 1993;361:742-45

Kidd-Ljunggren, Miyakawa, Kidd. **Genetic variability in hepatitis B viruses.** *J Gen Virol* 2002; 83: 1267-80

Kirosawa. **Trend of liver cirrhosis as precancerous lesions.** *Hepatol Res*,2002; 24:40-5

Knaus T and Nassal M. **The encapsidation signal on hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function.** *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3967-75

Korb BE, Wells FV, Bardwin B, Cote PJ, Tennant BC, Popper H, Gerin JL. **Hepatocellular carcinoma in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks: presence of viral DNA in tumor tissue from chronic carriers and animals serologically recovered from acute infections.** *Hepatology* 1989; 9: 461-70

Kwok S and Higunchi R. **Avoing false positives with PCR.** *Nature* 1989; 339: 236-38

Ito, Tanaka, Orito. **T1653 mutation in the boxA increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection.** *Clin Infect Dis* 2006; 42:1-7

Lai CI, Shouval D, Lok AS. **Entecavir versus lamivudine for patients with HbeAg negative chronic hepatitis B.** *Gastroenterology*, 2006 ;130 :2039-49

Lee, Rho. **Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein.** *Oncogene*, 2000 ;19 :468-71

Liu, Chen BF, Chen PJ. **Role of hepatitis B virus Precore/core promoter mutations and serum viral load on noncirrhotic hepatocellular carcinoma: a case control study.** *J Infect Dis* 2006;194 :594-9

Larghi A, Leffler D, Frucht H, Rubin M, Semrad CE, Lefkowitz JH, Worman HJ. **Hepatitis B virus reactivation after kidney transplantation and new onset lymphoma.** *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 276-80

Locarnini S. **Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy.** *Semin Liver Dis* 2005; 25: 9-19

Lok AS. **Hepatitis B infection: pathogenesis and management.** *J Hepatol* 2000; 32: 89-97

Lok AS, Akarca U, Greene S. **Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4077-81

Lupberger J, Hildt E. **Hepatitis B virus induced oncogenesis.** *World J Gastroenterol* 2007; 13: 74-81

Madden, Finegold, Slagle. **Expression of hepatitis B virus X protein does not alter the accumulation of spontaneous mutations in transgenic mice.** *Virology* 2000;74:5266-72

Madden, Slagle. **Stimulation of cellular proliferation by hepatitis virus X protein.** *Dis Markers* 2001;43:696-703

McMahon. **Epidemiology and natural history of Hepatitis B.** *Semin Liver Dis* 2005; 25: 3-8

Melegari, Wolf, Schneider. **Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by Core protein serine phosphorylation and HBx expression.** *Virology* 2005;79:9810-20

Michalak TI, Pardoe IU, Coffin CS, Churchill ND, Freake DS, Smith P Trelegan Cl. **Occult lifelong persistence of infectious hepadnavirus and residual liver inflammation in woodchucks convalescent from acute viral hepatitis.** *Hepatology* 1999; 29: 928-38

Minemura M, Shimizu Y, Hirano K, Nakayana Y, Tokimitsu Y, Tajiri K, Yamada K, Xue F, Takahara T, Watanabe A, Sugitama T. **Functional analysis of transactivation by mutants of hepatitis B virus X gene in human hepatocellular carcinoma.** *Oncol Rep* 2005; 14: 495-99

Miura Y, Shibuya A, Adachi S, Takeuchi A, Tsuchihashi T, Nakazawa T, Saigenji K. **Occult hepatitis B virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C in whom eradication fails.** *Hepatol Res* 2008 Jan 2 [Epub ahead of print]

Murakami, Cheong, Ohno. Transactivation of human hepatitis B virus x protein operates through a mechanism distinct from PKC and okadaic acid activation pathways. *Virulogy* 1994;199:243-46

Morapdour, Blum. **Pathogenesis of hepatocellular carcinoma.** *Eur J Gastr Heptol* 2005;17:477-83

Murakami, Saigo, Takashima. **Larged scaled analysis of HBV DNA integration in HBV related Hepatocellular carcinomas.** *GUT* 2005; 54:1162-8

Nakamoto Y, Guidotti LG, Kuhlen CV, Fowler P, Chisari FV. **Immune pathogenesis of HCC.** *J Exp Med* 1998;188:341-50

Okuda H. **Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 161-73

Orito, Ichida, Sakugawa, Sata. **Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan.** *Hepatology*, 2001;34:590-4

Oste C. **Polymerase Chain Reaction**. *BioTechniques* 1988; 6: 162-7

Parkin. **Global cancer statistics in the year 2000**. *Lancet Oncol* 2001;2:533-43

Peng Z, Zhang Y, Gu W, Wang Z, Li D, Zhang F, Qiu G, Xie K. **Integration of the hepatitis B virus X fragment in hepatocellular carcinoma and its effects on the expression of multiple molecules: a key to the cell cycle and apoptosis**. *Int J Oncol* 2005; 26: 67-73

Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Craxì A, Farinati F, Missale G, Smedile A, Tiribelli C, Ville E, Raimondo G. **Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection**. *Gastroenterology* 2004; 126: 102-10

Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, Levrero M, Raimondo G. **Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma**. *Hepatology* 2007; 45: 277-85

Raimondo G, Balsamo C, Craxì A, Farinati F, Levrero M, Mondelli M, Pollicino T, Squadrito G, Tiribelli C. **Occult hepatitis B virus infection**. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 822-6

Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. **Occult hepatitis B virus infection**. *J Hepatol* 2007; 46: 160-70

Reifenberg, Nusser, Lohler, Spindler, Kuhn, Von Weizsacker, Kock. **Virus replication and virion export in X-deficient hepatitis B virus transgenic mice.** *Gen Virol*, 2002; 83: 991-96

Robinson WS. **Hepadnaviridae and their replication.** B.N. Fields *Virology, Raven Press* 1990; 76: 2137-61

Rodriguez-Torres M, Gonzalez-Garcia J, Brau N, Sola R, Moreno S, Rockstroh J, Smaill F, Mendes-Correa MC, Depamphilis J, Torriani FJ. **Occult hepatitis B virus infection in the setting of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) co-infection: Clinically relevant or a diagnostic problem?** *J Med Virol* 2007; 79: 694-700

Sanchez Tapias, Costa, Mas. **Influence of hepatitis B virus genotype on the long- term outcome of chronic hepatitis B in Western patients.** *Gastroenterology*, 2002; 123: 1848-56

Sagnelli E, Stroffolini T, Mele A, Imperato M Almasio PL, Italian Hospitals' Collaborating Group. **Chronic hepatitis B in Italy: new features of an old disease – approaching the universal prevalence of hepatitis B e antigen-negative cases and the eradication of hepatitis D infection.** *Clin Infect Dis* 2008; 46: 110-3

Schuttler CG, Fiedler N, Schmidt K, Reep R, Gerlich WH, Schaefer S. **Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein.** *J Hepatol* 2002; 37: 855-62

Seeger C and Mason WS. **Hepatitis B virus biology.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68

Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. **Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus.** *J Viral Hepat* 2006; 13: 427-34

Sheu JC, Huang GT, Shih LN. **Hepatitis C and B viruses in hepatitis B surface antigen-negative hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 1992; 102: 1322-1327

Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Bréchet C. **Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative transactivation effects of HBx.** *Oncogene* 1999; 18: 4848-59

Squadrito G, Pollicino T, Cacciola I, Caccamo G, Villari D, La Masa T, Restuccia T, Cucinotta E, Scisca C, Magazzu D, Raimondo G. **Occult hepatitis B virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients.** *Cancer* 2006; 106: 1326-30

Staib, Hussin, Hofseth. **Tp53 and liver carcinogenesis** *Hum mutat* 2003;21:201-16

Stroffolini T, Mele A, Tosti MF, Gallo G, Balocchini E, Ragni P. **The impact of the hepatitis B mass immunization campaign on the incidence and risk factors of acute hepatitis B in Italy.** *J Hepatol* 2000; 33: 980-5

Stockl, Berting, Malkowski, Foerste, Hofschneider, Hildt. **Integrity of c-raf-1/MEC signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression** *Oncogene*, 2003; 22: 2604-10

Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. **Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein.** *Cancer Sci* 2006; 97: 977-83

Thompson JP, Higgins DG, Gibson TJ. **Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-80

Tong, Li, Vivitski. **Replication capacities of natural and artificial preCore stop codon mutants of hepatitis B virus.** *Virology*, 1992; 191: 237-45

Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG. **Precore/basal core promoter mutants and hepatitis B viral DNA levels as predictors for liver deaths and hepatocellular carcinoma.** *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6620-26

Torbenson M, Thomas D **Occult hepatitis B.** *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 479-86

Torre F, Naoumov NV. **Clinical implications of mutations in the hepatitis B virus genome.** *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 604-14

Tsukuma, Hiyama, Tanaka. **Risk factors for HCC among patients with chronic liver disease.** *N Eng J Med* 1993; 328: 1797-801

Ueda, Ullrich, gangemi. **Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer.***Nat Genet* 1995;9:41-47

Waris, Siddiqui. **Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C.** *J Biosci* 2003 ;28 :311-21

Wang HC, Huang W, Lai MD, Su I. **Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis.** *Cancer Science* 2006; 97: 683-88

Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B. **Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B.** *Hepatology* 2006; 44: 675-84

Yokosuka O, Arai M. **Molecular biology of Hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B.** *Med Mol Morphol* 2006; 39: 113-20

Yuen, Tanaka, Mizokami. **Role of hepatitis B virus genotypes B and C, core promoter and precore mutations on hepatocellular carcinoma: a case control study.** *Carcinogenesis*, 2004;25:1595-8

Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. **Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo.** *J Virol* 1994;68:2026-30

Zoulim. **Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection.** *Antiviral Res* 2004;46:1-15