

## Applicazione della tecnica di representational difference analysis (RDA) allo studio del carcinoma epatocellulare

R. Romeo

*Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Milano IRCCS, Ospedale Maggiore*

**Riassunto.** La relazione esistente tra infezione da HCV e comparsa di carcinoma epatocellulare è suggerita da numerosi studi epidemiologici e virologici, condotti in diverse parti del mondo. D'altra parte è ancora discussa la possibilità che l'HCV possa avere un ruolo oncogenetico diretto. Il virus manca infatti dell'enzima trascrittasi inversa che consentirebbe l'integrazione del genoma virale nel genoma della cellula ospite. Studi sperimentali tuttavia suggeriscono che il virus C potrebbe essere direttamente coinvolto nella epatocarcinogenesi, in particolare attraverso la presenza di alcuni prodotti virali che potrebbero essere coinvolti nella regolazione dei processi di proliferazione cellulare. La tecnica di Representational Difference Analysis (RDA) costituisce un efficace approccio per l'identificazione di differenze nelle sequenze di DNA di genomi complessi. L'applicazione di questa tecnica allo studio del carcinoma epatocellulare HCV correlato ha la potenzialità di condurre all'identificazione di sonde in grado di evidenziare la perdita di eterozigosi, così come potrebbe permettere di isolare sequenze DNA altamente ripetute nel tessuto tumorale.

**Abstract.** Several epidemiological and virologic studies conducted worldwide show the existence of a relationship between the presence of hepatitis C virus infection (HCV) and the development of hepatocellular carcinoma. The potential direct oncogenicity of HCV is still debated since no reverse transcriptase activity has been demonstrated so far. On the other hand, experimental data suggest that HCV may be directly involved in hepatocarcinogenesis with some products of the virus involved in regulating liver cell proliferation. Representational Difference Analysis (RDA), represents a powerful tool for the identification of differences in DNA sequences from complex genomes. The application of this technique to the investigation of HCV related hepatocellular carcinoma has the potential of identifying probes to detect a loss of heterozygosity as well as to isolate DNA sequences highly represented in tumor tissue.

### Introduzione

La grande variazione nei livelli dei fattori carcinogenetici nell'ambiente, è la maggiore responsabile per le diverse incidenze di carcinoma epatocellulare (CE) osservate nel mondo (1, 2).

In molte parti del mondo, includendo anche la maggior parte dei paesi europei, il ruolo del virus dell'epatite B (HBV) nel determinare l'insorgenza di carcinoma epatocellulare appare essere in forte declino, a fronte dei dati relativi al virus dell'epatite C (HCV) che mostrano una crescente importanza di questo agente eziologico, nella patogenesi della cirrosi epatica e del carcinoma epatocellulare (3, 4).

La caratterizzazione del virus C ha costituito uno dei fatti più significativi per l'epatologia degli ultimi anni, dimostrandosi come l'agente responsabile di

gran parte delle epatiti non-A, non-B e delle epatiti croniche criptogenetiche (5, 6).

Il virus C è diffuso a livello mondiale. In Italia, la prevalenza concordemente stimata negli adulti al di sopra dei 26 anni di età è del 3%, mentre è sensibilmente inferiore nella popolazione più giovane. Accanto alle dimensioni epidemiologiche del problema epatite C, un aspetto importante ed inquietante è rappresentato dalla storia naturale dell'infezione. E' infatti noto che oltre l'80% delle infezioni acute progredisce a malattia cronica, il 20% circa delle infezioni croniche evolve a cirrosi e di queste il 4% circa sviluppa carcinoma epatocellulare (7, 8).

Il virus C non è mai stato dimostrato come agente eziologico direttamente collegato allo sviluppo del tumore, soprattutto perché manca dell'enzima trascrittasi inversa che consentirebbe l'integrazione

**Tabella 1. Progressione dell'epatite non-A, non-B (C) a carcinoma epatocellulare**

Autore	Modalità di Infezione	Progressione Istologica	Incubazione (anni)
Ayoola 1982	Sporadica	ECA - CE	3
Resnick 1983	Trasfusionale	CE	17
Gilliam 1984	Trasfusionale	ECA - CIRR - CE	9
Kiyosawa 1984	Trasfusionale	ECP - ECA - CIRR - CE	13
Cohen 1987	Sporadica	ECA - CIRR - CE	8

ECA: epatite cronica attiva; CE: carcinoma epatocellulare; CIRR: cirrosi; ECP: epatite cronica persistente

**Tabella 2. Studi prospettici sul carcinoma epatocellulare (CE) in pazienti con epatite cronica C**

Criteri di arruolamento	Autori	N° pazienti	CE per anno (%)	Fattori predittivi
Transaminasi persistentemente o intermittenemente elevate	Tradati 1998	385	0,4	Cirrosi, Età, AFP
Epatite cronica istologica	Tsukuma 1993	433	1,2	Cirrosi, Età, AFP
	Takano 1995	124	1,7	Severità istologica
	Shibata 1998	179	1,2	Proliferazione cellulare
Cirrosi	Benvegnù 1994	188	2,2	Sesso, Età, Alcol, HBV
	Bruno 1997	163	2,5	Tipo virale, Età, Sesso, Alcol
	Romeo 1997	246	2,2	Età, Sesso, AFP

CE: carcinoma epatocellulare; AFP: alfa fetoproteina; HBV: virus dell'epatite B

del genoma virale nel genoma della cellula ospite. D'altra parte esistono evidenze di natura diversa che indicano il virus C come potenzialmente responsabile dello sviluppo del tumore. Numerosi studi epidemiologici condotti in molte parti del mondo, hanno dimostrato la presenza di positività ad ampio spettro tra le diverse aree mondiali (Tabella 1), così come nell'ambito della stessa area geografica (7-11). Questi studi hanno permesso di disegnare una mappa dell'epidemiologia mondiale del carcinoma epatocellulare HCV correlato, identificando aree a bassa, intermedia ed alta prevalenza di positività anti-HCV nel tumore.

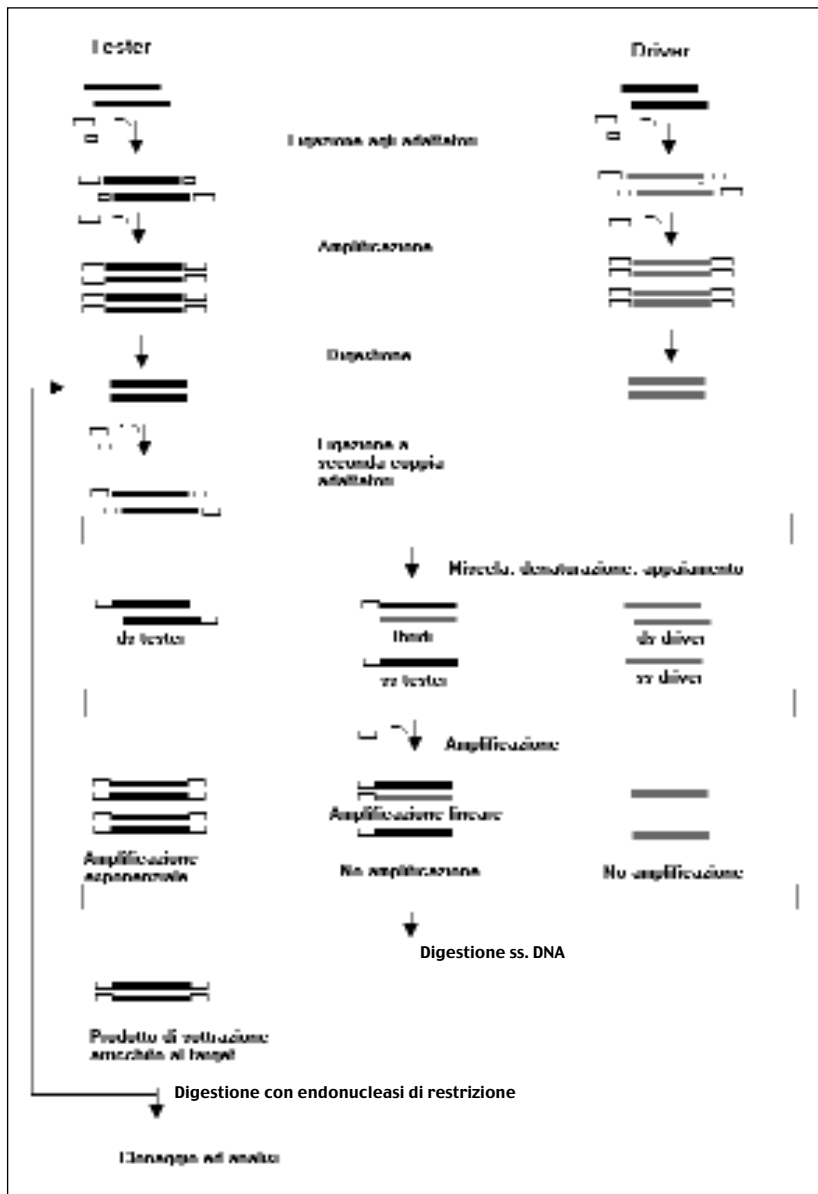
Un'importante evidenza di connessione tra infezione C e sviluppo di carcinoma epatocellulare è data dall'analisi di case reports, che indicano lo sviluppo sequenziale di malattia epatica cronica e carcinoma epatocellulare, osservato in molti casi di infezione sia di origine sporadica che post trasfusionale. Queste osservazioni hanno permesso di dedurre che il carcinoma epatocellulare costituisce una conseguenza a lungo termine della epatopatia cronica e che la cirrosi, quasi invariabilmente, precede lo sviluppo del tumore costituendo per tanto il più impor-

tante fattore di rischio indipendente per lo sviluppo del tumore stesso. L'importanza della cirrosi, come fattore di rischio per lo sviluppo del tumore, emerge anche dai dati riassunti nella tabella 2 che raccoglie i dati di una serie di lavori, alcuni dei quali di recente pubblicazione (12-18). In particolare, uno studio prospettico che prevedeva il follow-up a tre anni di 917 pazienti giapponesi con epatite virale cronica ha mostrato che 54 pazienti con cirrosi o epatite cronica sviluppavano il tumore (13). D'altra parte, il rischio cumulativo a tre anni di sviluppare carcinoma epatocellulare era 12,5% per i pazienti con cirrosi rispetto al 3,8% dei pazienti con epatite cronica.

### Patogenesi molecolare del carcinoma epatocellulare HCV correlato

Anche se la presenza di cirrosi epatica rimane il più importante fattore di rischio nello sviluppo del tumore, alcuni dati della letteratura segnalano la presenza di casi di carcinoma epatocellulare sviluppati in pazienti con epatite cronica C in assenza di cir-

Figura 1



rosi (19). Dati sperimentali suggeriscono che l’HCV potrebbe essere direttamente coinvolto nei processi di epatocarcinogenesi.

Le basi molecolari della carcinogenesi epatica da HCV sono scarsamente conosciute, tuttavia la presenza di HCV è stata dimostrata nel tessuto tumorale (20). In particolare è stata segnalata la presenza della catena negativa (- strand) di HCV-RNA, suggerendo una attiva replicazione virale. In uno studio è stato dimostrato che la proteina del capsido dell’HCV, privata dell’estremità carbossiterminale, è in grado di accumularsi nei nuclei delle cellule Hep G2 e COS (21). Questo potrebbe conferire alla proteina una funzione trans regolatrice sui promotori virali o cellulari e, in collaborazione con gli oncogeni

cellulari, fungere da iniziatrice del fenotipo neoplastico. In un altro studio, la proteina non strutturale NS3 è stata dimostrata in grado di indurre la trasformazione di fibroblasti di ratto *in vitro*, oltre ad indurre la formazione di tumore in topi immunocompromessi (22).

Nonostante questi dati della letteratura, allo stato attuale non disponiamo di dati che dimostrino un reale coinvolgimento in vivo dell’HCV come fattore oncogenetico diretto.

### Representational Difference Analysis (RDA)

RDA rappresenta un metodo estremamente efficace per l’identificazione di differenze nelle sequenze di DNA di genomi complessi, associate a variazione del fenotipo e a malattia (23). Appartiene alla classe generale delle metodologie a sottrazione di DNA. Il termine “representation” indica il campionamento altamente riproducibile di due DNA genomici mediante digestione con enzimi di restrizione, ligazione ad adattatori oligonucleotidici e amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR). I vantaggi di questo approccio sono fondamentalmente nella riduzione della complessità delle sequenze di DNA in analisi, aumentando l’efficienza dei passaggi successivi.

La tecnica è basata sul principio dell’ibridazione sottrattiva di due campioni di acido nucleico ottenuti dallo stesso individuo. Uno dei campioni (popolazione driver), viene ibridato in largo eccesso contro il secondo campione (popolazione tester) al fine di eliminare le sequenze comuni ai due campioni, arricchendo le sequenze nucleotidiche presenti unicamente nella popolazione tester. La figura 1 mostra schematicamente il principio della tecnica. Dopo ligazione di una coppia di adattatori oligonucleotidici alla popolazione tester, avviene l’amplificazione classica mediante PCR. Le sequenze nucleotidiche della popolazione tester che si riappaiano tra loro (omoduplex), subiscono un’amplificazione di tipo esponenziale avendo lo stesso adattatore su entrambe le catene. Al contrario, le sequenze derivanti dalla popolazione tester che si appaia-

no a sequenze della popolazione driver (eteroduplex) subiranno un'amplificazione di tipo lineare, in quanto l'adattatore è presente solamente su una delle due catene. Queste fasi vengono definite arricchimento cinetico.

La realizzazione di tre cicli successivi di RDA utilizzando coppie di adattatori differenti ad ogni singolo ciclo, consente un'amplificazione sempre più efficace delle sequenze specifiche (target) della popolazione tester.

Nel secondo e terzo ciclo, i DNA target della popolazione tester si riappaiano tra loro molto più rapidamente delle sequenze non target, poiché i frammenti target sono presenti nella miscela ad una concentrazione molto maggiore. Pertanto, la selettiva amplificazione degli omoduplex ha come risultato un'addizionale arricchimento cinetico dei frammenti di DNA target. La combinazione tra sottrazione e arricchimento cinetico conduce ad un altissimo grado di purificazione della sequenza target ( $> 10^7$  dopo il terzo ciclo). RDA è così efficiente che, se i "representations" sono stati ottenuti correttamente, anche una sola breve sequenza nucleotidica presente in una delle due popolazioni di DNA altamente correlate tra loro, può essere isolata.

La tecnica RDA, pur essendo estremamente efficace presenta una serie di problemi importanti. Innanzitutto esiste un notevole rischio di contaminazione dei diversi campioni durante i vari cicli. E' inoltre fondamentale che gli acidi nucleici di partenza siano di ottima qualità, in particolare, nel caso di acidi nucleici estratti a partire da campioni di tessuto, la condizione ideale sarebbe quella di disporre di tessuti freschi affinché la degradazione di DNA e/o RNA sia minima. D'altra parte è imperativo che i campioni di tessuto comparati, siano il più significativi possibile.

La tecnica RDA è stata utilizzata largamente e con successo, in campo oncologico, paragonando tessuti tumorali e non tumorali dello stesso paziente come tester o driver, alternativamente. Quando la popolazione driver è costituita dal tessuto tumorale, RDA genera sonde che rivelano la perdita di eterozigosi. Questo tipo di approccio è stato seguito nello studio di tumori del rene, dell'esofago, dello stomaco, del colon-retto (24). Se invece la popolazione driver è costituita da tessuto normale appartenente allo stesso tumore ed è la popolazione tester ad essere costituita dagli acidi nucleici estratti dal tessuto tumorale, RDA permette di accumulare sequenze altamente ripetute nel tumore. Questo approccio ha consentito ad esempio di dimostrare l'amplificazione di Mdm2 in determinati tumori (25).

L'applicazione della tecnica RDA allo studio del carcinoma epatocellulare HCV correlato, si basa su diverse ipotesi. Anzitutto, esiste una relazione tra la

trascrizione di determinati geni cellulari e la trasformazione maligna degli epatociti. Poiché, come abbiamo visto, tale relazione potrebbe dipendere dalla presenza del virus C, la tecnica RDA potrebbe consentire l'identificazione dei geni candidati. Inoltre, poiché i geni implicati nella carcinogenesi potrebbero esistere già nelle lesioni pre-neoplastiche, RDA potrebbe aiutare a determinare il potenziale degenerativo delle diverse lesioni pre-neoplastiche e determinare in questo ambito i geni specificatamente indotti dall'infezione virale HCV.

In conclusione, l'approfondimento delle conoscenze sulla biologia molecolare del virus dell'epatite C appare di fondamentale importanza nella comprensione dei meccanismi patogenetici che conducono alla comparsa del carcinoma epatocellulare in presenza di infezione da HCV. La tecnica RDA, potrebbe costituire un approccio ideale sebbene complesso, alla comprensione di tali meccanismi patogenetici.

## Bibliografia

1. Bosch FX, Munoz N. Hepatocellular carcinoma in the world: epidemiologic questions. In: Tabor E, Di Bisceglie AM, Purcell RH, eds. Etiology, Pathology and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in North America. Houston, Tx: Gulf Publishing Company, pp 35-54, 1991.
2. Okuda K. Hepatitis C Virus and hepatocellular carcinoma. In: K Okuda, ed. Liver Cancer. New York: Churchill Livingstone, pp 39-49, 1997.
3. Okuda K, Fujimoto I, Hanai A, Urano Y. Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Res*; 47: 4698 – 4672, 1987.
4. Bellentani S, Tiribelli C, Saccoccio G et al. Prevalence of chronic liver disease in the general population of Northern Italy: the Dionysos study. *Hepatology*, 20: 1442 – 1449, 1994.
5. Sanchez-Tapias JM, Barrera J, Costa J et al. Hepatitis C virus infection in patients with non-alcoholic chronic liver disease. *Ann Intern Med*, 112: 921 – 924, 1990.
6. McHutchinson JG, Kuo G, Houghton M, Choo Q, Redeker AG. Hepatitis C virus antibodies in acute icteric and chronic non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterology*, 101: 1117 – 1119, 1991.
7. Colombo M, Kuo G, Choo Q-L, et al. – Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet*; 2: 1006 – 1008, 1989.
8. Bruix J, Barrera JM, Calvet X et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet*; 2: 1004, 1989.
9. Chen DS, Kuo GC, Sung JL et al. Hepatitis C virus infection in an area hyperendemic for hepatitis B and chronic liver disease : the Taiwan experience. *J Infect Dis*, 162: 817 – 822, 1990.

10. Kew MC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Hepatitis C virus antibodies in Southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 1: 873 – 874, 1990.
11. Hasan F, Jeffers LJ, De Medina M et al. Hepatitis C associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 12: 589 – 591, 1990 .
12. Tradati F, Colombo M, Mannucci PM et al. A prospective multicenter study of hepatocellular carcinoma in Italian hemophiliacs with chronic hepatitis C. *Blood*, 91 : 1173 – 1177, 1998.
13. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med*, 328: 1797 – 1801, 1993.
14. Takano S, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Omata M. Incidence of chronic hepatitis B and C . A prospective study of 251 patients. *Hepatology*, 21: 650 – 655, 1995.
15. Shibata M, Morizane T, Uchida T et al. Irregular regeneration of hepatocytes and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis C virus infection. *Lancet*, 351: 1773 – 1777, 1998.
16. Benvegnù L, Fattovich G, Noventa V et al. Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Cancer*, 74: 2442 – 2448, 1994.
17. Bruno S, Silini E, Crosignani A et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology*, 25: 754 – 758, 1997.
17. Romeo R, Rumi MG, Del Ninno E, Colombo M. Hepatitis C virus genotype 1b and risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 26: 1077, 1997.
18. De Mitri MS, Poussin K, Baccarini P et al. HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet*, 345 : 413 – 415, 1995.
19. Lau GKK, Davis GL, Wu SPC, Gish RG, Balart LA, Lau JYN. Hepatic expression of hepatitis C virus RNA in chronic hepatitis C: a study by in situ reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology*, 23: 1318 – 1323, 1996.
20. Ravaggi A, Natoli G, Primi D, Albertini A, Levrero M, Cariani E. Intracellular localization of full-length and truncated hepatitis C virus core protein expressed in mammalian cells. *J Hepatol*, 20: 833 – 836, 1994.
21. Sakamuro D, Furukawa T, Takenagi TJ. – Hepatitis C viral non structural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol*, 69 : 3893 – 3896, 1995.
22. Lisitsyn N, Lisitsina N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259: 946 – 951, 1993.
23. Lisitsyn NA, Lisitsina NM, Dalbagni G et al. Comparative genomic analysis of tumors: detection of DNA losses and amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 151 – 155, 1995.
24. Risinger JI, Terry LA, Boyd J. – Use of representational difference analysis for the identification of mdm2 oncogene amplification in diethylstilbestrol-induced murine uterine adenocarcinomas. *Mol Carcinog*, 11: 13 – 18, 1994.