

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE

CORSO DI DOTTORATO IN METODOLOGIA CLINICA XXVI CICLO

UNA VARIANTE ALLELICA NEL LOCUS DEL GENE DEP  
DOMAIN CONTAINING 5 (DEPDC5) SI ASSOCIA A  
FIBROSI EPATICA AVANZATA IN SOGGETTI CON  
INFEZIONE CRONICA DA HCV

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE MED 09

Dr.ssa BENEDETTA MARIA MOTTA

TUTOR

Dott. LUCA VITTORIO CARLO VALENTI

COORDINATORE

Chia.mo Prof. MARCO CATTANEO

A.A. 2012-2013

## Sommario

<b>RIASSUNTO</b> .....	4
<b>INTRODUZIONE</b> .....	7
<b>EPATOCARCINOMA</b> .....	8
DISTRIBUZIONE.....	8
RAZZA/ETNIA .....	8
SESSO.....	9
ETÀ.....	9
FATTORI DI RISCHIO DI EPATOCARCINOMA.....	9
HBV .....	10
HCV .....	10
VIRUS DELL'EPATITE C .....	11
ALCOL .....	12
EREDITARIETA' IN HCC.....	13
<i>DEPDC5</i> .....	13
FUNZIONE .....	13
GENE.....	14
STRUTTURA .....	14
DOMINI.....	14
<i>MICA</i> .....	15
FUNZIONE .....	15
GENE.....	15
STRUTTURA .....	16
<b>BACKGROUND E SCOPO</b> .....	17
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	19
SOGGETTI .....	20
COORTE DI VALIDAZIONE .....	20
ANALISI GENETICA.....	21
ANALISI STATISTICA.....	21
<b>RISULTATI</b> .....	22
DISTRIBUZIONE DELLA VARIANTE rs1012068 DI DEPDC5 .....	23
ANALISI DELL'ASSOCIAZIONE DELLA VARIANTE rs1012068 CON HCC .....	23
ANALISI DELL'ASSOCIAZIONE DELLA VARIANTE rs1012068 CON CIRROSI .....	24

ANALISI DELL'ASSOCIAZIONE DELLA VARIANTE rs1012068 CON FIBROSI NELLA COORTE DI VALIDAZIONE.....	25
DISTRIBUZIONE DELLA VARIANTE rs2596542 DI <i>MICA</i> .....	28
<b>DISCUSSIONE</b> .....	30
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	33

# RIASSUNTO

## BACKGROUND E SCOPO

L'epatocarcinoma (HCC) rappresenta la terza causa di mortalità per tumore. Il principale fattore di rischio è determinato dalla presenza di malattia epatica avanzata, in particolare legata ad infezioni virali croniche, tra cui HCV predomina nel bacino mediterraneo. Esistono forti differenze di suscettibilità individuale legata a fattori genetici.

Due studi di associazione genome-wide (GWAS) hanno identificato un'associazione tra i geni DEP domain containing 5 (DEPDC5) e MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) e epatocarcinoma (HCC) in soggetti asiatici con infezione cronica da virus dell'epatite C (CHC). Dato che il background genetico varia tra soggetti di differente origine etnica, e che il dato non è ancora stato replicato indipendentemente, lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare l'effetto dei polimorfismi rs2596542 di MICA e rs1012068 di DEPDC5 sul rischio di HCC e fibrosi epatica in una casistica di soggetti di origine europea con infezione cronica da HCV.

## METODI

Le varianti genetiche (polimorfismi rs2596542 di MICA e rs1012068 di DEPDC5) sono state genotipizzate in una coorte italiana di individui con CHC: soggetti con epatocarcinoma (n=149), controlli con cirrosi senza epatocarcinoma (controllo per predisposizione alla cancerogenesi epatica; n=145), e controlli con CHC senza fibrosi significativa (controlli per predisposizione alla fibrogenesi; n=169). Le associazioni significative sono state in seguito validate in una casistica indipendente tedesca, che presentava uno spettro completo di malattia epatica (n=299): soggetti con epatocarcinoma (n=67), controlli con fibrosi significativa (n=144), e controlli senza fibrosi significativa (n=88).

## RISULTATI

Nella casistica italiana, le varianti di MICA o DEPDC5 non sono risultate associate ad HCC. Tuttavia, è stato osservato un aumentato rischio di cirrosi epatica nel gruppo di soggetti

portatori dell'allele G della variante rs1012068 di DEPDC5 nella coorte italiana (OR=1.46; 95% CI=1.04-2.04; p=0.027), e l'associazione con fibrosi avanzata è stata replicata nella coorte tedesca di validazione (OR=1.57; 95% CI=1.14-2.16; p=0.006).

## CONCLUSIONI

In questo studio, non abbiamo replicato l'associazione tra le varianti rs2596542 di MICA e rs1012068 di DEPDC5 con HCC HCV-correlato in europei. Tuttavia, il polimorfismo rs1012068 è stato identificato come fattore di rischio per fibrosi severa, il principale fattore di rischio per HCC, in individui europei con infezione cronica da HCV.

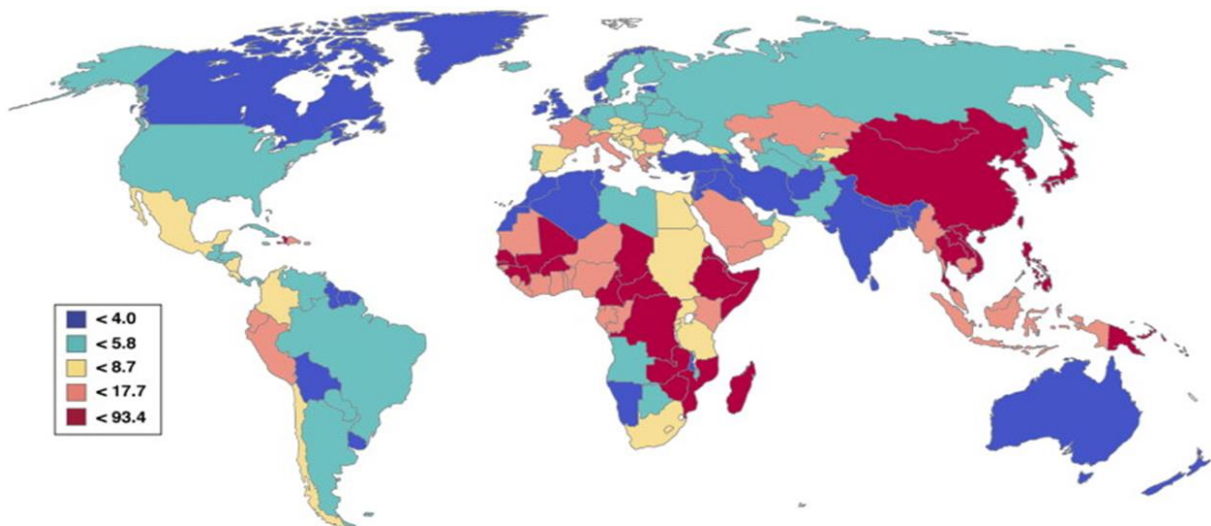
# INTRODUZIONE

## EPATOCARCINOMA

L'epatocarcinoma (HCC) rappresenta il quinto tumore più frequentemente diagnosticato nel mondo e la terza causa di morte cancro-correlata nel mondo [1]. L'HCC ha diverse interessanti caratteristiche epidemiologiche tra cui importanti differenze di distribuzione tra diverse regioni geografiche, gruppi etnici e tra uomini e donne.

### DISTRIBUZIONE

Il carcinoma epatico non è distribuito uniformemente in tutto il mondo (Figura 1).



Hashem B. El-Serag, K. Lenhard Rudolph  
Gastroenterology, Volume 132, Issue 7, 2007, 2557 - 2576

Figura 1 Variazione della mortalità da HCC nel mondo. Tassi per 100000 persone

### RAZZA/ETNIA

I tassi di incidenza di HCC variano notevolmente tra le diverse popolazioni che vivono nella stessa regione [2]. La ragione di questa variabilità etnica probabilmente comprende differenze nella prevalenza e nel momento di esposizione ai principali fattori di rischio di malattia epatica e carcinoma epatocellulare, come virus dell'epatite e agenti patogeni



ambientali. Ad esempio, la frequenza di portatori del virus dell'epatite B è relativamente elevata nelle regioni ad alta incidenza e bassa nelle regioni a bassa incidenza.

## SESSO

In quasi tutte le popolazioni, gli uomini presentano un tasso di epatocarcinoma più elevato rispetto alle donne, con un rapporto medio uomo:donna tra 2:1 e 4:1. Attualmente, le maggiori differenze nei tassi si trovano nelle popolazioni europee a medio rischio. I rapporti riportati da Ginevra, Svizzera (4.1:1) e Varese, Italia (5.1:1) [3].

## ETÀ

La distribuzione globale per età di HCC varia da regione a regione, per tasso di incidenza, sesso, e, probabilmente, per eziologia [2]. In tutti i gruppi il picco di incidenza nella popolazione femminile si ha in una fascia di età 5 anni superiore a quella del picco nella popolazione maschile.

## FATTORI DI RISCHIO DI EPATOCARCINOMA

L'epatocarcinoma si sviluppa in larga misura all'interno di un definito background di malattia epatica cronica e cirrosi (~ 70% -90% di tutti i casi di HCC rilevati) [4-6]. Le principali cause di cirrosi nei pazienti con HCC includono l'epatite B, l'epatite C, malattia epatica alcolica, e steatoepatite non alcolica, ed esposizione alimentare ad alcune tossine (aflatossina). Cause meno comuni includono l'epatite autoimmune, ed alcune epatopatie ereditarie a trasmissione mendeliana tra cui l'emocromatosi ereditaria, il deficit di  $\alpha$ -1 antitripsina, e alcune porfirie.

## HBV

A livello mondiale, ma in particolare in Asia e nell'Africa sub-Sahariana, HBV è la causa più frequente di epatocarcinoma. Studi caso-controllo hanno dimostrato che i portatori cronici di HBV hanno un rischio 5 - 15 volte aumentato di sviluppare carcinoma epatocellulare rispetto alla popolazione generale.

E' stato dimostrato che diversi fattori aumentano il rischio di HCC tra i portatori di HBV, compreso il sesso maschile, l'età avanzata (o più lunga durata di infezione); la razza asiatica o africana (anche se questo potrebbe in realtà dipendere dalla diversa distribuzione dei genotipi di HBV nei differenti gruppi etnici), la cirrosi, una storia familiare di carcinoma epatocellulare, l'esposizione a aflatossina, alcool o tabacco, o la co-infezione da HCV o virus dell'epatite D (HDV).

Il rischio di HCC è aumentato anche nei pazienti con livelli più elevati di replicazione dell'HBV, indicato dalla presenza di epatite B (HBeAg) e alti livelli di HBV-DNA. Inoltre, è stato suggerito in studi asiatici che il genotipo C è associato a malattia epatica più grave rispetto al genotipo B [7].

## HCV

L'infezione cronica da HCV è un fattore di rischio per lo sviluppo di HCC, il secondo dopo HBV, ed il primo nel bacino del Mediterraneo ed in Giappone. In Italia, markers di infezione da HCV sono presenti nel 44-66 % dei pazienti con carcinoma epatocellulare [8]. In una meta-analisi di 21 studi caso-controllo del rischio di HCC è stato aumentato di 17 volte nei pazienti con infezione da HCV rispetto ai controlli HCV-negativi (95% CI, 14-22) [9].

HCV aumenta il rischio di HCC promuovendo la fibrosi ed infine la cirrosi (in questo caso la relazione tra sviluppo di cirrosi e rischio di HCC è molto più stretta che nell'infezione da HBV). Una volta che si è sviluppata la cirrosi HCV-correlata, l'epatocarcinoma si sviluppa con una frequenza annua dell'1-4%. La frequenza di cirrosi 25-30 anni dopo l'infezione varia tra il 15% e il 35% [10].

Nei pazienti con infezione da HCV, i fattori dell'ospite e i fattori ambiente sembrano essere più importanti dei fattori virali nel determinare la progressione alla cirrosi. Questi includono l'età avanzata, l'età più avanzata al momento dell'infezione, il sesso maschile, l'assunzione di alcol (> 50 g / die), il diabete, l'obesità, il genotipo virale (G3 a rischio maggiore e G2 a rischio minore rispetto a G1) la steatosi (mediatore comune di danno di diversi fattori precedentemente elencati), e la co-infezione con il virus dell'immunodeficienza umana o con HBV [11, 12].

## VIRUS DELL'EPATITE C

L'HCV è stato scoperto nel 1989 [13]: da allora sono state identificate numerose varianti virali (nominate da 1 a 11). I genotipi virali sono diversamente distribuiti nel mondo, con una prevalenza del tipo 1. In particolare la variante 1a è diffusa soprattutto nel Nord America, il genotipo 1b in Europa, il tipo 2 in estremo Oriente (Taiwan), il tipo 3 in Asia centrale (soprattutto in India), quello 4 in Medio Oriente e in Africa, il genotipo 5 in Africa meridionale e il 6 in Asia sudorientale [14].

In Italia il genotipo prevalente è l'1 che infetta il 51% dei soggetti con HCV (1b circa 65-70% dei casi), mentre il restante è suddiviso tra genotipo 2 (28%), 3 (9%) e 4 (4%).

## EZIOLOGIA

L'agente eziologico dell'epatite C è l'hepatitis C virus (HCV), un virus dotato di un pericapside prevalentemente lipidico e di un capsido icosaedrico contenente una doppia molecola di RNA [15]. HCV appartiene al genere hepacivirus nella famiglia Flaviviridae.

## INFEZIONE

### Infezione acuta

L'infezione da epatite C provoca sintomi acuti nel 15% dei casi [16]. La maggior parte dei casi di infezione acuta è accompagnata da ittero. L'infezione si risolve spontaneamente nel 10-50% dei casi e più frequentemente in individui giovani e di sesso femminile.

### Infezione cronica

Circa l'80% delle persone esposte al virus sviluppano un'infezione cronica. A distanza di anni, l'epatite C cronica può portare allo sviluppo di cirrosi epatica e cancro al fegato [15]. Coloro che sviluppano cirrosi hanno un rischio 20 volte maggiore di carcinoma epatocellulare [15, 17, 18] e se questi soggetti sono anche forti consumatori di alcool, il rischio diventa maggiore [19]. L'epatite C è causa, in tutto il mondo, del 27% dei casi di cirrosi epatica e del 25% dei casi di carcinoma epatocellulare [20].

La cirrosi epatica può condurre a ipertensione portale, ascite, ecchimosi o sanguinamento, varici, ittero, e una sindrome da deficit cognitivo conosciuta come encefalopatia epatica; una condizione che può richiedere il trapianto di fegato [21].

## ALCOL

L'abuso di alcol, definito come l'ingestione di più di 50-70 g/die per periodi prolungati, è un fattore di rischio per HCC ben noto. L'assunzione pesante è anche fortemente associata allo sviluppo della cirrosi.

E' stato osservato un effetto sinergico tra l'abuso di alcol e l'infezione da HCV o HBV nel determinare un aumentato rischio di HCC, promuovendo più attivamente la cirrosi [22].

Infatti, è stato riportato che tra i bevitori di alcol, il rischio di HCC è aumentato in maniera lineare con l'assunzione giornaliera di più di 60 g. Tuttavia, con la concomitante presenza di

infezione da HCV, vi è un ulteriore aumento di 2 volte del rischio HCC oltre quella osservato con il solo abuso di alcol [9].

In alcuni studi è stato evidenziato che i soggetti alcolisti in presenza di cirrosi hanno un rischio di HCC di circa 10 volte maggiore rispetto ai soggetti alcolisti senza cirrosi, il che suggerisce che l'alcol favorisca lo sviluppo della cirrosi, che a sua volta predispone allo sviluppo di HCC [23].

### EREDITARIETA' IN HCC

Un ampio studio (500 pazienti con cirrosi e 500 controlli con malattia non epatica) ha evidenziato un significativo aumento nella prevalenza di cirrosi tra i parenti di primo grado di pazienti con cirrosi per lo più HCV-correlata (odds ratio=17, 95% CI 4,2-12,9) [24].

Inoltre, sono stati riportati numerosi gruppi familiari di HCC; queste famiglie spesso mostrano anche un clustering di portatori di epatite B. Tuttavia, due analisi hanno dimostrato una suscettibilità genetica all'epatocarcinoma, pur tenendo conto dell'infezione da HBV [25, 26].

### DEPDC5

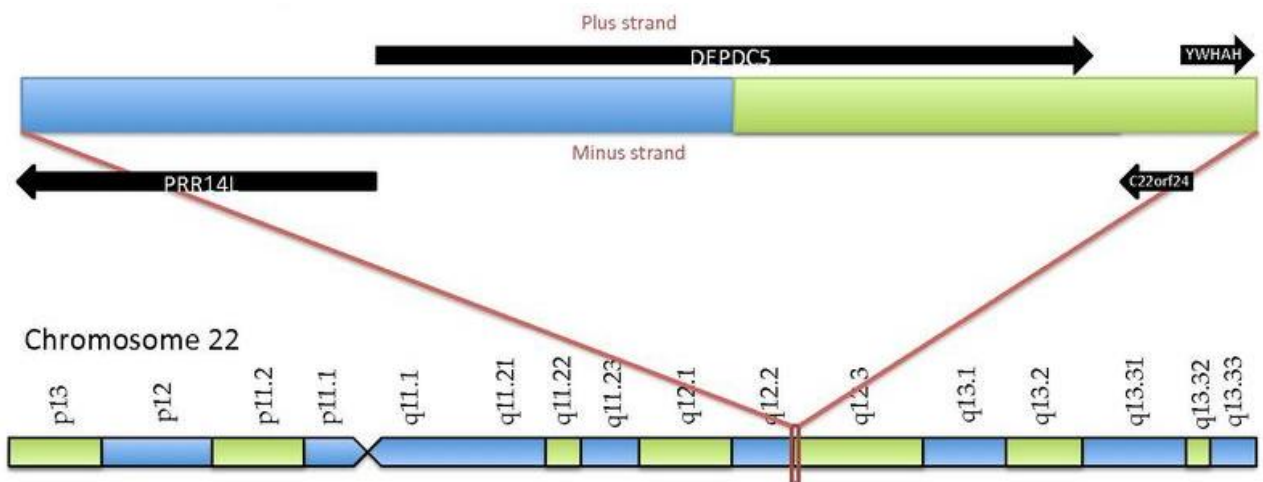
DEPDC5 (DEP domain-containing 5) è una proteina umana codificata dall'omonimo gene, localizzato sul cromosoma 22. *DEPDC5* codifica una proteina di 1604 amminoacidi, la cui funzione è ancora sconosciuta.

### FUNZIONE

La funzione di DEPDC5 non è ancora nota, ma si ritiene sia implicata nella trasduzione del segnale intracellulare basandosi sull'omologia tra i domini DEP di *DEPDC5* e *Dishevelled-1* (*DVL1*), quest'ultimo coinvolto nella localizzazione della proteina sulla membrana plasmatica.

## GENE

Nell'uomo, il gene *DEPDC5* è stato localizzato sul braccio lungo del cromosoma 22, 22q12.2-q12.3.



## STRUTTURA

### DOMINI

#### *DEP*

Il dominio DEP deriva il suo nome dalle proteine Dishevelled, Egl-10 e Pleckstrin, ognuna delle quali contiene una variante di questo dominio. Si estende per 82 residui amminoacidici e si trova a 343 aminoacidi dal C-terminale.

Il dominio DEP di *DEPDC5* ha la più alta somiglianza strutturale al dominio DEP di *DVL1*, che è coinvolto nella localizzazione della proteina sulla membrana plasmatica come parte della via di segnalazione di Wnt [27].

### DUF 3608

Il dominio DUF 3608 ha origine a 99 amminoacidi dal N-terminale ed è una sequenza di 280 amminoacidi. Contiene 26 residui altamente conservati e siti di modifiche post-traduzionali.

Nel lievito *Iml1p* è stato scoperto un dominio DUF 3608 che si pensa sia coinvolto nel legame di due partner proteici, *Npr2* e *Npr3* [28].



### MICA

MHC class I polypeptide-related sequence A è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene *MICA* [29].

### FUNZIONE

La proteina prodotta è espressa sulla superficie cellulare, anche se a differenza delle canoniche molecole di classe I non sembra associarsi a beta-2-microglobulina. Si pensa che MICA funzioni come un antigene indotto da stress che viene riconosciuto dalle cellule NK, le cellule NKT, e la maggior parte dei sottotipi di cellule T. Inoltre MICA è un ligando del recettore per l'attivazione delle cellule NK, NKG2D [30].

### GENE

Nell'uomo, il gene *MICA* si trova sul braccio corto del cromosoma 6 in posizione 6p21.33.

## STRUTTURA

Le molecole MHC di classe I sono costituite da due catene polipeptidiche,  $\alpha$  e  $\beta$ 2-microglobulina. Le due catene sono legati in modo non covalentemente. I domini  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 si piegano per creare una tasca per i peptidi da legare, mentre il dominio  $\alpha$ 3 è transmembrana e interagisce con il co-recettore CD8 delle cellule T.



# BACKGROUND E SCOPO

Recentemente, due indipendenti studi di genome-wide association (GWAS) hanno individuato un'associazione tra i loci di *DEPDC5* e *MICA* e il carcinoma epatocellulare in soggetti asiatici con infezione cronica da epatite C (CHC) [31, 32]. Il genome-wide association è un approccio genetico per identificare varianti genetiche di singolo nucleotide (SNP) associate con tratti o malattie complesse [33, 34].

Nel precedente studio di Kumar, il GWAS è stato effettuato su una popolazione di origine giapponese con tumore epatocellulare dovuto a HCV e un gruppo di controllo HCV-negativo. L'allele mutato A dello SNP rs2596542 di *MICA* è risultato associato alla presenza di HCC correlato ad HCV (OR=1.39). In particolare, il polimorfismo risulterebbe associato alla progressione da CHC a HCC.

Nello studio di Miki effettuato su una casistica di individui giapponesi suddivisi in due gruppi: soggetti con infezione cronica da HCV e HCC e individui con CHC ma non HCC, è stato osservato che l'allele mutato G dello SNP rs1012068 del gene *DEPDC5* correla con la progressione di HCC (OR=1.75).

Dal momento che la struttura genetica varia tra individui di diverse etnie, l'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto delle varianti rs1012068 del gene *DEPDC5* e rs2596542 del gene *MICA* su HCC e rischio di fibrosi negli europei con CHC.

# MATERIALI E METODI

## SOGGETTI

Per questo lavoro sono stati presi in considerazione 477 soggetti con infezione cronica da virus dell'epatite C sottoposti a trattamento presso la Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, di cui 149 con HCC e 328 senza, inclusi in due studi precedenti [35, 36]. In particolare, tra i 477 soggetti, n=300 presentavano cirrosi epatica (F4) mentre 177 non avevano sviluppato una fibrosi significativa (F0/1).

## COORTE DI VALIDAZIONE

Come coorte di validazione è stata considerata un gruppo indipendente di 299 individui consecutivi con uno spettro completo di malattia epatica, provenienti da Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, di Lipsia in Germania.

Nella tabella 1 sono riportate le caratteristiche dei soggetti appartenenti alle due casistiche.

	Milano	Lipsia
Età	62.8 ± 11.7	58.6 ± 9.8
Sesso (M)	308 (66.5%)	352 (62.5%)
Diabete	70 (15%)	-
Fibrosi	294 (63.5%)	255 (41.5%)
F0-1	177 (37%)	88 (38%)
F3-4	300 (63%)	144 (62%)
HCC	149 (31%)	67 (22%)

Tabella 1 Caratteristiche individui inclusi nello studio

## ANALISI GENETICA

Il DNA è stato estratto dai campioni di sangue intero mediante il metodo fenolo-cloroformio.

Le varianti genetiche rs1012068 di *DEPDC5* e rs2596542 di *MICA* sono state genotipizzate mediante sonde TaqMan® assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La genotipizzazione è stata effettuata mediante CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, California, USA) presso il Wallenberg Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, di Göteborg in Svezia.

Sono stati genotipizzati con successo il 97% dei soggetti della casistica di Milano e il 98% degli individui della coorte di validazione di Lipsia. In entrambi i casi i genotipi si distribuiscono in equilibrio Hardy Weinberg.

## ANALISI STATISTICA

Variabili continue sono state descritte come medie  $\pm$  deviazioni standard o mediana e range interquartile. Le variabili categoriche sono state mostrate come frequenze.

Per valutare l'associazione tra i polimorfismi rs1012068 di *DEPDC5* e rs2596542 di *MICA* e HCC, abbiamo utilizzato il test esatto di Fischer, un test per varianti non parametriche.

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il sistema IBM Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS, version 19.0, Inc. Chicago, IL, USA). Valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

# RISULTATI

## DISTRIBUZIONE DELLA VARIANTE rs1012068 DI DEPDC5

Lo SNP intronico rs1012068 (T>G) del gene *DEPDC5* è stato genotipizzato nella coorte di Milano con una success rate del 97%. La frequenza dell'allele minore (MAF) è 25%, paragonabile a quella riportata nella popolazione europea del 27%; inoltre, la distribuzione dei genotipi non violava lo Hardy Weinberg Equilibrium (HWE). Nella coorte di validazione di Lipsia lo SNP è stato genotipizzato nel 98% degli individui con una MAF del 26%. Anche nella popolazione di Lipsia la distribuzione genotipica è in HWE.

Nella tabella 2 sono riportate la distribuzione genotipica e la distribuzione allelica nei soggetti analizzati.

	Milano	Lipsia	P-value°
TT	261 (56%)	346 (56%)	0.943
TG	170 (37%)	231 (37%)	
GG	32 (7%)	46 (7%)	
T	692 (75%)	923 (74%)	0.760
G	234 (25%)	323 (26%)	

°calcolato con Fisher's exact test

Tabella 2 Distribuzione rs1012068

## ANALISI DELL'ASSOCIAZIONE DELLA VARIANTE rs1012068 CON HCC

Per prima cosa, abbiamo analizzato se la variante rs1012068 del gene *DEPDC5* si associasse allo sviluppo di HCC nella coorte di individui con infezione cronica da HCV di Milano.

Abbiamo suddiviso i soggetti in due gruppi definiti "Non HCC" che comprende gli individui cirrotici e "HCC" che comprende tutti i pazienti affetti da epatocarcinoma.

Nel nostro studio non abbiamo osservato alcuna associazione dell'allele mutato G con l'epatocarcinoma, come mostrato nella tabella 3.

	Non HCC	HCC	P-value°
TT	175 (56%)	86 (58%)	0.685
TG	115 (37%)	55 (37%)	
GG	24 (8%)	8 (5%)	

°calcolato con Fisher's exact test (tabella di contingenza 2x3)

Tabella 3 Distribuzione rs1012068 in Non HCC vs. HCC

## ANALISI DELL'ASSOCIAZIONE DELLA VARIANTE rs1012068 CON CIRROSI

Abbiamo quindi analizzato l'associazione dello SNP rs1012068 di *DEPDC5* con la presenza di cirrosi nella stessa casistica di pazienti.

I soggetti sono stati suddivisi in due gruppi in base al grado di fibrosi. Nel gruppo "Non Fibrosi significativa" sono inclusi tutti i soggetti con uno score di fibrosi F0-F1, mentre nel gruppo "Fibrosi Severa" rientrano i pazienti con cirrosi (F4). Fanno parte di quest'ultimo gruppo anche i pazienti con HCC con cirrosi.

Come mostrato nella tabella 4, vi è una significativa differenza ( $p < 0.05$ ) nella distribuzione genotipica dello SNP nei due sottogruppi di soggetti analizzati.

	Non fibrosi	Fibrosi severa	P-value°
TT	107 (63%)	154 (52%)	0.049
TG	50 (30%)	120 (41%)	
GG	12 (7%)	20 (7%)	

°calcolato con Fisher's exact test (tabella di contingenza 2x3)

Tabella 4 Distribuzione rs1012068 in Non Fibrosi vs. Fibrosi Severa in Milano



Visto lo scarso numero di soggetti omozigoti per la variante mutata, abbiamo in seguito valutato con un modello dominante il rischio di sviluppare fibrosi severa associato alla presenza di almeno un allele mutato.

L'allele mutato G risulta significativamente associato ad un aumentato rischio di sviluppare cirrosi come mostrato nella tabella 5, dopo aggiustamento per età e sesso.

	OR	95 % C.I.		P-value
		Lower	Upper	
Età	1.07	1.05	1.09	<0.001
Sesso (M)	1.51	0.96	2.37	0.072
DEPDC5 G allele (adj)	1.46	1.04	2.04	0.027

Tabella 5 OR rs1012068 in Milano

## ANALISI DELL'ASSOCIAZIONE DELLA VARIANTE rs1012068 CON FIBROSI NELLA COORTE DI VALIDAZIONE

A questo punto, abbiamo voluto confermare l'associazione trovata nella coorte di validazione indipendente di Lipsia. Pertanto i soggetti sono stati anche in questo caso suddivisi in due gruppi in base alla presenza o meno di fibrosi significativa (F2-4 vs. F0-1). Lo score di fibrosi era disponibile solo in 212 degli individui genotipizzati per *DEPDC5*.

Come mostrato nella tabella 6, anche nella casistica di Lipsia lo SNP rs1012068 si associa in maniera significativa allo sviluppo di fibrosi significativa.

	Fibrosi F0-F1	Fibrosi F2-4	P-value°
TT	52 (59%)	69 (48%)	0.018
TG	34 (397%)	58 (40%)	
GG	2 (2%)	17 (12%)	

° calcolato con Fisher's exact test (tabella di contingenza 2x3)

Tabella 6 Distribuzione rs1012068 in F0-F1 vs. F2-F4 in Lipsia

Dato che nell'analisi effettuata nella casistica di Milano abbiamo considerato soggetti con cirrosi, abbiamo deciso di escludere dall'analisi effettuata nel gruppo di validazione di Lipsia i soggetti con uno score di fibrosi F2 (N=7).

La variante mutata dello SNP rs1012068 del locus genico di *DEPDC5* risulta anche in questo caso significativamente associato ai gradi più severi di fibrosi, come si può osservare nella tabella 7.

	Fibrosi F0-F1	Fibrosi F3-4	P-value°
TT	52 (59%)	61 (50%)	0.015
TG	149 (36%)	46 (37%)	
GG	2 (2%)	16 (13%)	

° calcolato con Fisher's exact test (tabella di contingenza 2x3)

Tabella 7 Distribuzione rs1012068 in F0-F1 vs. F3-F4 in Lipsia

Allo stesso modo in cui abbiamo analizzato il rischio di sviluppo di fibrosi nei soggetti della casistica di Milano, visto lo scarso numero di individui omozigoti mutati anche nella coorte di Lipsia, abbiamo analizzato i genotipi con un modello dominante.

L'allele mutato G risulta significativamente associato ad un aumentato rischio di sviluppare fibrosi significativa come mostrato nelle tabelle 8 e 9 sia se si considerano i sottogruppi F0-F1 vs. F2-F4, sia se si considerano i gruppi F0-F1 vs. F3-F4.

	OR	95 % C.I.		P-value
		Lower	Upper	
Età	0.94	0.93	0.96	<0.001
Sesso (M)	0.78	0.52	1.17	0.230
DEPDC5 G allele (adj)	1.60	1.18	2.17	0.003

Tabella 8 OR rs1012068 F0-F1 vs. F2-F4 in Lipsia

	OR	95 % C.I.		P-value
		Lower	Upper	
Età	0.95	0.93	0.97	<0.001
Sesso (M)	0.82	0.53	1.26	0.355
DEPDC5 G allele (adj)	1.57	1.14	2.16	0.006

Tabella 9 OR rs1012068 F0-F1 vs. F3-F4 in Lipsia

Unendo le due casistiche si osserva un OR di 1.47, che conferma l'osservazione di un aumentato rischio di sviluppare fibrosi significativa nei soggetti con infezione cronica da HCV, che abbiamo precedentemente osservato nelle due distinte coorti.

	OR	95 % C.I.		P-value
		Lower	Upper	
Età	1.06	1.04	1.07	<0.001
Sesso (M)	1.01	0.72	1.42	0.96
DEPDC5 G allele (adj)	1.47	1.12	1.92	0.005

Tabella 10 OR rs1012068 F0-F1 vs. F3-F4 in entrambe le coorti

## DISTRIBUZIONE DELLA VARIANTE rs2596542 DI *MICA*

Lo SNP rs2596542 (C>T) del gene *MICA* è stato genotipizzato nella casistica di Milano con una success rate del 95%. Inoltre, la distribuzione dei genotipi è in Hardy Weinberg Equilibrium (HWE).

Nella tabella seguente sono riportate la distribuzione genotipica e la distribuzione allelica nei soggetti analizzati.

Milano		P-value°
CC	129 (28%)	0.622
CT	213 (47%)	
TT	32 (25%)	
C	471 (52%)	0.860
T	435 (48%)	

Tabella 11 Distribuzione rs2596542

Nei soggetti analizzati non abbiamo trovato alcuna associazione dell'allele mutato con HCC, come mostrato nella tabella 12.

	No HCC	HCC	P-value°
CC	42 (29%)	36 (25%)	0.325
CT	75 (53%)	70 (50%)	
TT	26 (18%)	36 (25%)	

°calcolato con Fisher's exact test (tabella di contingenza 2x3)

Tabella 12 Distribuzione rs2596542 in Non Fibrosi vs. Fibrosi Severa in Milano

L'allele mutato T non é risultato associato nemmeno con una significativa fibrosi nella casistica di soggetti con CHC di Milano.

	Non fibrosi	Fibrosi severa	P-value°
CC	51 (30%)	78 (27%)	0.325
CT	68 (41%)	145 (51%)	
TT	49 (29%)	62 (22%)	

°calcolato con Fisher's exact test (tabella di contingenza 2x3)

Tabella 13 Distribuzione rs2596542 in No HCC vs. HCC in Milano

	OR	95 % C.I.		P-value
		Lower	Upper	
Età	1.07	1.05	1.09	<0.001
Sesso (M)	1.49	0.95	2.34	0.083
MICA C allele (adj)	0.89	0.67	1.18	0.407

Tabella 5 OR rs1012068 in Milano

# DISCUSSIONE

La ricerca nel campo dell'HCV è focalizzata principalmente sulla comprensione della suscettibilità e della progressione della malattia epatica e sullo sviluppo di nuovi trattamenti e strategie di gestione del paziente e attualmente nel determinare il rischio di HCC che rimane elevato anche nei soggetti guariti che avevano precedentemente sviluppato fibrosi avanzata. In uno studio GWAS su HCC HCV-correlato è stato identificato un aumentato rischio di HCC in presenza della variante rs2596542 nel locus genico di *MICA* [32]. In realtà è stato suggerito che l'allele di rischio di *MICA* sia responsabile della progressione verso la cirrosi, che eventualmente contribuisce allo sviluppo di epatocarcinoma [37]. Un secondo GWAS su HCC HCV-correlato condotto su popolazione giapponese ha identificato nello SNP rs1012068 di *DEPDC5* un possibile fattore di rischio per lo sviluppo di HCC [31].

Sebbene il meccanismo molecolare con cui questi due SNPs correlano con la progressione del tumore epatocellulare sia poco chiaro, polimorfismi di *MICA* sono stati descritti influenzare l'immunità antitumorale [38] e polimorfismi nel locus di *DEPDC5* sono riportati associarsi con altri tipi di tumore, con o senza infezione da HCV [39].

Non è, tuttavia, ancora chiaro se i loci di suscettibilità all'interno di *MICA* e *DEPDC5* siano associati con tumore epatocellulare HCV-correlato in altri gruppi etnici, dato che entrambi gli studi pubblicati sono stati condotti in coorti giapponesi. Inoltre uno studio di sopravvivenza libera da recidive in soggetti giapponesi con infezione da HCV che sono stati sottoposti a resezione epatica ha dimostrato che i polimorfismi di *MICA* o *DEPDC5* non correlano con la recidiva di HCC [40].

Pertanto in questo studio abbiamo valutato se in pazienti europei affetti da infezione cronica da HCV, la presenza delle varianti alleliche mutate degli SNPs rs2596542 e rs1012068, rispettivamente identificati nei loci genici di *MICA* e *DEPDC5*, si associa ad un aumentato rischio di sviluppare epatocarcinoma.

In realtà, nella casistica di pazienti che sono stati analizzati nel nostro studio, non è stata osservata alcuna correlazione tra gli SNPs e la suscettibilità allo sviluppo di epatocarcinoma.

La mancata replicazione dell'associazione tra i polimorfismi analizzati di *MICA* e *DEPDC5* e l'epatocarcinoma può essere in parte spiegato dalla diversa selezione del gruppo dei controlli

così come dalla diversa origine etnica delle popolazioni prese in esame. Infatti negli studi pubblicati i controlli utilizzati erano soggetti con epatiti croniche, ma non cirrosi.

E' interessante però osservare che nel nostro studio abbiamo evidenziato un aumentato rischio di sviluppare fibrosi severa nei portatori dell'allele mutato G di *DEPDC5* con un odds ratio di 1.46. Questo dato è stato ulteriormente confermato in una coorte di validazione indipendente dove abbiamo osservato un odds ratio di 1.57. In questo lavoro, abbiamo valutato il rischio di sviluppare epatocarcinoma utilizzando controlli con cirrosi che non avessero sviluppato HCC, a differenza del precedente studio condotto su soggetti di origine asiatica che includeva come controlli soggetti con infezione cronica indipendentemente dalla presenza di cirrosi [31].

Questo risultato suggerisce che il polimorfismo rs1012068 di *DEPDC5* possa influenzare la suscettibilità allo sviluppo di fibrosi di grado severo, che a sua volta può contribuire secondariamente allo sviluppo di epatocarcinoma.

In conclusione, né il polimorfismo genetico rs2596542 di *MICA* né il polimorfismo rs1012068 di *DEPDC5* sembrano essere un fattore di rischio specifico per lo sviluppo di HCC nella popolazione di origine europea.

Tuttavia, in presenza di infezione cronica da HCV, i pazienti che presentano almeno un allele mutato G di *DEPDC5* sono risultati più suscettibili allo sviluppo di fibrosi significativa rispetto ai soggetti con un genotipo wild-type.



# BIBLIOGRAFIA

1. Parkin, D.M., *Global cancer statistics in the year 2000*. Lancet Oncol, 2001. **2**(9): p. 533-43.
2. *Cancer incidence in five continents. Volume VIII*. IARC Sci Publ, 2002(155): p. 1-781.
3. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
4. Fattovich, G., et al., *Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. The EUROHEP Study Group on Hepatitis B Virus and Cirrhosis*. Hepatology, 1995. **21**(1): p. 77-82.
5. Hu, K.Q. and M.J. Tong, *The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States*. Hepatology, 1999. **29**(4): p. 1311-6.
6. Serfaty, L., et al., *Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis*. Hepatology, 1998. **27**(5): p. 1435-40.
7. Kao, J.H., et al., *Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(4): p. 1207-9.
8. Yoshizawa, H., *Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future*. Oncology, 2002. **62 Suppl 1**: p. 8-17.
9. Donato, F., et al., *Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women*. Am J Epidemiol, 2002. **155**(4): p. 323-31.
10. Freeman, A.J., et al., *Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2001. **34**(4 Pt 1): p. 809-16.
11. Cramp, M.E., *Hbv + Hcv = Hcc?* Gut, 1999. **45**(2): p. 168-9.
12. Marabita, F., et al., *Genetic variation in the interleukin-28B gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection*. Hepatology, 2011. **54**(4): p. 1127-34.
13. Houghton, M., *The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus*. J Hepatol, 2009. **51**(5): p. 939-48.
14. Stuyver, L., et al., *Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of five additional subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 10134-8.
15. Rosen, H.R., *Clinical practice. Chronic hepatitis C infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(25): p. 2429-38.
16. Maheshwari, A., S. Ray, and P.J. Thuluvath, *Acute hepatitis C*. Lancet, 2008. **372**(9635): p. 321-32.
17. Hu, Z., et al., *Long-term lack of endogenous glucocorticoids down-regulates glucocorticoid receptor levels in the rat forebrain*. Neuroscience, 1999. **90**(4): p. 1185-95.
18. Wilkins, T., et al., *Hepatitis C: diagnosis and treatment*. Am Fam Physician, 2010. **81**(11): p. 1351-7.
19. Mueller, S., G. Millonig, and H.K. Seitz, *Alcoholic liver disease and hepatitis C: a frequently underestimated combination*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(28): p. 3462-71.
20. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2436-41.
21. Ozaras, R. and V. Tahan, *Acute hepatitis C: prevention and treatment*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009. **7**(3): p. 351-61.
22. Donato, F., et al., *Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence*. Oncogene, 2006. **25**(27): p. 3756-70.
23. Morgan, T.R., S. Mandayam, and M.M. Jamal, *Alcohol and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S87-96.
24. Pagliaro, L., et al., *Familial clustering of (mostly) HCV-related cirrhosis. A case-control study*. J Hepatol, 2002. **37**(6): p. 762-6.

25. Yu, M.W., et al., *Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(14): p. 1159-64.
26. Yu, M.W., et al., *Increased risk for hepatitis B-related liver cirrhosis in relatives of patients with hepatocellular carcinoma in northern Taiwan*. Int J Epidemiol, 2002. **31**(5): p. 1008-15.
27. Pan, W.J., et al., *Characterization of function of three domains in dishevelled-1: DEP domain is responsible for membrane translocation of dishevelled-1*. Cell Res, 2004. **14**(4): p. 324-30.
28. Wu, X. and B.P. Tu, *Selective regulation of autophagy by the Iml1-Npr2-Npr3 complex in the absence of nitrogen starvation*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(21): p. 4124-33.
29. Bahram, S. and T. Spies, *The MIC gene family*. Res Immunol, 1996. **147**(5): p. 328-33.
30. Gonzalez, S., et al., *NKG2D ligands: key targets of the immune response*. Trends Immunol, 2008. **29**(8): p. 397-403.
31. Miki, D., et al., *Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers*. Nat Genet, 2011. **43**(8): p. 797-800.
32. Kumar, V., et al., *Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma*. Nat Genet, 2011. **43**(5): p. 455-8.
33. Manolio, T.A., *Genomewide association studies and assessment of the risk of disease*. N Engl J Med, 2010. **363**(2): p. 166-76.
34. Dube, J.B. and R.A. Hegele, *Genetics 100 for cardiologists: basics of genome-wide association studies*. Can J Cardiol, 2013. **29**(1): p. 10-7.
35. Valenti, L., et al., *Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 791-9.
36. Valenti, L., et al., *PNPLA3 I148M polymorphism, clinical presentation, and survival in patients with hepatocellular carcinoma*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e75982.
37. Hoshida, Y., B.C. Fuchs, and K.K. Tanabe, *Genomic risk of hepatitis C-related hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2012. **56**(3): p. 729-30.
38. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
39. Harada, Y., et al., *Cell-permeable peptide DEPDC1-ZNF224 interferes with transcriptional repression and oncogenicity in bladder cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5829-39.
40. Motomura, T., et al., *Neither MICA Nor DEPDC5 Genetic Polymorphisms Correlate with Hepatocellular Carcinoma Recurrence following Hepatectomy*. HPB Surg, 2012. **2012**: p. 185496.