



## **Profilo dell'espressione genica associato all'infezione da HPV in biopsie cutanee**

**Responsabile scientifico:** Dr.ssa Krystyna Zakrzewska, Dipartimento di Sanità Pubblica, Sezione di Microbiologia e Virologia, Viale Morgagni 48

### **PREMESSA**

I tumori della pelle rappresentano il 10-15% di tutti i tumori maligni. In alcune aree geografiche però la loro frequenza raggiunge, e talvolta supera, il 50%. I più frequenti tumori maligni della cute sono i carcinomi a cellule basali (BCC) ed i carcinomi a cellule squamose (SCC), anche definiti genericamente "epiteliomi". Tali carcinomi di origine epiteliale vengono anche definiti "Non Melanoma Skin Cancer" (NMSC), per distinguerli dal Melanoma Cutaneo, che deriva invece dai melanociti. La patogenesi dei NMSC non è stata ancora ben stabilita. I maggiori fattori di rischio dell'insorgenza e della progressione di questi tumori sono rappresentati dalle radiazioni UV, specialmente UV-B e da alcune modificazioni genetiche che determinano alterazioni della risposta immune a livello cutaneo come l' Epidermodisplasia Verruciforme (EV) o la psoriasi. Dati sempre più numerosi indicano che una consistente percentuale di questi tumori è associata all'infezione dagli HPV appartenenti al genere beta (beta-HPV), i quali potrebbero rappresentare un potenziale cofattore eziologico dei NMSCs.

L'infezione da papillomavirus appartenenti al genere alfa (alfa-HPV) rappresenta un cofattore indispensabile per l'insorgenza delle lesioni premaligne e maligne della regione ano-genitale. Infatti la presenza degli HPV "ad alto rischio" (HR-HPV), soprattutto degli HPV-16 e -18, è stata individuata nella quasi totalità di questi tumori. Alcuni alfa-HPV sono stati trovati nel 15-35% dei tumori "testa-collo" (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC), soprattutto in quelli tonsillari, nei quali la frequenza dell'infezione raggiunge il 70%-100%. Anche in questo caso il tipo virale più frequentemente riscontrato è l'HPV-16, seguito dall'HPV-18.

Le oncoproteine E6 ed E7 degli alfa-HPV ad alto rischio sono in grado, cooperativamente, di immortalizzare e trasformare un'ampia gamma di colture cellulari primarie. Sono ben definiti i meccanismi molecolari con cui questi virus riescono a modificare il ciclo cellulare e ad interferire



con i processi apoptotici promuovendo la trasformazione maligna. I più noti sono associati alla capacità delle oncoproteine virali E6 ed E7 di neutralizzare l'attività degli oncosoppressori cellulari p53 e pRB e di modificare l'espressione di alcuni geni coinvolti nella senescenza cellulare.

Le oncoproteine degli HPV cutanei presentano una scarsa affinità verso le proteine p53 e pRB e la loro attività trasformante sembra piuttosto associata ad alcuni meccanismi che interferiscono con l'apoptosi cellulare.

Gli studi sulla prevalenza dell'infezione e sulla distribuzione dei tipi virali presenti nei tumori, non hanno fornito finora dati convincenti relativi ad un eventuale ruolo degli beta-HPV nella patogenesi dei tumori cutanei di origine epiteliale nella popolazione generale. Un modo alternativo per studiare un eventuale coinvolgimento dell'infezione nella patogenesi dei tumori cutanei è quello di studiare l'attività biologica dei virus presenti nei tessuti infettati.

L'analisi del profilo di espressione genica nei tumori HNSCC ha rivelato che, nei campioni HPV positivi, più di 90 geni presentano un pattern diverso rispetto a quello osservato nei tumori HPV negativi. Molti di questi geni codificano per le proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi.

Inoltre è ormai chiaramente dimostrato che le oncoproteine E6 ed E7 degli HR-HPV mucosali sono in grado di modificare o l'espressione o l'attività di numerose proteine cellulari coinvolte nel controllo della proliferazione cellulare, dell'apoptosi e della senescenza cellulare. I dati relativi all'interferenza degli HPV cutanei con l'espressione delle proteine cellulari sono ancora molto limitati e derivano prevalentemente dagli studi condotti *in vitro*.

## **SCOPO**

Lo scopo di questo studio è quello di identificare le differenze nel profilo dell'espressione genica dei campioni cutanei HPV positivi ed HPV negativi per capire meglio l'effetto biologico dell'infezione da HPV.

A tale scopo verranno confrontati, mediante RT-PCR quantitativa, i livelli dell'espressione di alcuni geni in biopsie cutanee HPV positive e HPV negative. Nell'analisi saranno inclusi tumori cutanei, campioni della cute perilesionale adiacente al tumore e biopsie prelevate dalla cute sana di pazienti con manifestazioni non tumorali.



## **METODICHE**

Le fasi principali prevedevano (1) la raccolta dei campioni cutanei, (2) la ricerca e la tipizzazione degli HPV nei campioni cutanei, (3) l'analisi del profilo dell'espressione genica nei campioni cutanei.

### **Raccolta dei campioni**

Nello studio verranno incluse biopsie cutanee provenienti da pazienti sottoposti ad interventi chirurgici per carcinomi di origine epiteliale (NMSC), per melanomi e per altre patologie non tumorali (controlli). Nel caso dei pazienti affetti da tumori verranno effettuati due prelievi: una biopsia proveniente dal tumore ed una dalla cute sana perilesionale. I campioni verranno conservati in RNALater RNA Stabilization Reagent a -80°C. Al momento opportuno da ciascun campione saranno estratti acidi nucleici, DNA ed RNA separatamente. La diagnosi del tumore verrà confermata mediante esame istologico.

### **Ricerca e la tipizzazione degli HPV nei campioni cutanei**

Per individuare e tipizzare gli HPV nei campioni cutanei saranno utilizzate 3 differenti metodiche:

1. Una "nested" PCR con primer degenerati (FAP/PCR), localizzati nella regione L1, in grado di individuare 33 principali beta-HPV, seguita da clonaggio e sequenziamento dei prodotti di amplificazione. Le sequenze virali saranno confrontate con le sequenze depositate nella GenBank utilizzando il programma BLAST.
2. Una PCR generica in grado di individuare 25 tipi di beta-HPV, che amplifica una sequenza nella regione E1 del genoma virale, seguita dall'ibridazione dei prodotti di amplificazione con sonde tipo specifiche (Hybrid Reverse Assay, RHA).
3. Un test commerciale (LIPA) in grado di individuare 28 principali tipi mucosali/genitali.

### **Analisi del profilo dell'espressione genica**

L'RNA estratto dalle biopsie raccolte verrà analizzato mediante RT-PCR quantitativa. Per determinare se, e quante volte, l'espressione genica nei campioni infettati dagli HPV fosse superiore o inferiore rispetto all'espressione osservata nel gruppo di campioni HPV negativi i dati ottenuti saranno analizzati con il programma REST-2009 (Relative Expression Software Tool). L'espressione genica sarà normalizzata valutando l'espressione di due geni housekeeping ACTB e HPRT espressi in maniera costitutiva nei tessuti studiati.



*Università degli Studi di Firenze*  
Dipartimento di Sanità Pubblica  
Direttore: prof. Nicola Comodo

Tra i principali geni oggetto del presente studio, verranno inclusi i geni codificanti per le citochine pro-infiammatorie (IL-6), per le proteine coinvolte nell'apoptosi (Bak, Bcl-2) e nella via di segnalazione Sonic Hedgehog (SHH, SMO e PTCH-1).