

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

Rendiconto dell'attività di ricerca

Obiettivo

Lo scopo del presente studio è stato 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 nei tumori cutanei.

A tale scopo abbiamo analizzato il profilo di espressione di alcuni geni in campioni bioptici prelevati dai tumori cutanei, dalla cute perilesionale adiacente al tumore e dalla cute sana di pazienti con manifestazioni non tumorali. Ciascun gruppo era composto da campioni sia HPV positivi che HPV negativi. I geni oggetto del presente studio sono stati scelti in base ad alcuni dati presenti in letteratura.

Risultati

1. Ricerca e tipizzazione degli HPV nei campioni cutanei

Per individuare e tipizzare i beta-HPV nei campioni cutanei sono state utilizzate 2 differenti metodiche. (1) una nested-PCR (n-FAP/PCR) con primer degenerati che amplificano una sequenza nella regione codificante per la L1. I prodotti di amplificazione sono stati clonati e sequenziati. Le sequenze ottenute sono state confrontate con le sequenze depositate in GenBank utilizzando il programma BLAST. Il DNA estratto dai campioni è stato inoltre sottoposto alla Real-Time PCR per il gene della β -globina per valutare la corretta esecuzione dell'estrazione e l'assenza di sostanze inibenti la DNA polimerasi e per calcolare il numero di cellule presenti nei campioni. (2) un test non commerciale (PM-PCR RHA, Hybrid Reverse Assay, Diassay BV, Netherlands) che prevede l'amplificazione, tramite una PCR generica, di un segmento localizzato a livello della regione che codifica per la proteina E1, seguita dall'ibridazione degli ampliconi con sonde tipo-specifiche fissate su una strip di nitrocellulosa. Questa metodica è in grado di individuare 25 tipi virali, tutti appartenenti al genere beta.

Per la ricerca degli HPV mucosali/genitali è stato utilizzato il test commerciale (INNOLiPA-HPV Genotyping, Extra-Innogenetics) che consente l'amplificazione, tramite una PCR generica, di una sequenza localizzata a livello della regione L1 del genoma virale. Tali ampliconi vengono in seguito

ibridati con sonde tipo-specifiche depositate su una strip di nitrocellulosa. Questo test permette di individuare 28 principali genotipi mucosali/genitali, tutti appartenenti al genere alfa.

2. Analisi del profilo dell'espressione genica nei campioni HPV positivi e HPV negativi

L'analisi dell'espressione genica è stata condotta sull'RNA totale estratto da 81 biopsie cutanee (45 HPV positive e 36 HPV negative). Come riportato nella **Tabella 1** sono stati analizzati 28 tumori a cellule basali (16 HPV positivi e 12 HPV negativi), 23 campioni di cute perilesionale prelevata dagli stessi pazienti (11 HPV positivi e 12 HPV negativi) e 16 campioni di cute sana prelevata dai soggetti non affetti da tumori (8 HPV positivi e 8 HPV negativi). Sono stati inoltre inclusi 7 tumori a cellule squamose (5 HPV positivi e 2 HPV negativi) e 7 campioni della corrispondente cute perilesionale (5 HPV positivi e 2 HPV negativi) precedentemente analizzati e tipizzati nel nostro laboratorio. Nella **Tabella 2** sono stati riportati i tipi virali individuati nei vari gruppi di campioni.

3. Determinazione della quantità, della purezza e dell'integrità dell'RNA estratto

La quantità dell'RNA estratto da campioni biotici è stata determinata mediante la misurazione allo spettrofotometro. La valutazione della purezza e dell'integrità dell'RNA estratto è stata invece determinata valutando il rapporto di assorbanza a 260 ed a 280 nm. I campioni inclusi nell'analisi presentavano il rapporto $A_{260}/A_{280} \geq 1,5$ e contenevano da 10 a 1000 ng di RNA per microlitro.

4. Scelta dei geni per analisi mediante la qRT-PCR

Il gruppo dei geni studiati comprendeva il gene codificante per l'interleuchina-6 (IL-6), i geni codificanti per due proteine coinvolte nel controllo dell'apoptosi: Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) e Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) e geni codificanti per due proteine chiave della via di segnalazione Sonic Hedgehog (Hh): un recettore transmembrana, regolatore negativo della via (PTCH-1, Patched Homolog) e un recettore transmembrana, responsabile della trasmissione del segnale (SMO, Smoothed Homolog).

5. Scelta dei geni per la normalizzazione dell'espressione genica

I risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica mediante qRT-PCR sono influenzati da vari fattori quali la quantità e la qualità dell'RNA estratto, l'efficienza della trascrittasi inversa e della DNA polimerasi utilizzate nella reazione. Per eliminare le variazioni dovute a questi fattori il livello dell'espressione dei geni studiati è stato "normalizzato" quindi confrontato con l'espressione dei geni di riferimento (housekeeping genes) espressi a livello costante in tutti i tipi di campioni inclusi nello studio. In base ai dati riportati in letteratura (De Andrea et al., 2007; Stout et al., 1985), per la normalizzazione sono stati scelti due geni di riferimento: il gene che codifica per la beta-actina (ACTB) ed il gene che codifica per l'ipoxantina fosforibosil-transferasi (HPRT-1).

6. Determinazione della sensibilità delle real-time PCR

La sensibilità delle PCR per i 5 geni studiati e per i due geni di riferimento è stata determinata sottoponendo all'amplificazione una serie di diluizioni scalari del DNA bersaglio clonato. La sensibilità delle reazioni per tutti i geni è risultata identica, mantenendo la linearità nel range compreso tra 1000 000 e 10 copie della sequenza bersaglio.

7. Determinazione della specificità degli ampliconi

I primer usati per l'amplificazione dell'mRNA dei geni HPRT-1, ACTB, Bak, Bcl-2 e PTCH-1, sono posizionati su due esoni diversi, mentre i primer per l'mRNA dei geni IL-6 e SMO si trovano sullo stesso esone.

La specificità dei prodotti ottenuti in ogni reazione è stata confermata mediante l'analisi elettroforetica degli ampliconi e mediante l'analisi delle curve melting. I prodotti caricati sul gel di agarosio al 2% hanno generato una singola banda delle dimensioni attese (da 100 a 120 pb a seconda del gene amplificato). Le curve melting dei prodotti delle PCR per tutti i geni presentavano dei singoli picchi corrispondenti alle temperature melting degli ampliconi.

L'amplificazione dei 10 campioni di RNA, casualmente selezionati, senza la precedente retrotrascrizione, ha dato risultato negativo dimostrando l'assenza del DNA contaminante nei campioni dell'RNA estratto.

8. Analisi dei risultati

Per valutare i livelli dell'espressione genica nei campioni cutanei abbiamo utilizzato il metodo della quantificazione relativa. Tale metodo non permette di determinare la quantità assoluta

dell'acido nucleico nel campione, rivela invece, quante volte l'espressione di un determinato gene è superiore o inferiore rispetto all'espressione di un gene di riferimento, espresso in maniera costitutiva nelle stesse cellule. La quantificazione relativa permette anche di valutare, quante volte, l'espressione di un determinato gene aumenta o diminuisce nelle cellule studiate (ad es. sottoposte ad un determinato trattamento oppure, come nel nostro studio, infettate dagli HPV) rispetto all'espressione dello stesso gene nelle cellule di riferimento (non trattate o, come nel nostro caso, HPV negative).

Mediante l'opzione "quantificazione comparativa" il Rotor-Gene (Corbett) calcola automaticamente, per ciascun campione amplificato, due parametri: il valore di "take-off" ed il valore di "amplification". La derivata seconda del grafico dell'amplificazione produce picchi corrispondenti al valore massimo di aumento della fluorescenza durante la reazione. Il punto di "take-off" viene definito come il ciclo nel quale la derivata seconda è al 20% del suo livello massimo ed indica la fine del rumore di fondo ed il passaggio alla fase esponenziale. Il valore di "amplification" si riferisce all'efficienza dell'amplificazione dei singoli campioni.

Questi parametri sono stati utilizzati successivamente per calcolare i livelli di espressione relativa dei geni cellulari in campioni HPV positivi ed HPV negativi. Tale analisi è stata effettuata utilizzando il programma REST-2009 (Relative expression software tool) sviluppato da M. Pfaffl (Pfaffl et al., 2002) (Technical University Munich) e da Qiagen.

Il programma REST-2009 permette di effettuare un confronto tra i livelli dell'espressione genica in un gruppo di campioni (nel nostro caso HPV positivi) rispetto all'espressione genica nei campioni di riferimento (nel nostro caso HPV negativi) e di determinare se, e quante volte, l'espressione genica nei campioni risulta superiore o inferiore rispetto all'espressione nel gruppo di campioni di riferimento. Inoltre l'espressione dei geni d'interesse viene normalizzata in base all'espressione dei geni housekeeping espressi a livello costante nelle stesse cellule. Il REST-2009 utilizza il test di randomizzazione per calcolare il valore dell'espressione dei geni analizzati, per determinare l'espressione relativa nei campioni studiati e per valutare la significatività statistica tra livelli dell'espressione nei campioni e nel gruppo di riferimento. Nel calcolo viene preso in considerazione il valore di "amplification" il quale, come appena detto, rappresenta un parametro che si riferisce all'efficienza di amplificazione dei singoli campioni. Le differenze tra i due gruppi analizzati che presentano un valore di $P < 0,05$ vengono considerate statisticamente significative.

9. Analisi dell'espressione dei geni cellulari

Nella **Figura 1** è stata riportata l'espressione relativa in diversi tipi di biopsie HPV positive, dei 5 geni cellulari studiati. I valori riportati dimostrano quante volte, l'espressione del gene studiato è superiore o inferiore nei campioni HPV positivi rispetto a quella nei campioni HPV negativi. La significatività statistica è stata calcolata automaticamente dal programma REST-2009.

Nei campioni HPV positivi provenienti dalla cute perilesionale di pazienti con basaliomi CP(B) e da carcinomi a cellule squamose SCC, l'espressione dell'IL-6 è risultata significativamente più elevata rispetto a quella rilevata nei campioni HPV negativi. I valori ottenuti con il programma REST-2009 risultavano: per la cute perilesionale (espressione relativa 3,133; errore standard 0,551- 18,129; $p=0,041$) per l'SCC (espressione relativa 2,208; errore standard 1,869 – 2,661; $p=0,00$). Le differenze osservate per altri campioni non sono risultate significative ($p>0,05$).

I livelli dell'mRNA per la proteina anti-apoptotica Bcl-2 sono risultati significativamente più elevati nei tumori a cellule squamose HPV positivi rispetto a quelli HPV negativi (espressione relativa pari a 3,143; errore standard 2,208 – 5,251 ; $p=0,00$). Le differenze osservate per altri campioni non sono risultate significative.

L'espressione del gene codificante per la proteina SMO è risultata significativamente più elevata (espressione relativa pari a 2,479; errore standard 0,565-11,565; $p=0,039$) nei campioni BCC HPV positivi rispetto ai campioni BCC HPV negativi. Le differenze osservate per altri campioni non sono risultate significative.

Non sono state individuate differenze significative nell'espressione dei geni codificanti per le proteine PTCH-1 e Bak tra i campioni HPV positivi e quelli HPV negativi in tutti i gruppi esaminati.

Discussione

Dall'analisi comparativa dei campioni HPV positivi ed HPV negativi sono emerse alcune interessanti differenze. In particolare, nei campioni HPV positivi provenienti dai carcinomi a cellule squamose è stata osservata una maggiore espressione dell'IL-6 e della proteina Bcl-2 mentre nei campioni HPV positivi provenienti dai carcinomi a cellule basali è stato osservato un aumento significativo dell'espressione della proteina SMO. L'aumento dell' IL- 6 è stato inoltre osservato nella cute perilesionale proveniente dai pazienti con BCC.

L'IL-6 è una citochina che svolge un ruolo centrale nel modulare la risposta immune, funziona da regolatore negativo dell'apoptosi e appare coinvolta nella patogenesi di vari tumori umani fra cui

anche quelli cutanei. Nelle cellule provenienti dai carcinomi a cellule basali coltivate *in vitro*, l'IL-6 stimola la proliferazione cellulare, la crescita indipendente dall'ancoraggio e l'attività anti-apoptotica. Il trapianto delle cellule che esprimono costitutivamente l'IL-6 nei topi nudi porta all'aumento della massa tumorale e dell'incidenza del tumore. In uno studio recente è stato dimostrato che l'IL-6 prodotta dalle cellule transfettate con la proteina E6 dell'HPV-5 è in grado di inibire l'apoptosi nelle cellule non transfettate. Questo interessante dato potrebbe spiegare il meccanismo con cui anche poche cellule infettate presenti nel tumore sarebbero in grado di indurre uno stato "anti-apoptotico" nelle cellule non infettate contribuendo alla tumorigenesi. È stato inoltre dimostrato, mediante immunoistochimica, che nelle biopsie provenienti dai carcinomi a cellule squamose HPV positive la quantità dell'IL-6 è significativamente più elevata rispetto alla quantità osservata nei tumori HPV negativi (Tomlins et al., 2010).

L'analisi effettuata nel nostro studio ha rivelato che la presenza degli HPV nell'SCC è associata alla più elevata presenza dei messaggeri per l'IL-6. Tale risultato concorda quindi con i risultati ottenuti nello studio appena citato. Resta difficile da interpretare l'aumento dell'espressione dell'IL-6 nella cute perilesionale dei pazienti con BCC. La cute perilesionale adiacente al tumore rappresenta un tipo di campione piuttosto particolare; dal punto di vista istologico, non dimostra differenze rispetto alla cute normale, distante dal tumore, tuttavia studi molecolari hanno individuato, nelle cellule adiacenti al tumore, la presenza di differenti alterazioni genetiche, assenti nelle cellule più distanti. È stato quindi ipotizzato che la cute perilesionale rappresenti una zona di transizione, già modificata, che può progredire verso il tumore. Studi virologici riportavano un'elevata prevalenza dell'infezione da HPV nella cute perilesionale, spesso paragonabile a quella riscontrata nei tumori e quasi sempre superiore, a volte in maniera significativa, alla prevalenza osservata nella cute sana.

La proteina pro-apoptotica Bak e la proteina anti-apoptotica Bcl-2 svolgono un ruolo importante nel controllo dell'apoptosi. È stato dimostrato che le cellule transfettate con le proteine E6 ed E7 dell'HPV-16 presentano un aumento significativo della proteina Bcl-2 ed una diminuzione significativa della proteina Bak (Du et al., 2004). Studi successivi hanno messo in evidenza che le oncoproteine di alcuni HPV sia mucosali che cutanei promuovono la degradazione della proteina Bak (Jackson et al., 2000). Attualmente mancano dati che indichino l'effetto del virus sull'espressione o sull'attività della proteina Bcl-2.

La proteina SMO è una proteina chiave nella via di segnalazione Hh. La via è attiva durante lo sviluppo embrionale mentre è quasi totalmente inibita nei tessuti adulti. La sua attivazione comporta l'attivazione dell'espressione di diversi geni coinvolti nella proliferazione cellulare ed è associata a diverse neoplasie fra le quali il carcinoma a cellule basali (Akgul et al., 2006). Tale attivazione, spesso associata all'attivazione alterata della SMO o all'inattivazione della PTCH-1 è stata

individuata rispettivamente nel 20% e nel 50-70% di alcuni tipi di BCC e ciò fa presumere che l'attivazione costitutiva della via di Hedgehog sia importante per lo sviluppo di questo tumore. Nella cute la via Hh è responsabile del mantenimento delle cellule staminali e controlla lo sviluppo dei follicoli piliferi i quali, come è stato dimostrato in numerosi studi, ospitano costantemente un'ampia gamma di tipi di HPV (Boxman et al.,1997). E' stato perfino suggerito, che proprio i follicoli piliferi possano rappresentare un probabile serbatoio degli HPV cutanei. L'associazione tra l'infezione da HPV e l'espressione delle proteine coinvolte in tale via è stata finora poco esplorata. Tuttavia in uno studio sui carcinomi della cervice uterina è stata dimostrata la correlazione significativa tra la presenza dell'HPV-16 e la down-regolazione del ligando SHH (Xuan et al., 2009). L' aumento dell'espressione della SMO nei campioni HPV positivi, osservato nel presente studio, potrebbe suggerire che la presenza degli HPV possa influenzare il funzionamento della via di segnalazione Hh.

I risultati del presente studio, se confermati dall'analisi di un gruppo più ampio di campioni, allargando eventualmente il numero dei geni studiati (includendo ad es. altri geni coinvolti nella via Hh), potrebbero fornire un importante contributo nella comprensione del comportamento biologico dei papillomavirus cutanei. Tali conoscenze sono fondamentali per capire se il virus è presente nella cute come "un innocuo commensale", come suggeriscono alcuni autori, oppure, se, in cooperazione con altri fattori, è in grado di indurre nelle cellule infettate una serie di modificazioni che potrebbero favorire lo sviluppo o la progressione del tumore. Inoltre i campioni da noi analizzati risultavano infettati da virus differenti, spesso da più di un tipo virale. È necessario ricorrere agli studi *in vitro* per determinare se l'effetto osservato nel presente studio sia dovuto alla presenza di alcuni particolari tipi virali.

Tabella 1. I campioni di biopsie cutanee inclusi nello studio dell' analisi del profilo di espressione genica

Campioni	HPV (+)	HPV (-)	Totale
BCC	16	12	28
CP(BCC)	11	12	23
SCC	5	2	7
CP(SCC)	5	2	7
CS	8	8	16
Totale	45	36	81

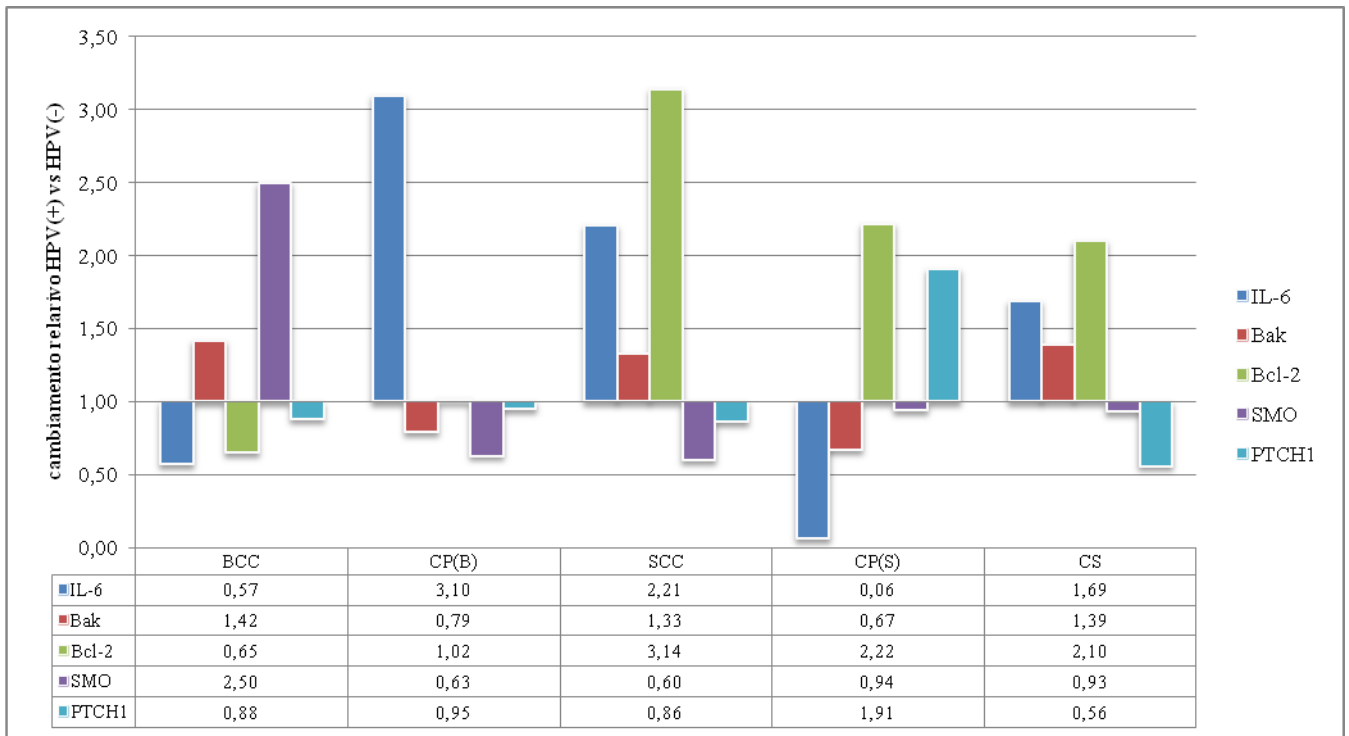
BCC: carcinoma a cellule basali; CP(BCC): cute perilesionale da pazienti con BCC; SCC: carcinoma a cellule squamose; CP(SCC): cute perilesionale da pazienti con SCC; CS: cute da soggetti senza patologie tumorali

Tabella 2. Gli HPV rilevati nei campioni inclusi nello studio dell' analisi del profilo di espressione genica

Campioni	Tipi di HPV	HPV putativi
BCC	5, 8, 9, 12, 15, 19, 21, 23,24, 37,38, 49, 80, 92, 93	
CP(BCC)	5, 8, 9, 14, 15, 17, 19, 21, 23, 24, 36, 37, 38, 47, 49, 80, 92, 93, 100	FA37, FA114.2,
SCC	5, 8, 20, 21, 25, 38, 93, 105	FA84, FAIMVS7, FAIMVS6.4
CP(SCC)	5, 8, 9, 19, 21, 23, 36, 47, 93	FA37, FA108, FAIMVS6.4
CS	5, 8, 9, 20, 24, 25	FA143, FA108

BCC: carcinoma a cellule basali; CP(BCC): cute perilesionale da pazienti con BCC; SCC: carcinoma a cellule squamose; CP(SCC): cute perilesionale da pazienti con SCC; CS: cute da soggetti senza patologie tumorali

Figura 1. L' espressione relativa dei geni studiati in campioni HPV (+) vs HPV (-) (REST-2009; Corbett Research)



Bibliografia

- Akgul, B., Cooke, J.C., Storey, A., 2006. HPV-associated skin disease. *J Pathol*; 208: 165-175.
- Boxman, I. L., Berkhout, R. J., Mulder, L. H., Wolkers, M. C., Bouwes, Bavnick, J. N., Vermeer, B. J., Ter Schegget, J., 1997. Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol*; 108: 712-715.
- De Andrea, M., Mondini, M., Azzimonti, B., Dell'Oste, V., Germano, S., Gaudino, G., Musso, T., Landolfo, S., Gariglio, M., 2007. Alpha- and betapapillomavirus E6/E7 genes differentially modulate pro-inflammatory gene expression. *Virus Res*.124: 220-225.
- Du, J., Chen, G.G., Vlantis, A. C., Chan, P. K. S., Tsang, C. A., R. K. Y., van Hasselt C. A., 2004. Resistance to apoptosis of HPV-16 infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Letters*; 205:81-88.
- Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., Storey, A., 2000. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Gene. Dev*; 14:3065-3073.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in Real Time PCR. *Nucleic Acids Res*; 30-36.
- Slebos, R. J., Yi, Y., Ely, K., Carter, J., Evjen, A., Zhang, X., Shyr, Y., Murphy, B.M., Cmelak, A.J., Burkey, B.B., Netterville, J.L., Levy, S., Yarbrough, W.G., Chung, C.H., 2006. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*.12:701-709.
- Stout, J. T., Chen, H. Y., Brennand, J., Caskey, C.T., Brinster, R. L., 1985. Expression of human HPRT in the central nervous system of transgenic mice. *Nature*; 317:250-252.
- Tomlins, C., Storey, A., 2010. Cutaneous HPV-5 E6 causes increased expression of Osteoprotegerin and Interleukin 6 which contribute to evasion of UV-induced apoptosis. *Carcinogenesis*; 12:2155-2164.
- Xuan, Y. H., Li, G. L., Jiang, H. Y., Lin, Z. H., 2009. Relationship between hedgehog signaling pathway molecules and HPV16 infection in uterine cervical cancers. *Chinese Journal of pathology*; 38:178-182.