

Titolo: Studio dell'associazione tra papillomavirus umani (HPV) e tumori cutanei epiteliali (*non-melanoma skin cancer*, NMSC)

Proponente: Dr. Krystyna Zakrzewska, ricercatore presso il Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Firenze

Il progetto sarà svolto in collaborazione con Dr. Vincenzo De Giorgi, Dipartimento di Scienze Dermatologiche, Università di Firenze.

Introduzione

I tumori della pelle rappresentano il 10-15% di tutti i tumori maligni. In alcune aree geografiche però la loro frequenza sfiora, e talvolta supera, il 50%.

I più frequenti tumori maligni della cute sono i carcinomi a cellule basali ed i carcinomi a cellule squamose, 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.

Il Carcinoma a cellule basali è il tumore cutaneo più frequente nei caucasici e raggiunge il 76% di tutti i tumori cutanei. L'incidenza di tale carcinoma aumenta parallelamente con l'età del paziente. Questo tumore raramente metastatizzante ha capacità invasive e deostruenti, creando anche notevoli deficit funzionali a seconda delle regioni anatomiche coinvolte. In Italia fino a qualche decennio fa il carcinoma basocellulare era di pertinenza della settima / ottava decade di vita mentre oggi non è infrequente osservarlo nella terza/quarta decade. Si stima che più del 70% della popolazione che raggiungerà l'anzianità nei prossimi 20/30 anni svilupperà questo tumore.

Il Carcinoma a cellule squamose rappresenta il 20% di tutti i tumori cutanei. Tale carcinoma si sviluppa in aree fotoesposte in modo rapido e può metastatizzare in altre parti del corpo attraverso la via linfatica. L'area più frequentemente colpita è quella del labbro inferiore (tumore del marinaio), preceduta dalla cosiddetta cheilite attinica. Aumentano tuttavia le osservazioni di carcinoma a cellule squamose del volto e, nei soggetti calvi, del capillizio. Oltre a fattori noti, come l'invecchiamento e l'esposizione alle radiazioni solari, sembra che anche l'infezione da parte di alcuni virus, in particolare da alcuni papillomavirus, abbia un ruolo nello sviluppo di questi tumori.

Gli HPV sono piccoli virus nudi a simmetria icosaedrica con DNA circolare a doppia elica di circa 8000 paia di basi che infettano le cellule epiteliali della cute e delle mucose. In

base alle relazioni filogenetiche della regione gnomica L1, gli HPV vengono classificati in generi, specie, genotipi e varianti. Il genere α - HPV comprende prevalentemente virus che infettano le mucose respiratorie e genitali (HPV mucosali). I tipi cutanei appartengono ai generi β e γ filogeneticamente distinti. Esistono circa 200 differenti tipi di HPV che infettano gli epiteli stratificati di diversi distretti dell'organismo. Mentre alcuni genotipi causano lesioni benigne quali verruche o condilomi, altri genotipi possono causare lesioni premaligne e maligne

L'infezione persistente da papillomavirus mucosali ad alto rischio oncogeno (HR-HPV) è un prerequisito dello sviluppo del carcinoma della cervice uterina e delle lesioni squamose epiteliali di alto grado (HSIL) che lo precedono. E' ormai dimostrato che tutti i carcinomi cervicali hanno quale agente causale uno dei 14 genotipi definiti ad alto rischio oncogeno certo (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). I meccanismi molecolari coinvolti sono ben definiti e sono principalmente associati alla capacità delle proteine E6 ed E7 dei genotipi definiti HSIL di legare e neutralizzare l'attività della p53 e della pRb rispettivamente, noti oncosoppressori cellulari. Diversi studi hanno dimostrato la presenza di genomi integrati di HPV16 e 18 nella maggioranza dei tumori e nelle linee cellulari isolate da tessuto tumorale della cervice uterina (Venuti et al; 1989, Jeon et al 1995; Park et al., 1997). Tuttavia, il ruolo che l'integrazione del DNA virale possa svolgere nella progressione verso la displasia maligna è ancora discusso. (Das et al., 1992).

L'associazione tra gli HPV cutanei specialmente quelli appartenenti al genere β ed i tumori cutanei NMSC rimane ancora poco chiara. I primi dati in letteratura relativi al coinvolgimento di questi virus nella patogenesi dei tumori della cute si riferiscono a pazienti con epidermodisplasia verruciforme (EV). Questa rara patologia è caratterizzata dalla presenza delle lesioni papillomatose disseminate su tutto il corpo le quali nel circa 30% di pazienti evolvono in NMSC (Jablonski et al., 1972; Orth et al., 1978). In quasi il 90% di questi tumori risulta presente il DNA di alcuni β -HPV indicati come EV-HPV. Gli HPV appartenenti ai generi β e γ sono stati individuati frequentemente in tumori diversi dal melanoma anche in pazienti non affetti da EV, e la loro presenza a livello cutaneo e follicoli piliferi è stata associata ad un maggiore rischio del carcinoma squamoso (Harwood et al, 2004) e della cheratosi actinica che lo precede (Boxman et al., 2001). Diversi studi hanno dimostrato un'altissima prevalenza del DNA di HPV nei carcinomi cutanei, soprattutto negli individui immunodepressi. Infatti, con i metodi di amplificazione caratterizzati da un'elevatissima sensibilità (Berkhout et al., 1995; Harwood et al., 2002) i genomi virali sono stati individuati nel 80-90% dei carcinomi cutanei di soggetti

immunocompromessi (Berkhout et al., 1995; Harwood et al., 2000; Suretheran et al. 1998) ma anche nel 50-90% dei carcinomi cutanei di soggetti immunocompetenti (Harwood et al., 2002). Il meccanismo della trasformazione da parte degli HPV cutanei sembra essere diverso da quello dei mucosali e sembra dipendere da vari co-fattori (l'esposizione ai raggi UV, l'immunodepressione, l'iperproliferazione dell'epitelio come nella psoriasi, i background genetici particolari dell'ospite come nell'epidermodisplasia verruciforme). E' importante sottolineare che gli HPV sono risultati presenti, con prevalenza variabile, anche nella cute normale tanto da essere considerati da alcuni studiosi come commensali e che questi virus possono persistere nella cute per diversi anni dall'infezione (Hazard et al., 2007).

Appare quindi evidente che la sola presenza del DNA virale nella cute non è sufficiente per dimostrare la connessione tra l'infezione e il rischio del tumore. E' necessario individuare quali sono i tipi di HPV associati più frequentemente alla patologia tumorale e, attraverso lo studio di vari marker virologici, di stabilire eventuali differenze nell'attività biologica del virus nel tessuto tumorale e nel tessuto normale. Attualmente gli strumenti per la ricerca e la tipizzazione di HPV cutanei sono molto limitati in quanto tutti i kit commerciali sono volti alla individuazione degli HPV mucosali.

Obiettivi

Lo studio proposto è volto a valutare la prevalenza di vari genotipi nel tessuto cutaneo neoplastico e nella cute sana per individuare i genotipi più frequentemente associati alla patologia neoplastica e quelli che prevalgono nella cute sana. Inoltre si cercherà di individuare se i fattori quali il genotipo, la carica virale, lo stato di integrazione e il pattern di espressione delle oncoproteine virali giocano un ruolo nella patogenesi dei tumori NMSC.

Lo studio propone:

1. La raccolta dei campioni di biopsie cutanee

La raccolta di due gruppi di campioni (cute sana perilesionale e NMSC) permetterà di confrontare la presenza di vari marcatori di infezione virale ed individuare quelli caratteristici del tessuto tumorale

2. La ricerca del DNA degli HPV nei campioni raccolti

La ricerca del genoma di HPV nelle biopsie cutanee permetterà di stabilire la frequenza del virus nel tessuto sano e nel tessuto neoplastico. L'uso di vari test di amplificazione renderà possibile il confronto della sensibilità delle PCR utilizzate in vari studi già pubblicati e scegliere il metodo migliore da utilizzare nelle ricerche successive

3. La tipizzazione dei virus individuati

La tipizzazione dei virus riscontrati nei campioni permetterà di identificare i genotipi più frequentemente presenti nei due gruppi di campioni (cute sana e NMSC). Inoltre si cercherà di individuare i gruppi ad alto e a basso rischio oncogeno, una distinzione già esistente per gli HPV mucosali

4. La preparazione di plasmidi ricombinanti di riferimento contenenti il DNA dei genotipi individuati

I cloni genomici di vari HPV di riferimento rappresentano un materiale indispensabile per l'allestimento dei test per la ricerca del DNA virale e per la gentipizzazione.

5. La determinazione della carica virale dei genotipi riscontrati più frequentemente nel tessuto neoplastico e nella cute sana

La determinazione della carica virale nei due gruppi di campioni permetterà di valutare l'attività replicativa del virus.

6. La valutazione dello stato fisico di HPV (episomico/integrato/misto)

Come dimostrano alcuni studi, i genomi di HPV mucosali ad alto rischio oncogeno presenti nelle lesioni pre-maligne, nella maggioranza dei tumori e nelle linee cellulari isolate da tessuto tumorale della cervice uterina, sono integrati nel genoma della cellula ospite. Mancano del tutto i dati di questo tipo per gli HPV cutanei

7. L'espressione dei messaggeri per le oncoproteine E6 ed E7

L'attività oncogenica degli papillomavirus mucosali ad alto rischio oncogeno è riconducibile alla sovraespressione delle oncoproteine E6 E7. La ricerca dei messaggeri per queste proteine nella cute infetta permetterà di stabilire se l'attività oncogenica dei papillomavirus cutanei possa essere riconducibile allo stesso meccanismo.

Descrizione della metodologia

1. Raccolta dei campioni

Presso la sala dermochirurgica del Dipartimento di Scienze Dermatologiche dell'Università di Firenze verranno raccolti, mediante biopsie escissionale, frammenti di carcinoma a cellule basali (BCC) e di carcinoma a cellule squamose (SCC), e frammenti della rispettiva cute sana perilesionale .

Pertanto da ciascun paziente, previo consenso informato, analizzeremo due campioni,: uno di tessuto neoplastico e l'altro di tessuto sano perilesionale . I campioni prelevati verranno risospesi in una soluzione che stabilizza l'RNA (RNALater RNA Stabilization Reagent, Quiagen), tenuti per una settimana a 4°C e successivamente conservati a -80°C. Al momento opportuno i campioni verranno divisi in due aliquote: la prima sarà trattata per la purificazione del DNA, la seconda per gli RNA. Per ciascun paziente verrà compilata una scheda contenente informazioni relative l'età e ad eventuali fattori di rischio come l'esposizione a raggi UV, l'eventuale terapia radiante, l'assunzione di farmaci immunodepressori od immuno-stimolanti, lo status immunologico.

2. Ricerca del DNA di HPV nei campioni biotici

I campioni saranno omogeneizzati mediante trattamento meccanico con Tissue Rupter (Quiagen), lisati mediante soluzioni contenenti agenti caotropici, gli acidi nucleici saranno purificati per l'affinità utilizzando colonne cromatografiche per l'estrazione di DNA ed RNA.

La qualità del DNA estratto sarà valutata mediante una PCR per il gene per la β globina (Bauer et al., 1991).

Per la ricerca del genoma di HPV il DNA estratto dai campioni verrà analizzato mediante una serie di PCR con primer riportati in letteratura, posizionati nell'ORF L1.

- PCR singola con primer FAP59-FAP64 (Forslund et al., 1999)
- Nested PCR con primer FAP59-FAP64 e FAP6085F- 6319R (Forslund et al., 2003)
- Nested PCR con primer CP65-CP70 e CP66-CP69 (Berkhout et al; 1995)
- Nested PCR con primer CP62-PP69 e CP65-CP68 (Harwood et al., 1999)
- PCR singola con primer HVP2-MixC (Shamanin et al., 1994)
- Nested PCR con primer CP62- CP71A, CP71B, CP71c e CP64-CP70A (Berkhout et al 2000)

I prodotti delle PCR saranno analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

3. Tipizzazione degli HPV individuati

Per la tipizzazione verranno utilizzati alcuni test descritti in letteratura. In particolare si prevede l'allestimento di un Revers Line Blotting (Brink et al., 2005) che prevede l'amplificazione dei campioni con una PCR consenso con primer reverse biotinilato e la loro successiva identificazione mediante ibridazione con sonde tipo-specifiche fissate su una membrana di nylon. Questo test permette l'identificazione dei 24 HPV appartenenti ai gruppi β e γ HPV, più frequentemente associati alle neoplasie cutanee (HPV 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 48, 49, 50, 60 e 65).

Il DNA da tutti i campioni negativi al test, quindi contenenti HPV differenti verrà clonato e sequenziato per permettere la genotipizzazione.

4. Preparazione dei plasmidi ricombinanti di riferimento contenenti il DNA dei genotipi individuati

I genomi dei vari tipi virali individuati nei campioni saranno amplificati mediante PCR e clonati nei vettori plasmidici utilizzando i metodi standard. Si prevede un eventuale subclonaggio del DNA virale in vettori di espressione per studi futuri di trasfezione volti ad analizzare l'attività biologica di varie proteine virali, in particolare le oncoproteine E6 ed E7.

5. Determinazione della carica virale

Per la valutazione della carica virale si utilizzerà una PCR quantitativa (real-time PCR) con primer che amplificano una porzione dell'ORF L1 e SYBER Green come tracciante fluorescente. La determinazione quantitativa del DNA virale sarà ottenuta facendo riferimento a curve di calibrazione, utilizzando come bersagli standard plasmidici contenenti interi genomi degli HPV da noi clonati.

6. la valutazione dello stato fisico di HPV (episomico/integrato/misto)

Per la valutazione dello stato fisico degli HPV si propone utilizzare una PCR quantitativa (real-time PCR). Verranno disegnate diverse coppie di primer che amplificano frammenti sovrapposti all'interno delle regioni E1 ed E2 degli HPV più prevalenti da impiegare in reazioni di PCR quantitative, al fine di studiare le intere regioni E1 ed E2 e di definire i siti di interruzione/delezione del genoma virale.

In seguito saranno sviluppati e utilizzati metodi di real time PCR che impiegheranno come tracciante fluorescente il SYBR Green per la quantificazione dei geni E1-E2 ed E6 di HPV

più frequenti e che quindi permetteranno la valutazione dello stato fisico (integrato/episomale/misto) del virus. Verranno eseguite due real-time PCR con due coppie di primer, una che amplifica una porzione dell'ORF E6, conservata sia che il virus sia allo stato episomale che integrato, ed una che amplifica una porzione E1-E2 del virus, interrotta in caso di integrazione virale. La determinazione quantitativa del DNA virale sarà ottenuta facendo riferimento a curve di calibrazione, utilizzando come bersagli standard plasmidici contenenti interi genomi degli HPV da noi clonati.

7. L'espressione dei messaggeri per le proteine oncogene E6 ed E7

La valutazione dell'espressione dei geni per le proteine oncogene sarà effettuata mediante le reazioni RT-PCR. Verranno quindi individuati i primer posizionati nell'ORF per le proteine E6 ed E7 dei tipi virali più frequentemente individuati nei campioni studiati.

Interesse per l'avanzamento della conoscenza

La ricerca e la tipizzazione degli HPV nei tumori NSCM permetterebbe l'individuazione di tipi più frequentemente associati alla patologia e di conseguenza di focalizzare lo studio su un gruppo più ristretto di tipi virali.

L'individuazione dei marker virologici connessi con le lesioni neoplastiche fornirebbe uno strumento diagnostico importante per studiare il rischio di progressione verso i tumori

Bibliografia

- Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, et al (2000) 74: 11636-11164
- Astori G, Lavergne D, Bentos C, et al (1998) *J Invest Dermatol*; 110: 752-755
- Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, et al (2000) 74: 11636-11164
- Bauer HM., Yi Ting MS., Greer CE., et al., (1991) *JAMA* 265 : 472-477
- Berkhoud RJM, Tieben LM, Smits HL, et al (1995) *J Clin Microbiol*; 33: 690-699
- Berkhout R J., Bouwes Bavinck J N., et al (2000) *J Clin Microbiol* 38: 2087-2096
- Bouwes Bavinck JN, Feltkamp M, Struijk L, et al (2001) *J Invest Dermatol Symp Proc*; 6: 207-211
- Boxman LL., Russell A., Mulder LH., et al (2001) *J Invest Dermatol* 117: 1108-1112
- Brink A A T P., Lloveras B. Nindl I, et al., (2005) *J Clin Microbiol* 43: 5581-5587
- Das BC., Sharma JK., Gopalakrishana V., et al (1992) *J Gen Virol* 73: 2327-2336
- Forslund O., Antonsson A., Nordin P., et al (1999) *J Gen Virol* ; 80 : 2437-2443
- Forslund O., Ly H., Reid C., et al., (2003) *J Virol Methods*; 110:129-136
- Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, et al (1999) *J Clin Microbiol*; 37: 3545-3555
- Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, et al (2000) *J Clin Microbiol*; 38: 2087-2096
- Harwood CA, Proby CM (2002) *Curr Opin Infect Dis* ; 15: 101-114
- Harwood CA, Suretheran T, Ssasiene P, et al (2004) *Br J Dermatol*; 150: 949-957
- Hazard K., Karlsson A., Anderson K., et al (2007) *J Invest Dermatol* 127: 116-119
- Iftner A, Klug SJ, Garbe C et al (2003) *Cancer Res* ; 65: 7515-7519
- Jablonski S., Dobrawski J., Jakubowicz K., (1972) *Cancer Res* 32: 583-589
- Jeon S., Allen-Hoffmann BL., Lamber PE. (1995) *J Virol* 69: 2989-2997
- Orth J., Jablonska S., Favre M., et al (1978) *Proc Natl Acad Sci. USA* 75: 1537-1541
- Park JS., Hwank ES., Ahn HK., et al (1997) *Gynecol Oncol* 65: 121-129
- Pfister H, Fuchs PG, Majewski S, et al (2003) *Arch Dermatol Res*; 295: 273-279
- Shamanin V., Glover M., Raush C., et al., (1994) *Cancer Res* 54 : 4610-4613
- Suretheran T, Harwood CA, Spink PJ, et al (1998) *J Clin Pathol*; 51: 606-610
- Venuti A., Marcante ML. (1989) *J Gen Virol* 70: 1587-1592

