

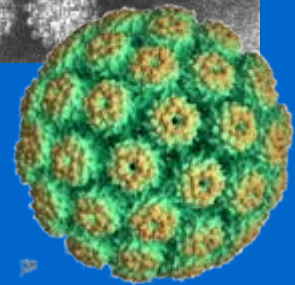
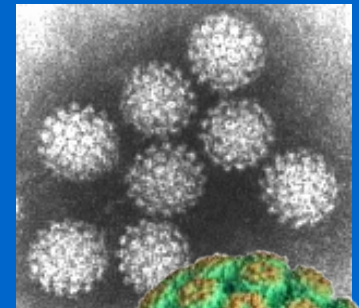


Università di Bologna

Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale
Sezione di Microbiologia

RUOLO DELL'HPV NELLA PATOGENESI DEL CARCINOMA DEL COLLO DELL'UTERO: FATTORI MOLECOLARI DIAGNOSTICI E PROGNOTICI DI MALATTIA

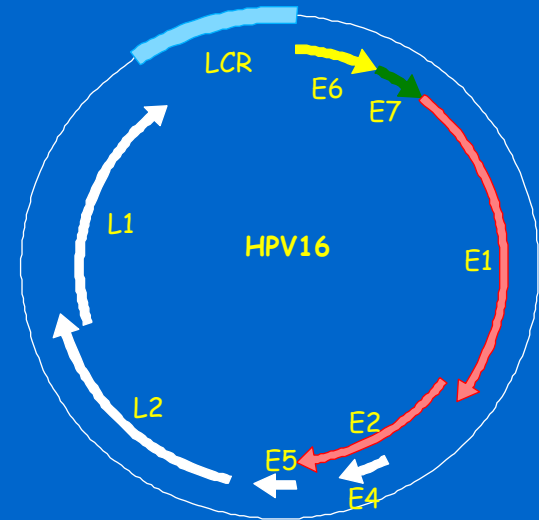
Marialuisa Zerbini



HPV E CARCINOMA DELLA CERVICE

- Prevalenza del 93%-99.7% di DNA di HPV nei carcinomi della cervice (in PCR)
- Il 53% dei carcinomi della cervice sono associati ad HPV 16, il 15% al 18, il 9% al 45, il 6% al 31 e il 3% al 33 (IARC, 2000)

PAPILLOMAVIRUS UMANI

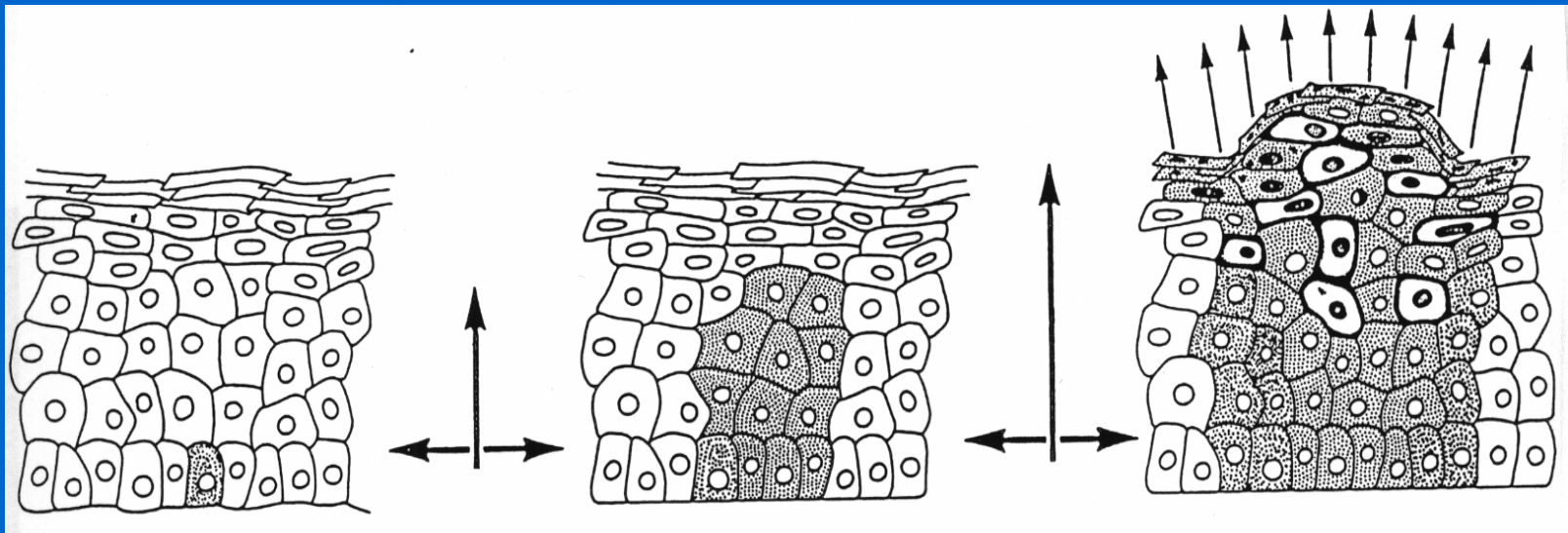
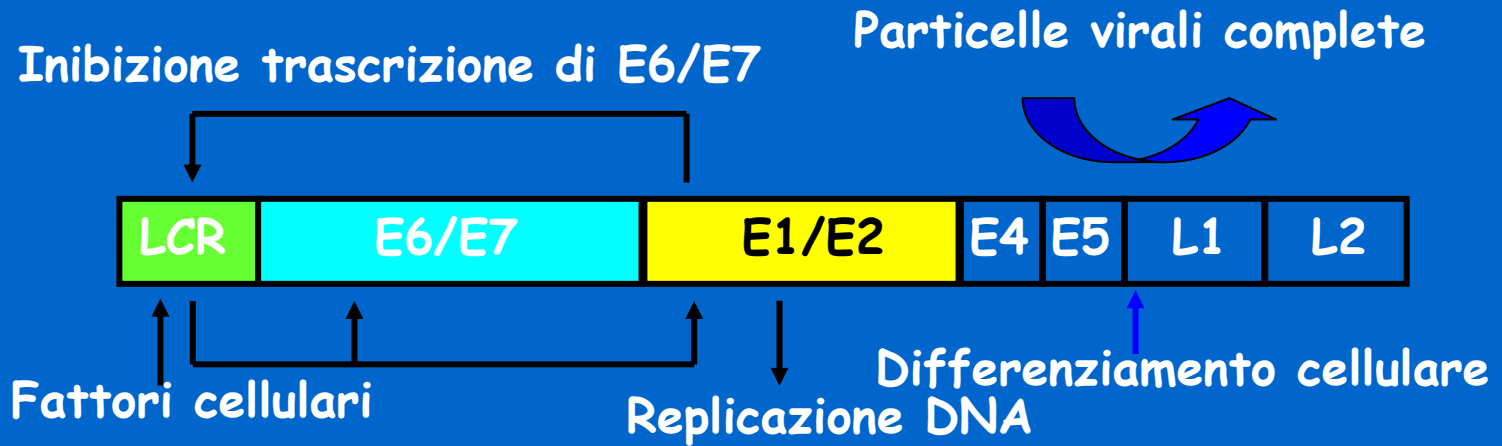


Organizzazione del genoma (dsDNA):

- ✓ LCR (regione regolatoria non codificante)
- ✓ Early region (codificante proteine virali regolatorie)
- ✓ Late region (codificante protine virali capsidiche)

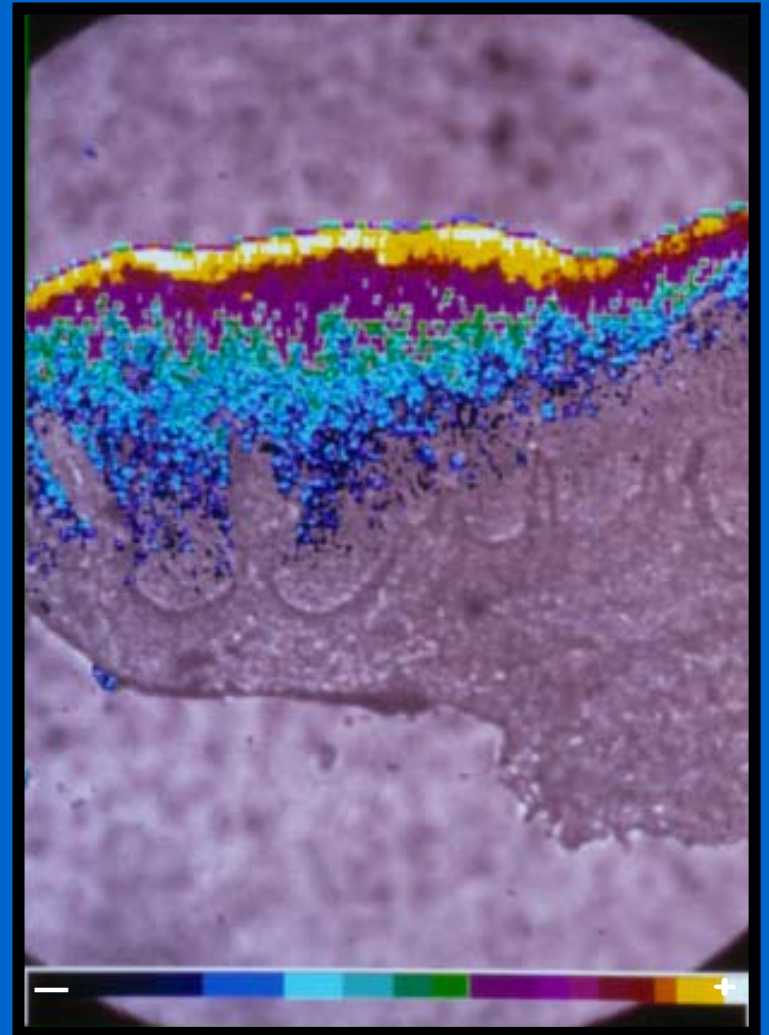
PAPILLOMAVIRUS UMANI

Schema patogenetico dell'infezione:



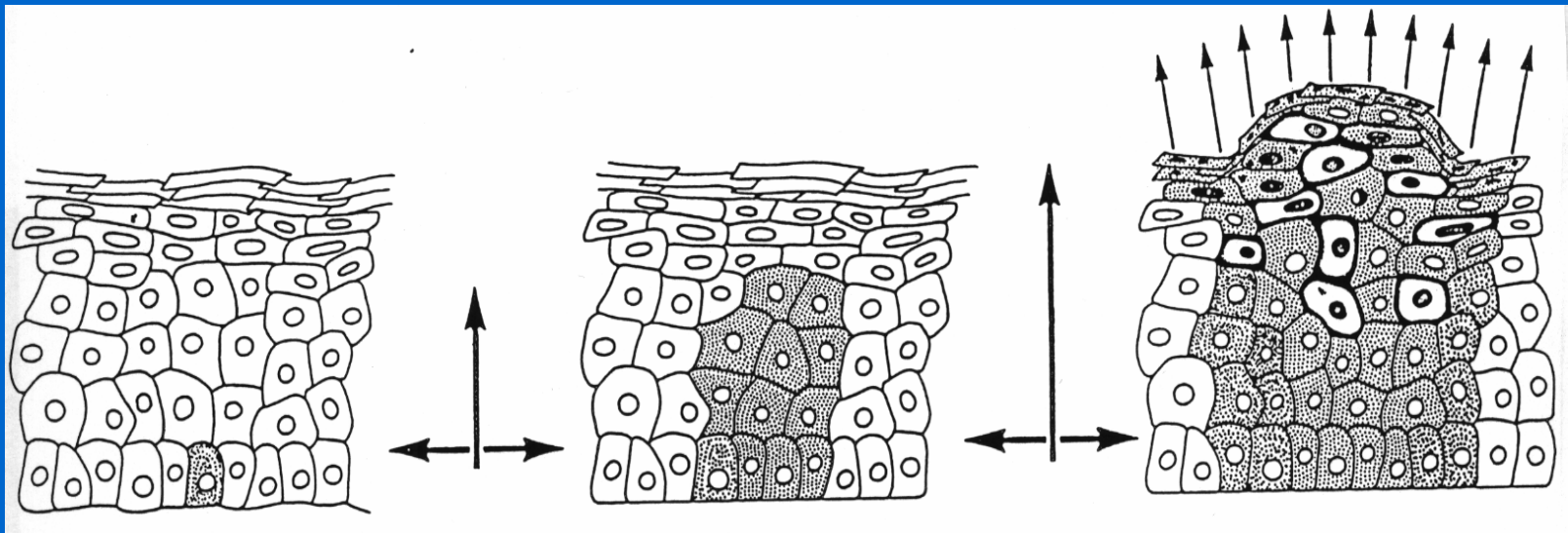
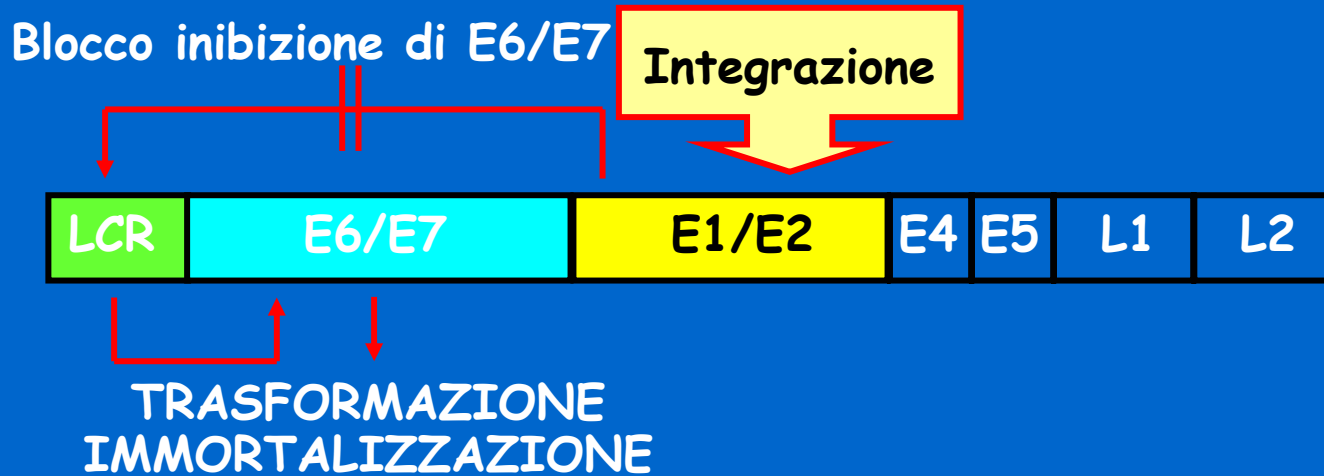
Ibridazione in situ con rivelazione chemiluminescente

- Biopsia pene (papulosi bowenoide)
- Pool sonde HPV16/18 digossigeninate
- Anticorpi anti-Dig + fosfatasi alcalina
- Rivelazione chemiluminescente
- Emissione di fotoni analizzata al microscopio ottico collegato a un luminografo interfacciato ad un computer



PAPILLOMAVIRUS UMANI

Schema patogenetico dell'infezione:



Fattori molecolari diagnostici e prognostici di malattia

- Presenza di HPV ad alto rischio oncogeno
- Persistenza di HPV ad alto rischio oncogeno
- Una elevata carica virale che aumenta il rischio di integrazione del DNA virale nel genoma umano
- La presenza di DNA virale allo stato misto e/o totalmente integrato nel genoma cellulare
- L'espressione degli oncogeni E6/E7

Metodi molecolari: diagnosi di infezione da HPV

- Ibridazione diretta degli acidi nucleici virali con amplificazione del segnale (HC-II)
- Amplificazione qualitativa (PCR) di diverse sequenze geniche seguita da tipizzazione con enzimi di restrizione o ibridazione molecolare (ELISA, LiPA, Line Array ecc..)
- Amplificazione quantitativa (Real Time PCR) di acidi nucleici virali per la ricerca del DNA e degli mRNA virali

Metodi molecolari: prognosi di progressione neoplastica

Analisi del DNA di HPV16

Real Time (RT)-PCR quantitativa per la determinazione della carica virale e dello stato fisico di HPV16 (PCR real-time regioni E2/E6)

Analisi degli mRNA E6/E7 di HPV16

Real Time (RT)-PCR quantitativa per la determinazione degli E6*I/II spliced mRNA (RT PCR real-time regioni E6/E7)

PCR real-time su pazienti conizzate e seguite in follow up

13 pazienti con HSIL e infezione da HPV16

CONO				1° Follow up		2° Follow up		3° Follow up		4° Follow up	
HPV16	pap-colpo	margini	cono	HPV16	pap-colpo	HPV16	pap-colpo	HPV16	pap-colpo	HPV16	pap-colpo
22,520.20	HSIL/ANTZ2	FM	CIN3+HPV	1,459.50	LSIL/NTZ	350.1	LSIL/NTZ	Neg	NEG/NTZ		
720.2	HSIL/ANTZ2	FM	CIN3+HPV	110.1	NEG/NTZ	87.23	NEG/NTZ	Neg	NEG/NTZ		
520.2	LSIL/ANTZ2	FM	CIN3+HPV	160.6	NEG/NTZ	103.12	NEG/NTZ	Neg	NEG/NTZ		
17.8	HSIL/ANTZ2	FM	CIN3	7.7	HSIL/ANTZ2	2.6	NEG/ANTZ1	1.8	NEG/ANTZ1	4.2	NEG/ANTZ1
36.5	HSIL/ANTZ2	IM	IA1	10	HSIL/ANTZ2	Neg	NEG/ANTZ1	Neg	NEG/ANTZ1	Neg	NEG/ANTZ1
28.6	HSIL/ANTZ2	IM	CIN3+HPV	4.5	LSIL/NTZ	1.8	LSIL/NTZ	2.6	ASCUS/NTZ		
26.4	HSIL/ANTZ2	IM	CIN3	9.3	HSIL/NTZ	3.3	NEG/NTZ				
15.9	HSIL/ANTZ2	IM	CIN3+HPV	0.3	HSIL/NTZ	0.2	HSIL/NTZ	1.3	HSIL/NTZ	3.4	HSIL/NTZ
6.8	HSIL/ANTZ2	IM	IA1	3.9	HSIL/ANTZ2	2	HSIL/ANTZ2	2.3	Ca./ANTZ2		
6.8	HSIL/ANTZ2	IM	CIN3	0.2	HSIL/ANTZ2	0.2	HSIL/ANTZ2				
6.7	HSIL/ANTZ2	IM	IA1	0.3	LSIL/NTZ	0.6	LSIL/NTZ	0.3	LSIL/NTZ	3.2	LSIL/NTZ
4.1	HSIL/ANTZ2	IM	CIN3+HPV	0.8	HSIL/NTZ	0.4	NEG/NTZ	1.2	NEG/NTZ		
1.3	HSIL/ANTZ2	IM	CIN3	0.4	LSIL/ANTZ2	1.6	HSIL/ANTZ2				

2° trattamento di conizzazione

- Le pazienti che hanno un'alta carica virale iniziale e mostrano un decremento della carica virale dopo il trattamento risolvono spontaneamente l'infezione
- Le pazienti che hanno una bassa carica virale iniziale e mostrano una carica virale costante dopo il trattamento non risolvono spontaneamente l'infezione e mostrano una persistenza/recidiva della lesione

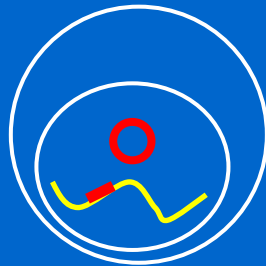
ANALISI DEL DNA DI HPV16

RT-PCR quantitativa per la determinazione dello stato fisico di HPV16

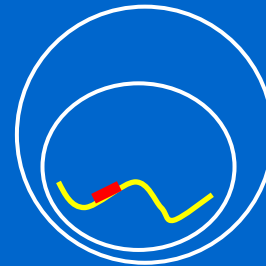
STATO FISICO: $\frac{\text{copie gene E2}}{\text{copie gene E6}}$ $\left\{ \begin{array}{l} \text{DNA episomiale (E2=E6)} \\ \text{DNA misto (E2<E6)} \\ \text{DNA integrato (E2=0)} \end{array} \right.$ \rightarrow Cut-off sperimentale



DNA episomiale



DNA misto



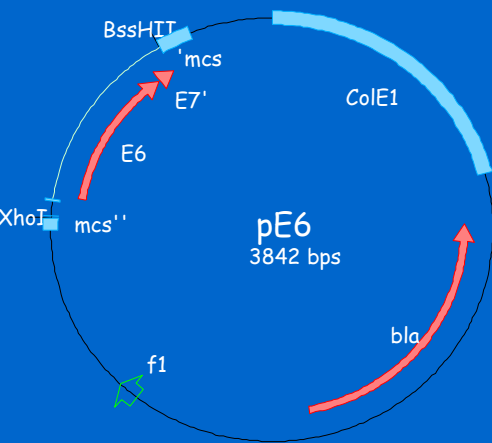
DNA integrato

0.93 è il valore di cut-off determinato per distinguere le forme miste e integrate dalle forme puramente episomiali

Il rapporto E2/E6 è stato misurato 6 volte usando una soluzione standard con DNA plasmidico e sono stati calcolati il valore medio, la deviazione standard e gli intervalli di confidenza (99%)

HPV16 DNA

RT-PCR quantitativa per la determinazione dello stato fisico di HPV16



Per standardizzare il saggio sono stati costruiti due plasmidi:

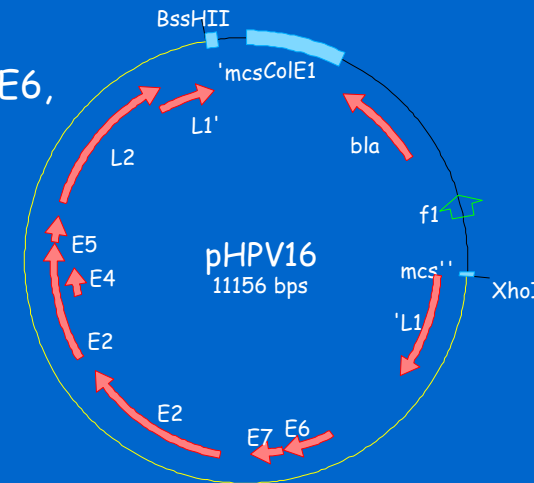
➤ pHPV16, contenente l'intero genoma di HPV16

➤ pE6, contenente solo l' ORF E6.

pHPV16 permette l'amplificazione dei geni E2 and E6,

pE6 l'amplificazione del solo gene E6,

Permettendo così di calcolare il rapporto E2/E6



E6 Primers: è stato amplificato un frammento di 130 bps (424-553, K02718) nell' ORF E6; (software Primer Designer 5.0)

E2 Primers : è stato amplificato un frammento di 184 bps (3352-3535, K02718) nell'ORF E2; (software Primer Designer 5.0)

GAPDH Primers: housekeeping gene per il controllo di amplificazione (Gravitt et al., 2002)

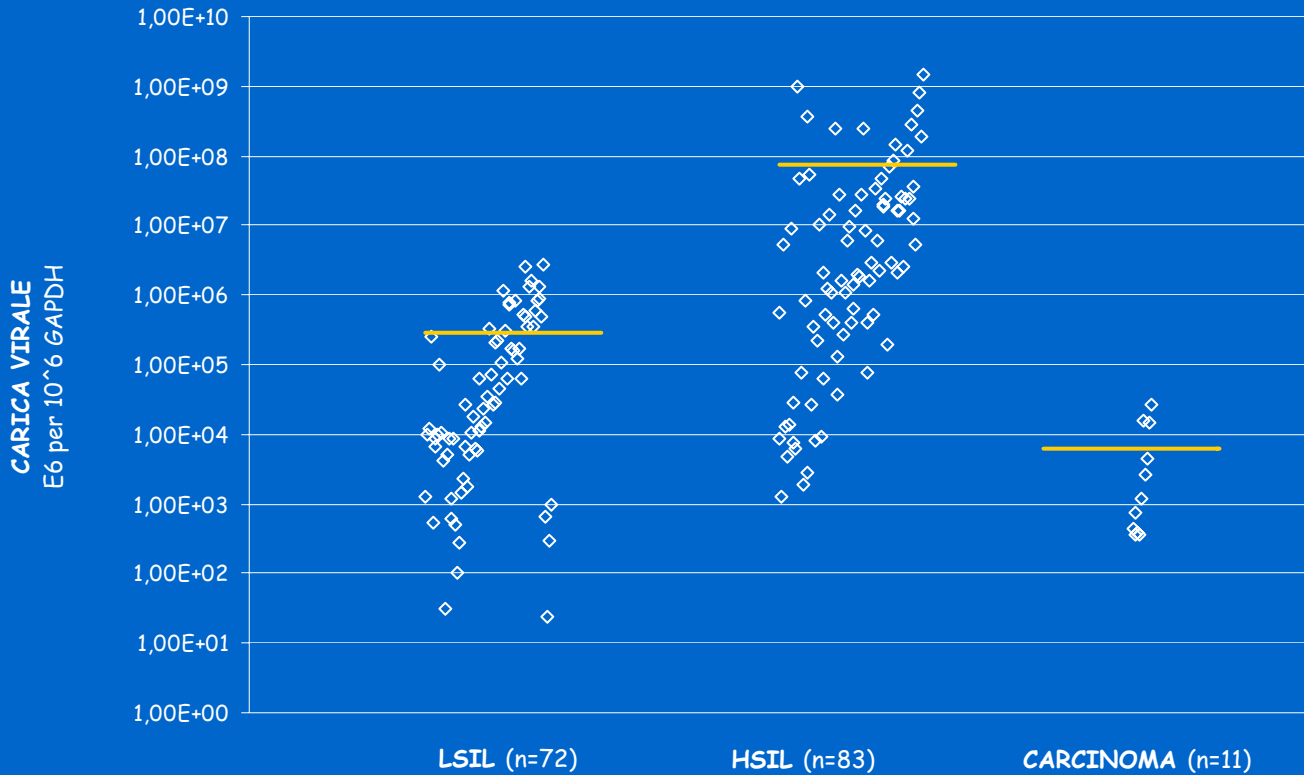
CAMPIONI CITOLOGICI

166 campioni citologici cervicali positivi per HPV 16*:

- 72 LSIL (43,37%)
- 83 HSIL (50,01%)
- 11 (6,62%) carcinomi microinvasivi a cellule squamose

*campioni saggiati mediante PCR-ELISA, risultati positivi ad HPV16 e negativi ai genotipi: 18,31,33,35,45,52, 58

CORRELAZIONE GRADO LESIONE - CARICA VIRALE



P<0.001 HSIL vs. LSIL
 P<0.001 HSIL vs. carcinoma
 P=0.003 carcinoma vs. LSIL

	MEDIA	RANGE
LSIL	2.83E+05	2.40E+01 - 2.74E+06
HSIL	7.27E+07	1.25E+03 - 1.49E+09
Carcinoma	6.10E+03	3.54E+02 - 2.60E+04

Carica virale HSIL/LSIL = 2.67E+02

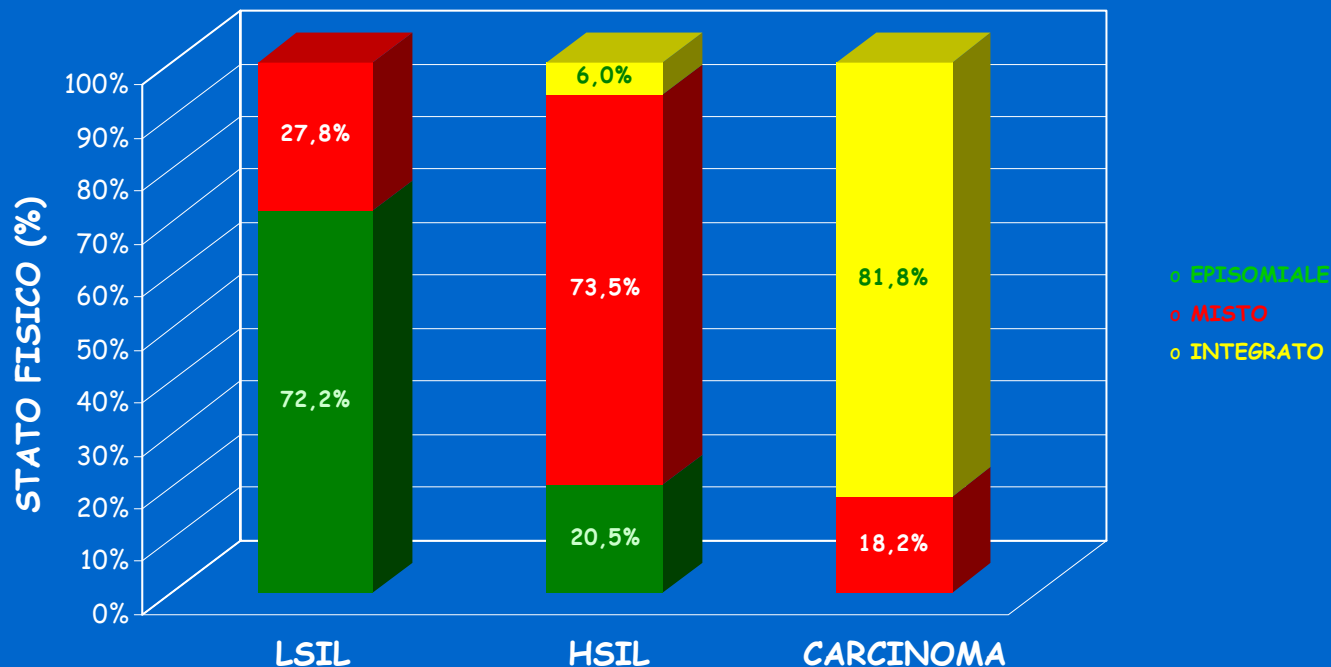
Carica virale HSIL/ carcinoma = 1.19E+04

Carica virale carcinoma/ LSIL = 2.16E-02

Nelle HSIL la carica virale è significativamente > rispetto alle LSIL (P< 0.001) e ai carcinomi (P< 0.001)

Nei carcinomi la carica virale è significativamente < rispetto alle LSIL (P= 0.003)

CORRELAZIONE GRADO LESIONE - STATO FISICO



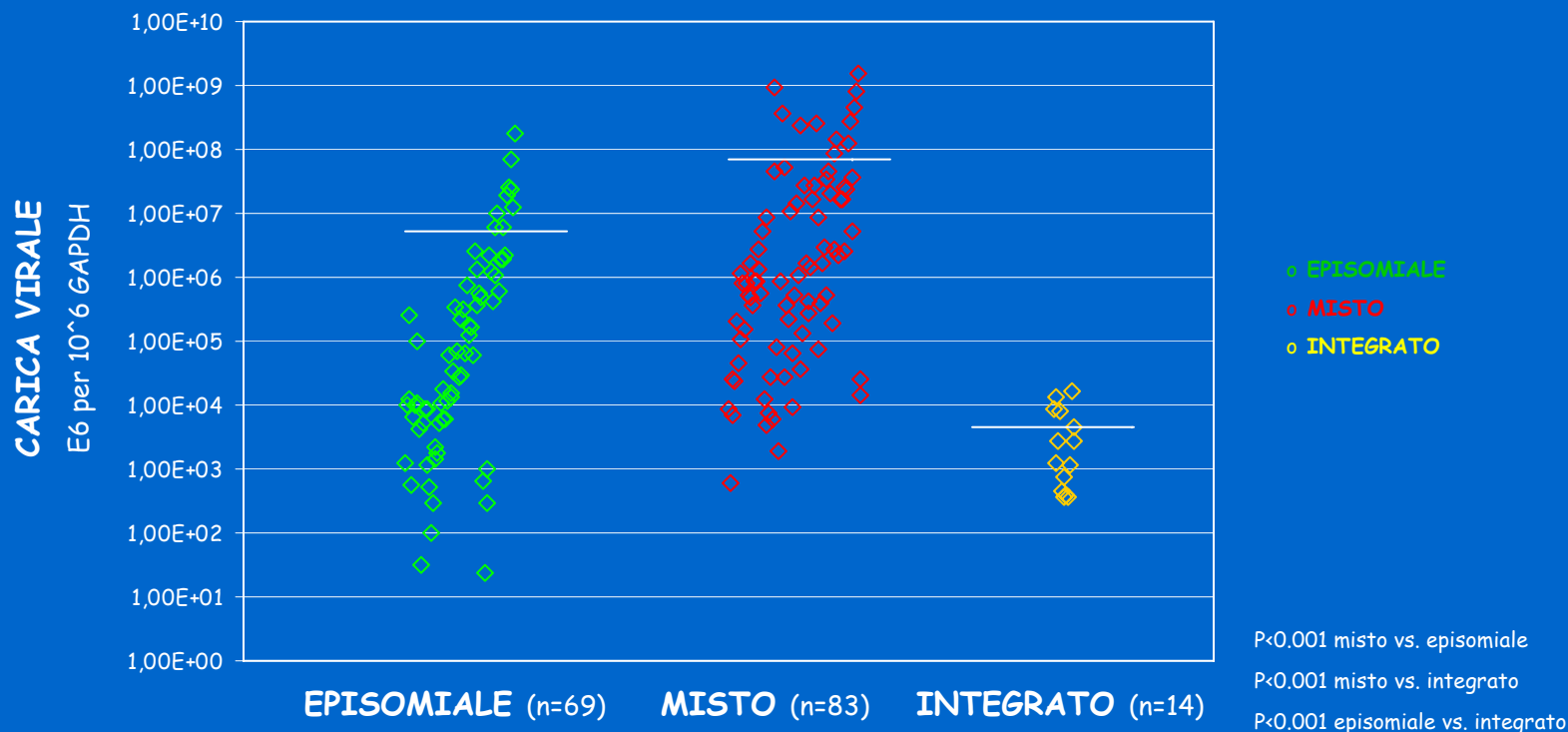
Dei 166 campioni analizzati 69 hanno DNA episomiale (41.6%), 83 DNA misto (50.0%) e 14 DNA integrato (8.4%)

Il DNA episomiale è maggiore nelle LSIL rispetto alle HSIL (72,2% vs 20,5%) ed è assente nei carcinomi microinvasivi ($P < 0,001$)

Il DNA misto è maggiore nelle HSIL rispetto alle LSIL e carcinomi (73,5% vs 27,8% e 18,2% rispettivamente) ($P < 0,001$).

Il DNA totalmente integrato è maggiore nei carcinomi rispetto alle HSIL (81,8% vs 6,0%) ed è assente nelle LSIL ($P < 0,001$).

CORRELAZIONE STATO FISICO - CARICA VIRALE



	MEDIA	RANGE
Episomiale	5.42E+06	2.40E+01 - 1.83E+08
Misto	6.84E+07	6.26E+02 - 1.49E+09
Integrato	4.41E+03	3.54E+02 - 1.62E+04

Carica virale misti/episomiali = 1.26E+01

Carica virale misti/ integrati = 1.55E+04

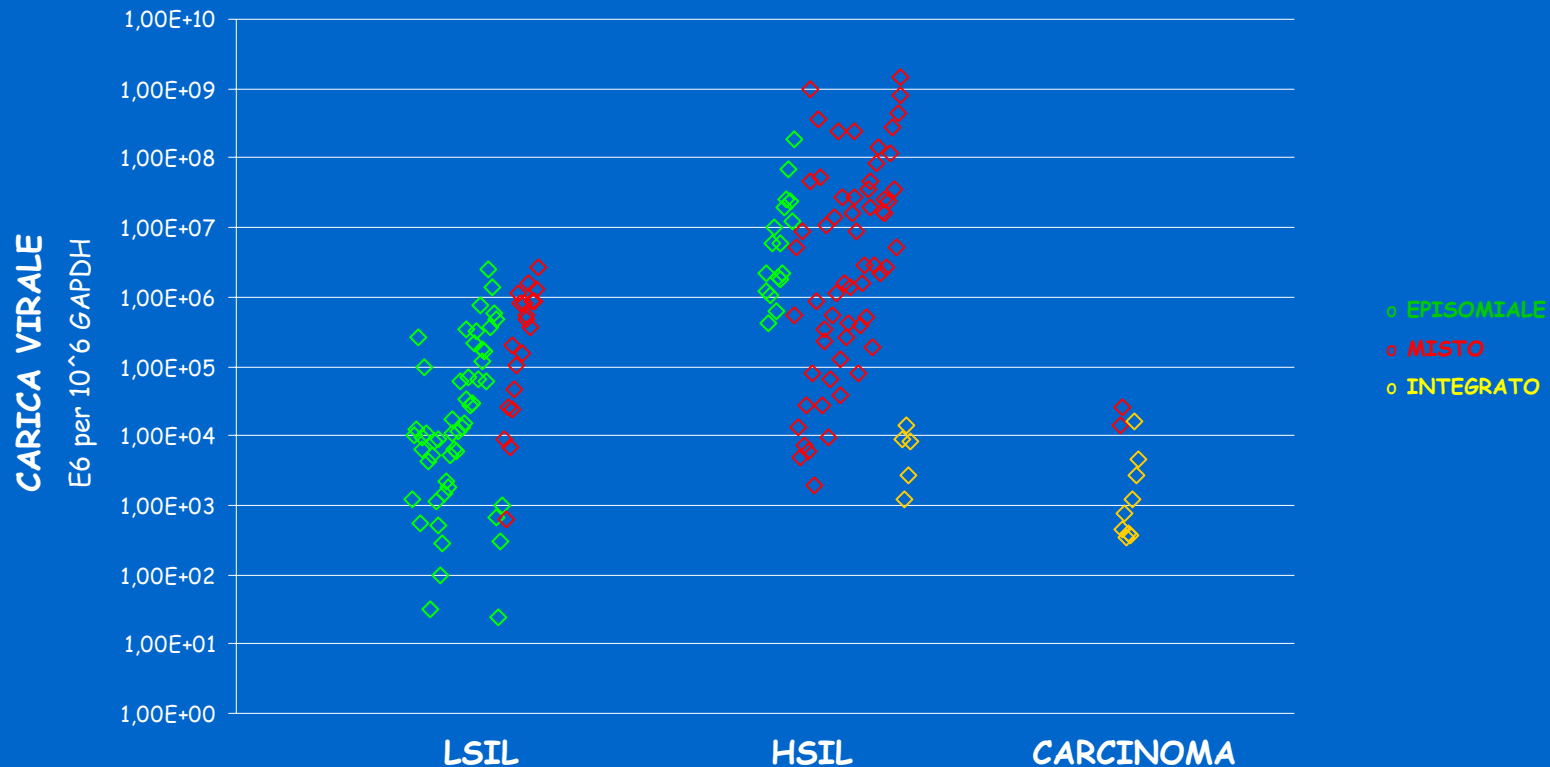
Carica virale episomiali/ integrati = 1.23E+03

Il DNA misto ha una carica virale significativamente > rispetto al DNA episomiale (P< 0.001) e integrato (P< 0.001)

Il DNA episomiale ha una carica virale significativamente > rispetto al DNA integrato (P< 0.001)

CORRELAZIONE

LESIONE-CARICA VIRALE NELLE TRE FORME DELLO STATO FISICO

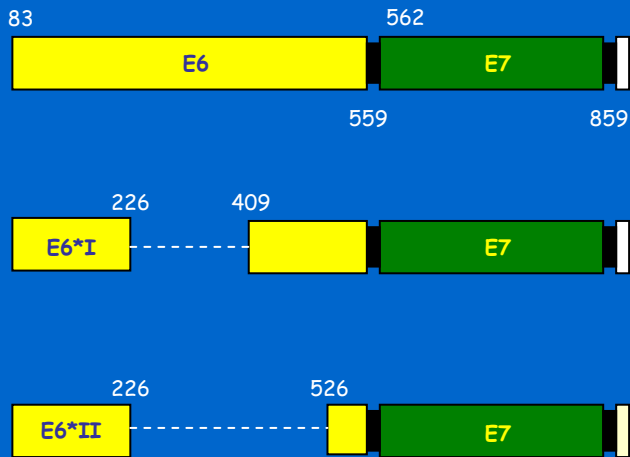


Il DNA episomiale nelle HSIL ha una carica virale significativamente > rispetto alle LSIL (P< 0,001)

Il DNA misto nelle HSIL ha una carica virale significativamente > rispetto alle LSIL (P=0,003) e ai carcinomi (P< 0,001)

Il DNA integrato nelle HSIL ha una carica virale non significativamente diversa rispetto ai carcinomi (P= 0.060)

Analisi degli mRNA E6/E7 di HPV16: REAL TIME E6*I-II



HPV 16 codifica 3 trascritti dalle ORF E6/E7 che sono tradotti in 4 proteine :

- L'intero trascritto codifica la proteina E6
- I trascritti E6*I E6*II codificano per le proteine omologhe e per la proteina E7

Poiché l'integrazione del genoma virale nel genoma cellulare aumenta l'espressione delle proteine E6/E7, abbiamo analizzato la presenza dei trascritti E6*I-II e lo stato fisico del genoma virale.

ANALISI mRNA: REAL TIME E6*I-II

Saggio di RT-PCR Real time E6*:

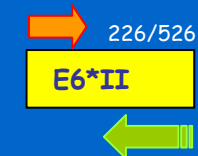
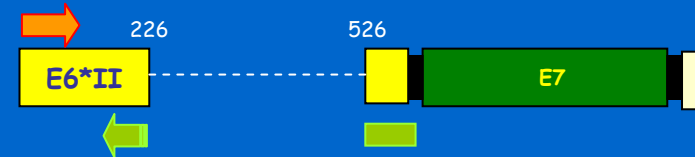
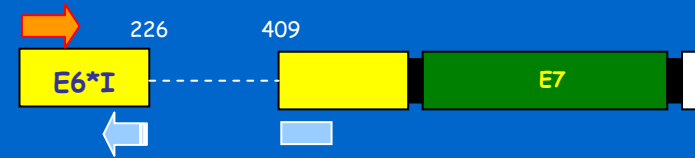
- ✓ 1 primer senso comune per i trascritti E6*I e II
- ✓ 2 primer antisenso a ponte sull'introne
- ✓ Lunghezza dei cDNA: 124 bps

Amplificazione selettiva dell'mRNA

Possibilità di quantificare le singole specie di mRNA

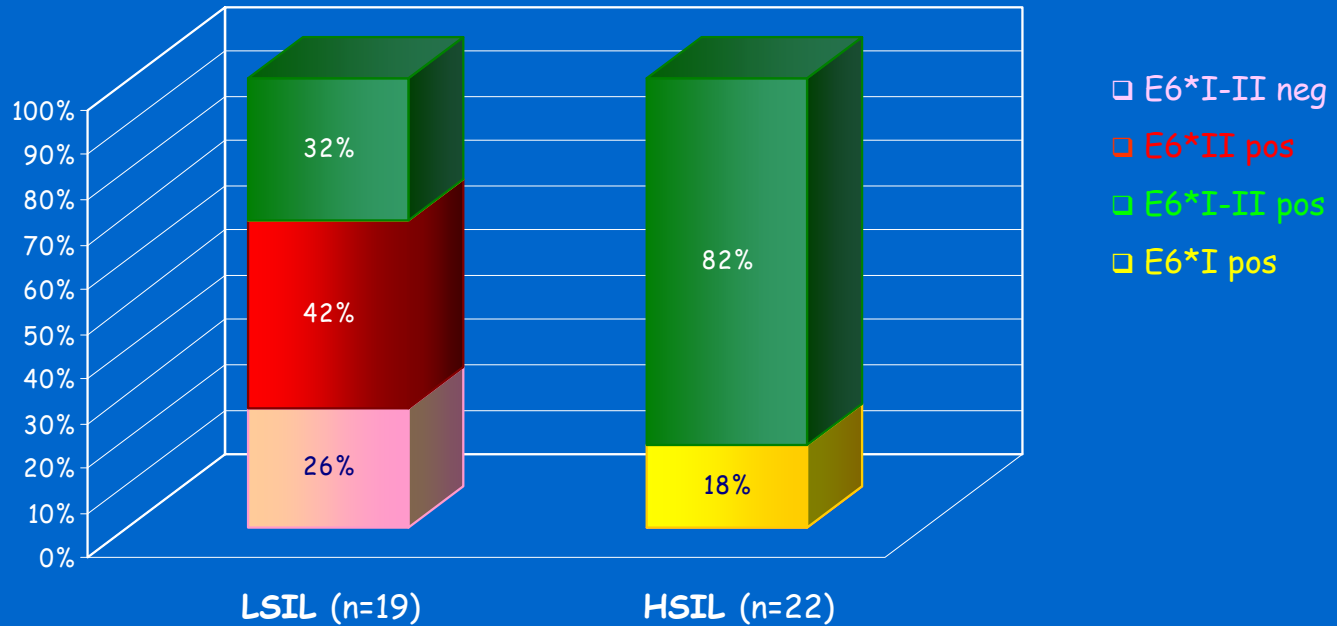
Saggio di RT-PCR Real time β -GUS

- ✓ Primer intron-spanning
- ✓ Lunghezza del cDNA amplificato: 81 bps



Con questi saggi sono stati analizzati 41 campioni citologici cervicali positivi al DNA di HPV 16: 19 LSIL, 22 HSIL.

CORRELAZIONE GRADO LESIONE - E6*I-II



LSIL

Il 26% è negativo ad entrambi i trascritti (E6*I e II)

Il 42% è positivo solo a E6*II

Il 32% è positivo ad entrambi i trascritti (E6*I e II)

HSIL

Nessun campione è negativo ad entrambi i trascritti

Il 18% è positivo solo a E6*I

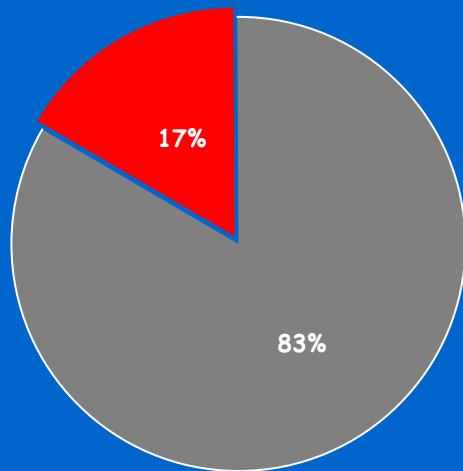
L'82% è positivo ad entrambi i trascritti (E6*I e II)

Nessun campione LSIL è positivo solo a E6*I

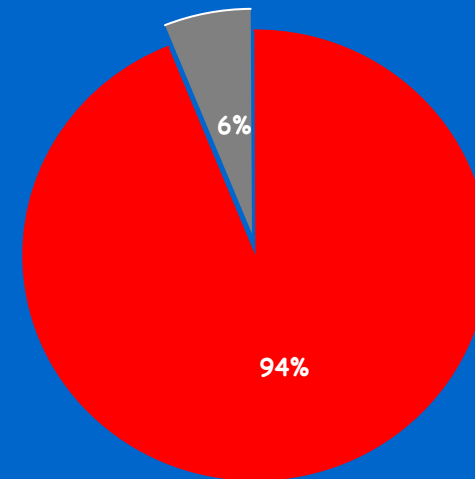
Nessun campione HSIL è positivo solo a E6*II

ANALISI DELLA RATIO E6*I/E6*II IN CAMPIONI POSITIVI AD ENTRAMBI GLI mRNA

Ratio E6*I/E6*II in **LSIL**



Ratio E6*I/E6*II in **HSIL**

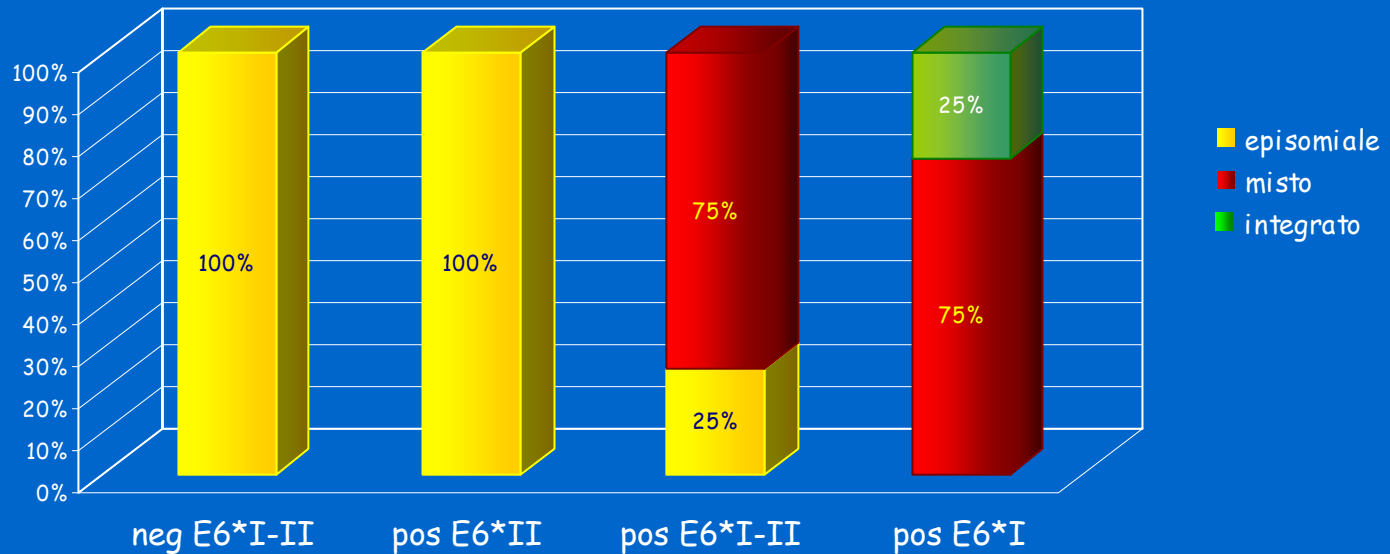


- $E6^*I/E6^*II > 1$
- $E6^*I/E6^*II < 1$

Solo nel 17% delle LSIL $E6^*I > E6^*II$

Nel 94% delle HSIL $E6^*I > E6^*II$

CORRELAZIONE E6*I-II-STATO FISICO DNA



I campioni negativi ad entrambi i trascritti o positivi al solo trascritto E6*II presentano DNA allo stato episomiale nel 100% dei casi

La maggior parte dei campioni positivi ad entrambi i trascritti presenta DNA allo stato misto (75%)

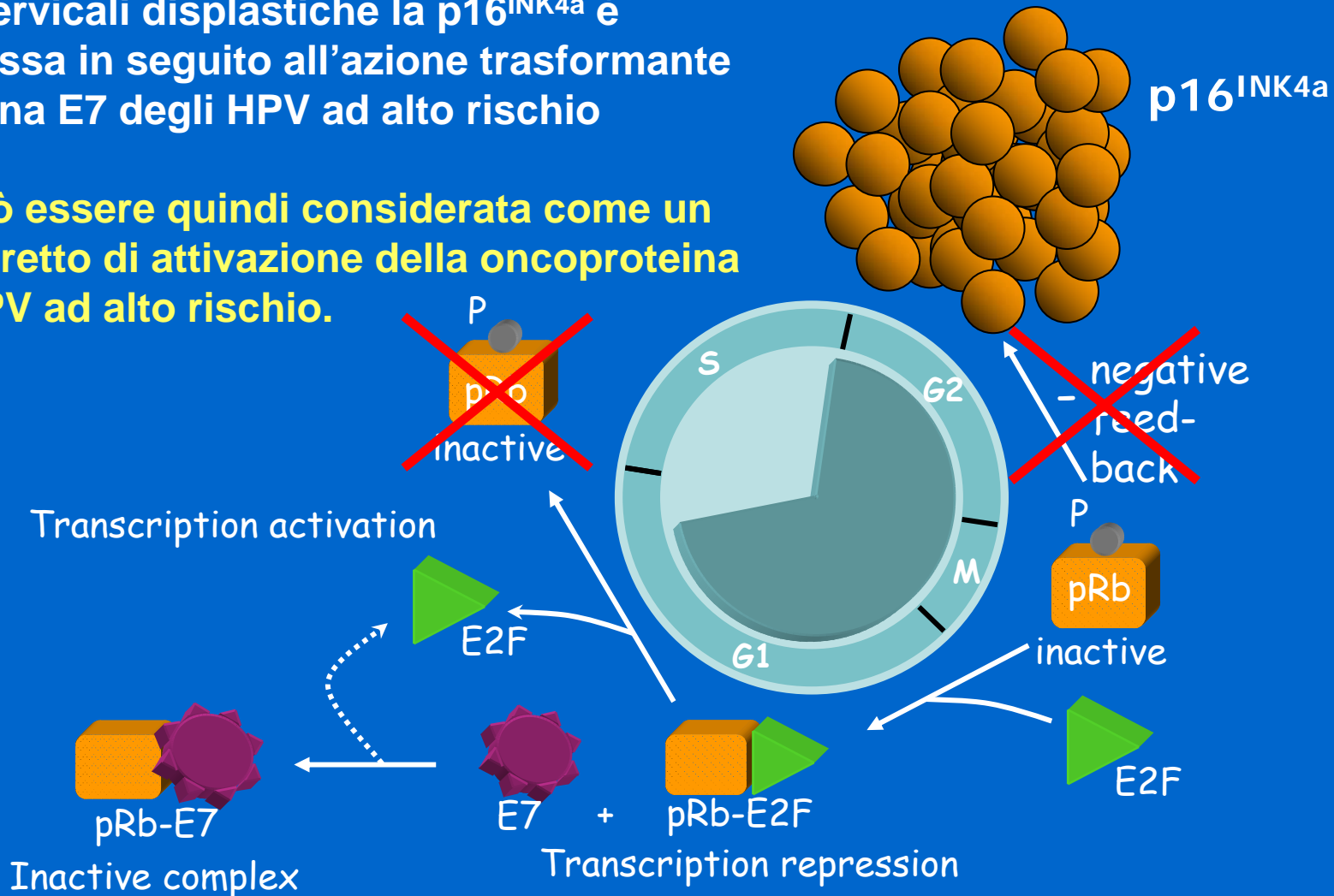
I campioni positivi al solo trascritto E6*I presentano DNA allo stato misto (75%) ed integrato (25%), nessun campione ha DNA episomiale

Gli stati misto ed integrato correlano con l'espressione di entrambi gli mRNA o della sola specie E6*I

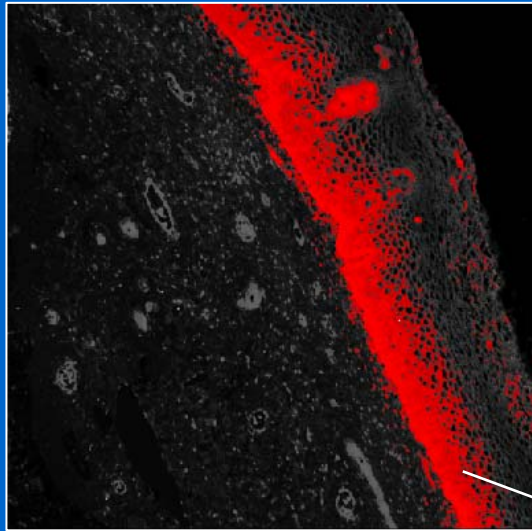
La p16^{INK4a} è una proteina inibitrice delle chinasi ciclina-dipendenti che svolge un importante ruolo nella regolazione del ciclo cellulare. L'espressione della p16^{INK4a} è regolata da un meccanismo a feedback negativo mediato da pRb.

In cellule cervicali displastiche la p16^{INK4a} è sovraespressa in seguito all'azione trasformante della proteina E7 degli HPV ad alto rischio oncogeno.

p16^{INK4a} può essere quindi considerata come un marker indiretto di attivazione della oncoproteina E7 degli HPV ad alto rischio.



MISURA ED ANALISI D'IMMAGINE CL



Il segnale
chemiluminescente
positivo è espresso

come: **P**

$S \times \%POS$

% pos = % epitelio positivo

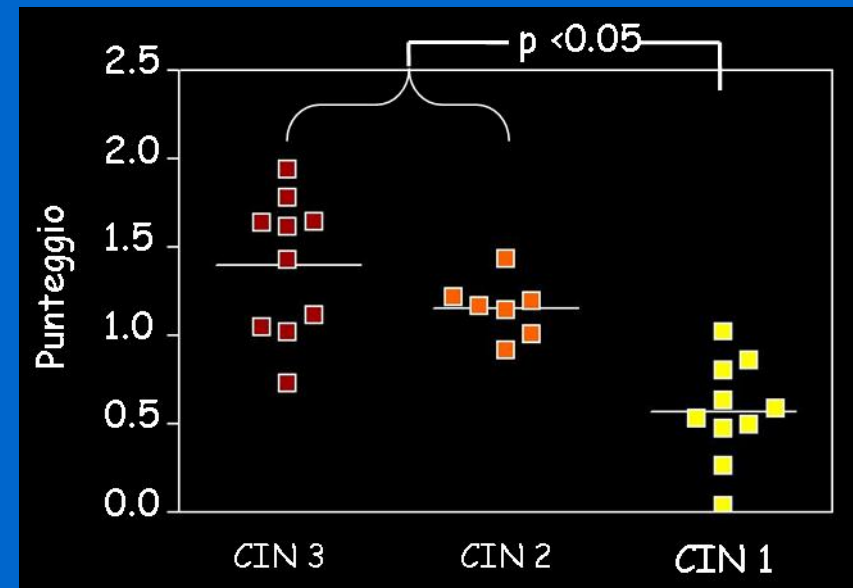
S= segnale chemiluminescente medio

La metodica è stata sviluppata
analizzando 39 campioni (9 negativi,
11 CIN 1, 8 CIN 2, 11 CIN 3).

RISULTATI IHC per P16^{INK4a}

IHC p16 ^{INK4a}					
Diagnosi	N. Camp.	S	% P	P	D.S.
Basso grado	11	1.44	0.39	0.56	0.27
Alto grado	19	1.58	0.72	1.16	0.39

Il punteggio P discrimina in modo statisticamente significativo tra lesioni di basso grado e lesioni di alto grado



CONCLUSIONI

SAGGI DI REAL TIME PCR E2-E6: CARICA VIRALE E STATO FISICO

- ✓ Le HSIL hanno una percentuale di DNA allo stato misto significativamente superiore rispetto alle LSIL. Inoltre gli stati episomiale e misto nelle HSIL hanno una carica virale significativamente superiore rispetto alle LSIL.
- ✓ Sembra che l'integrazione, seppure possa avvenire precocemente nella storia naturale dell'infezione ($\frac{1}{4}$ delle pazienti LSIL mostra DNA allo stato misto), sia favorita da un elevato numero di copie di DNA allo stato episomiale.
- ✓ Il DNA integrato, presente soprattutto nei carcinomi, ha una carica virale significativamente inferiore rispetto al DNA allo stato misto ed episomiale.
- ✓ Questi dati suggeriscono che l'integrazione favorisca la selezione clonale di cellule con DNA integrato a basso numero di copie.

CONCLUSIONI

✓ Alta carica virale e integrazione del genoma virale nel genoma cellulare possono essere marker applicati al follow up di pazienti LSIL per predire il rischio di progressione neoplastica e quindi il management delle pazienti.

SAGGI DI REAL TIME PCR E6*: TRASCritti E6*I E II SOTTOPOSTI A SPLICING:

- ✓ Le HSIL esprimono il solo trascritto E6*I o entrambi i trascritti (E6*I > E6*II).
- ✓ L'espressione di solo E6*I è significativamente correlata alla presenza di lesioni di alto grado.
- ✓ Questi pattern di trascrizione rappresentano marker di progressione neoplastica

P16 OVEREXPRESSION

- ✓ La sovraespressione di P16 può essere considerata un marker indiretto dell'espressione degli oncogeni virali nelle cellule cervicali displastiche.
- ✓ Una determinazione quantitativa obiettiva della P16 può essere usata per distinguere lesioni di basso grado da lesioni di alto grado.