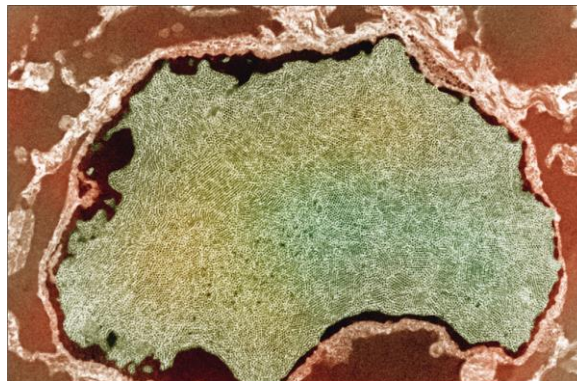




Trieste, 12/06/2017

I Papillomavirus umani storia naturale dell'infezione

Prof. Pierlanfranco D'AGARO

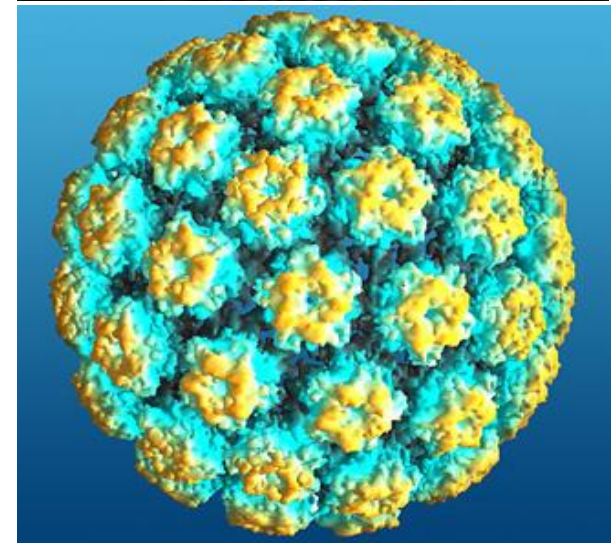


I Papillomavirus umani

- Gli HPV sono piccoli virus privi di mantello con genoma a DNA bicitenario, che infettano l'epitelio stratificato di diverse sedi incluse la cute, il tratto ano-genitale e la cavità orale.
- Sono stati identificati oltre 200 tipi di HPV, circa 60 infettano la mucosa genitale e sono classificati in alto e basso rischio in relazione alla loro associazione con il cancro.
- I tipi a basso rischio (p.e. HPV 6, HPV11) causano lesioni genitali e raramente progrediscono a forme maligne.
- Circa 15 tipi sono considerati ad alto rischio e sono associati al 99% dei cancri alla cervice.
- Inoltre, alcuni HPV ad alto rischio, in particolare HPV16, sono associati con il 25% dei cancri testa-collo.

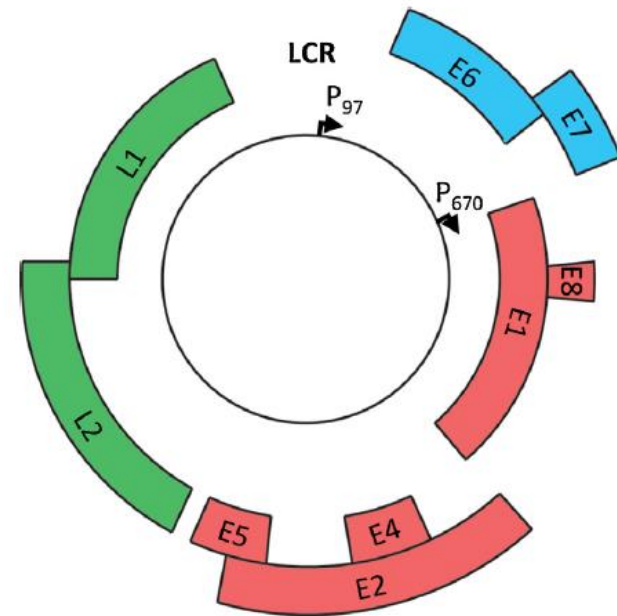
Human Papillomavirus (HPV)

- Famiglia delle *Papillomaviridae*
- Piccoli virus di 52-55 nm con capside costituito da 72 pentameri e privo di mantello
- L1 è la proteina capsidica principale è rappresenta l' 80% del contenuto proteico del virus
- L2 è una proteina capsidica minore, per lo più nascosta all'interno del capside; solo una porzione N-terminale (residui 60–120) è esposta alla superficie.



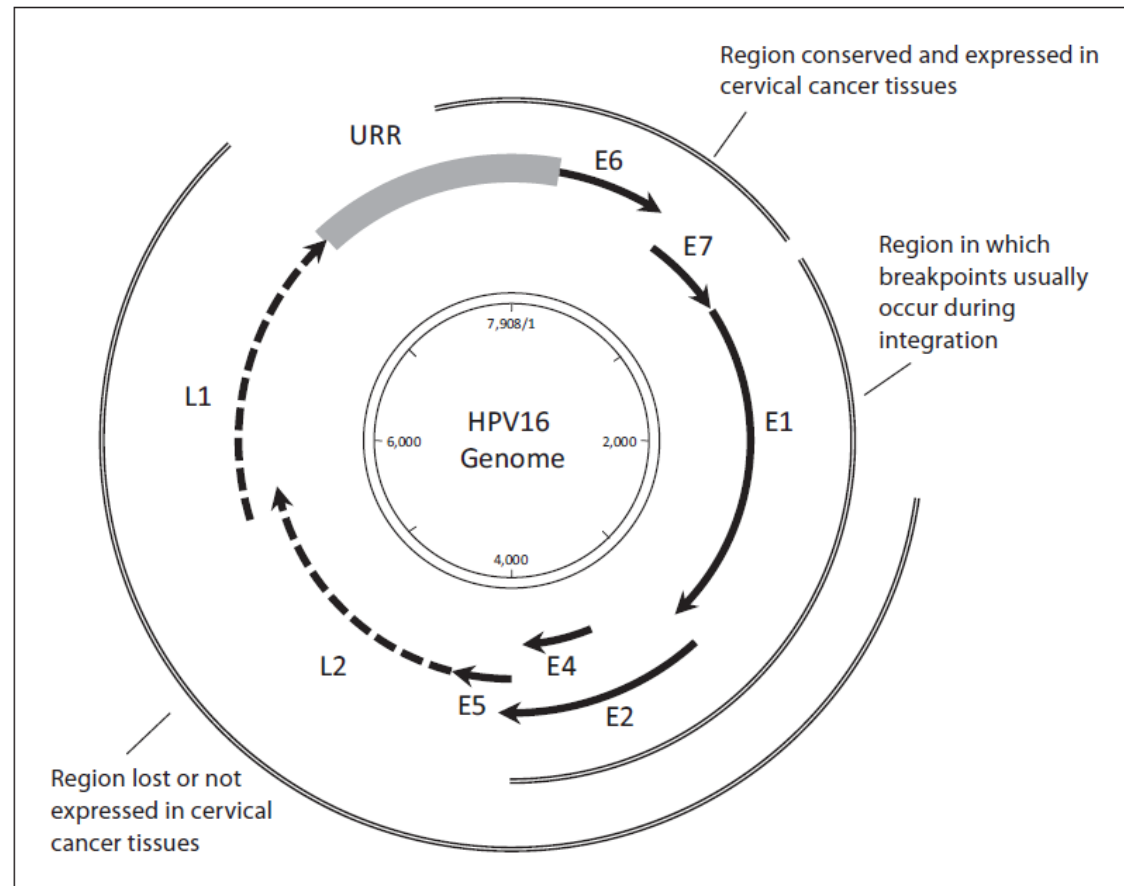
Genoma

- Genoma a DNA circolare a doppia catena di circa 8.000 pb
- Il genoma di HPV viene mantenuto in forma episomiale di circa 8 kb. Nei virioni e nelle cellule infette il DNA virale è associato con istoni, formando un nucleosoma simile a quello del DNA cellulare.
- Trascrizione unidirezionale, tutti i geni sono contenuti su una catena
- Gli ORFs vengono trascritti come messaggeri policistronici da un filamento di DNA e successivamente *spliced* nei messaggeri specifici dei prodotti finali.



Il genoma

- Una regione non codificante di circa 1000 pb (LCR, URR) contiene l'origine di replicazione del DNA ed elementi di controllo trascrizionale.
- Le regioni codificanti vengono classificate in precoci (E) e tardive (L)
- La regione precoce viene espressa nelle cellule infettate e codifica per proteine funzionali / regolatorie (E1-E7)
- La regione L1 e L2 codifica per le proteine strutturali capsidiche e viene espressa solo nelle cellule infettate produttivamente
- Replicazione ed assemblaggio dei virioni nel nucleo



HPV

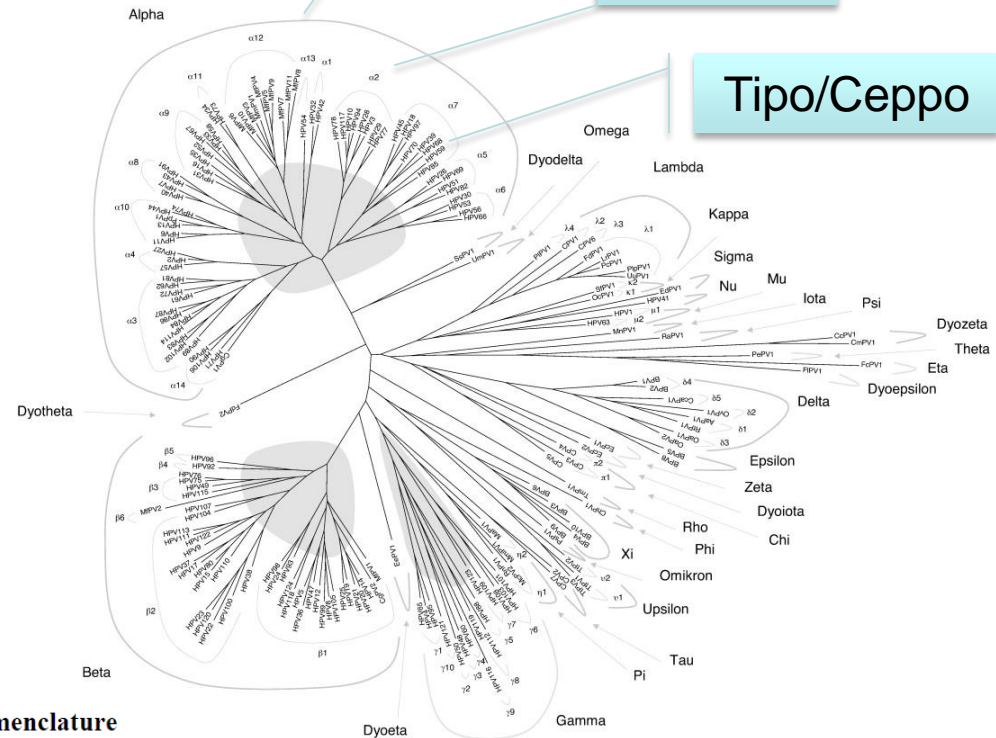
Genere

Specie

Tipo/Ceppo

- La classificazione dei PV in tipi si basa soprattutto sulla sequenza nucleotidica (>10% di differenze nel gene L1) e su alcune caratteristiche biologiche.
- 29 generi di PV (alfa-dioiota)
- Gli HPV umani sono raggruppati in 5 generi: (α , β , γ , μ e ν)
 - Alphapapillomavirus (mucose)
 - Betapapillomavirus (cute)
 - Gammapapillomavirus (cute e mucose)

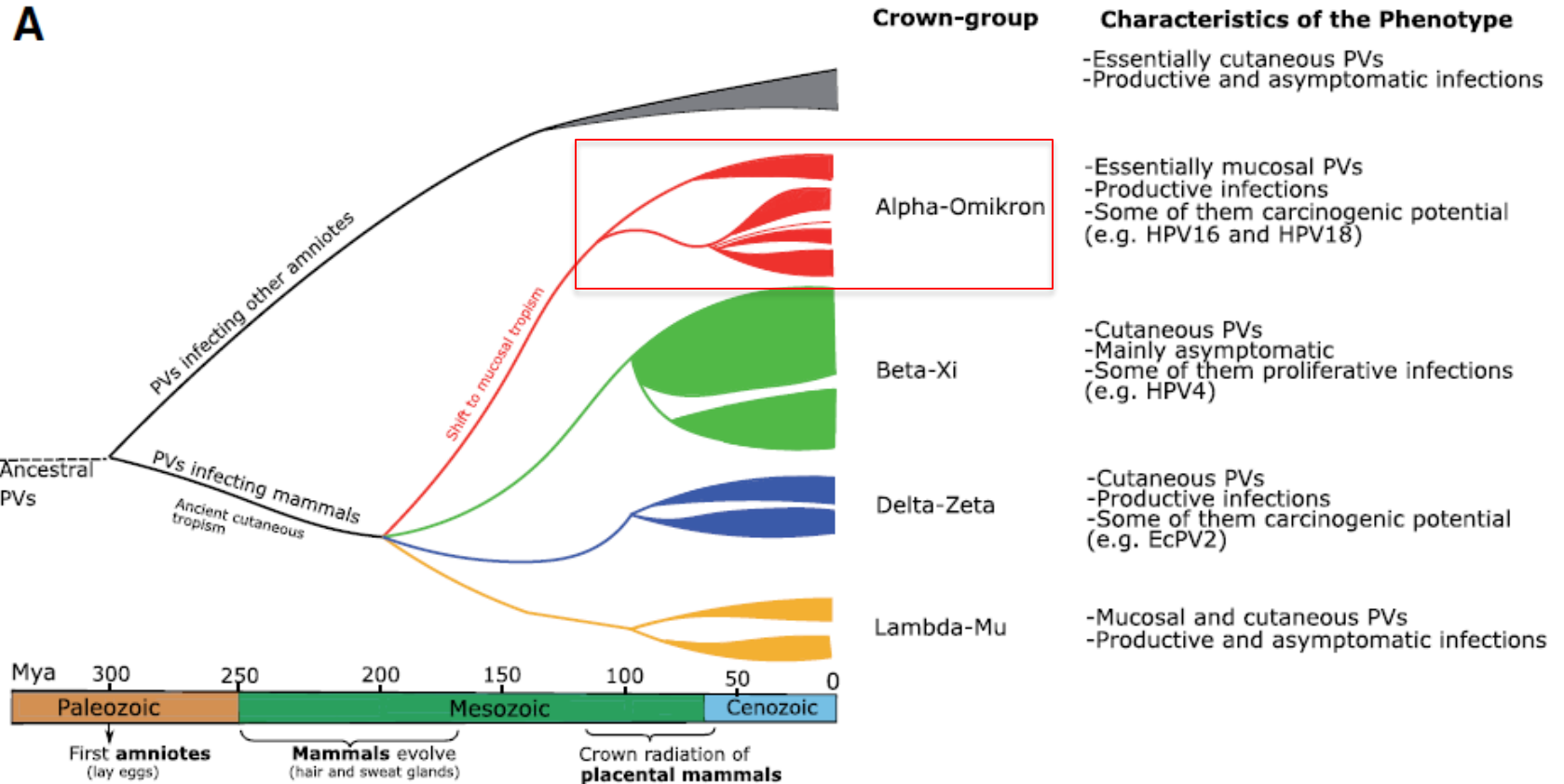
Comparison of commonly used and ICTV Papillomavirus nomenclature



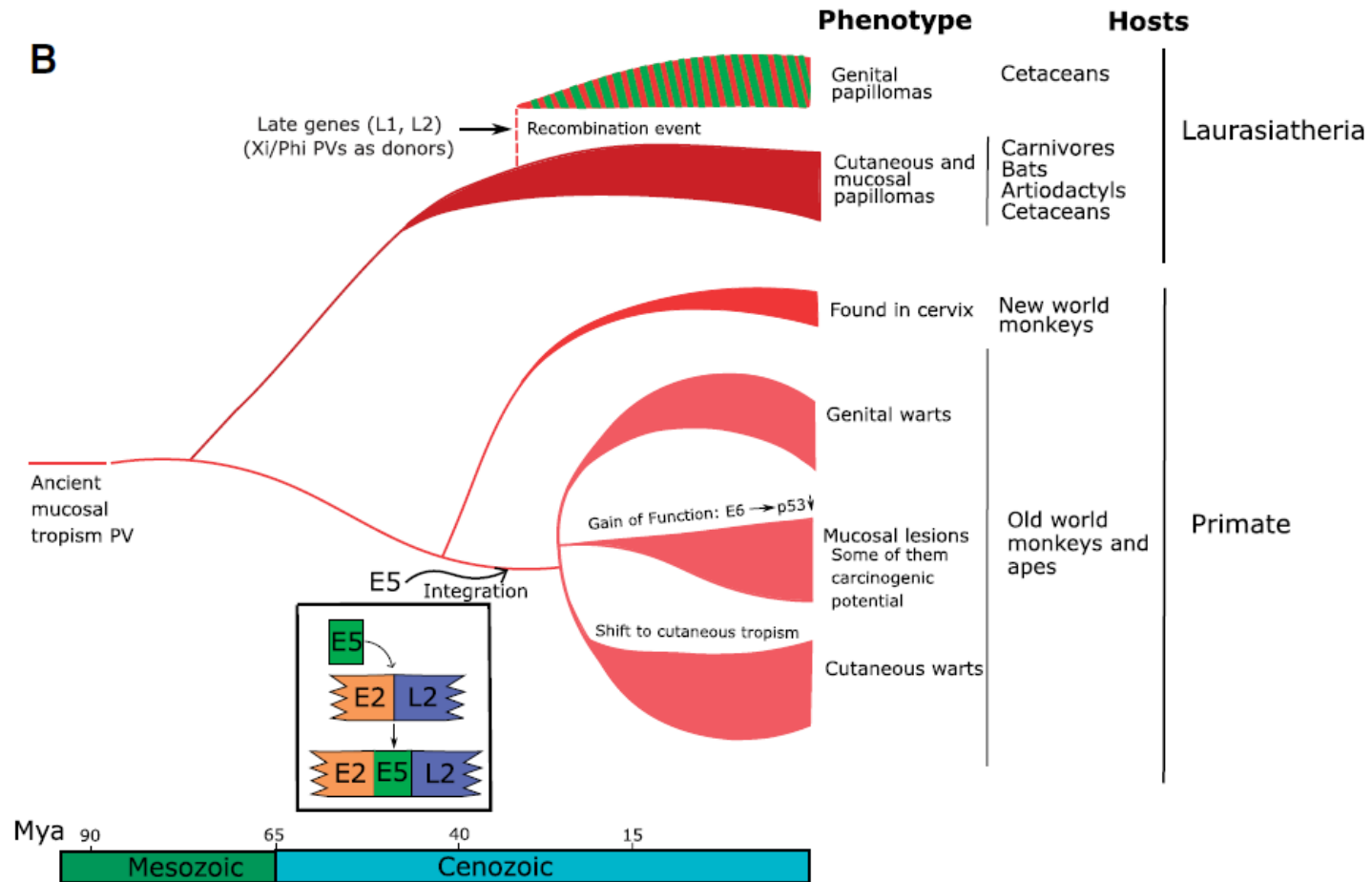
Designation of columns: Scient. abbrev., scientific abbreviation; prev. used abbreviation, previously used abbreviation. For details, see text in article.

Commonly used names	ICTV term
Taxonomic level	
Family: Papillomavirus	Family: <i>Papillomaviridae</i>
Genus: alpha papillomavirus	Genus: <i>Alphapapillomavirus</i>
Species: alpha papillomavirus-9	Species: Human papillomavirus 16
Types: Human papillomavirus 16, 31, 33, etc.	Strains: Human papillomavirus 16, 31, 33, etc.
Type-species: n/a	Type-species: A term that identifies a papillomavirus typical of a genus (Fauquet et al., 2005) or of a species (de Villiers et al., 2004).

Evoluzione dei PV

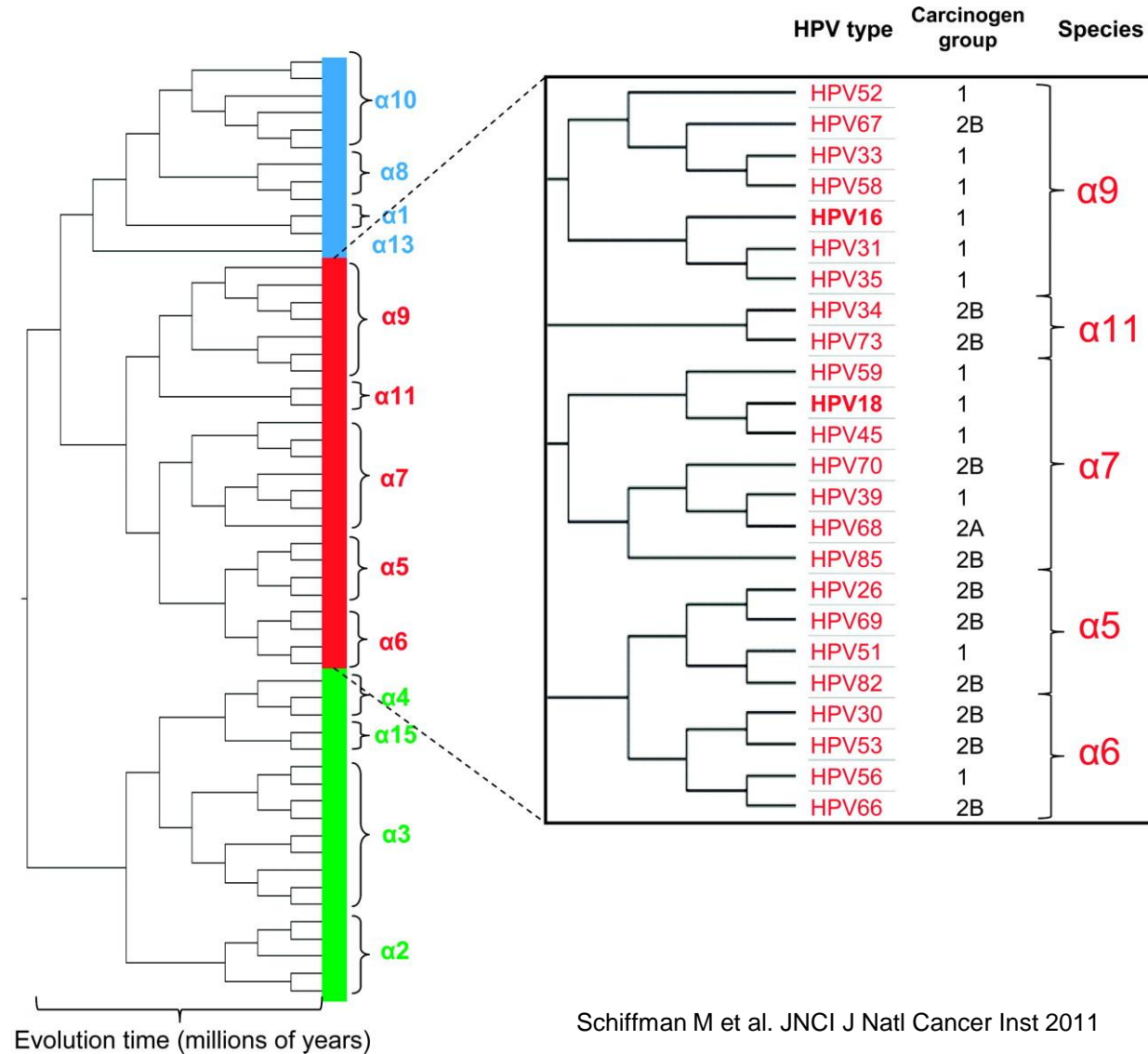


Evoluzione dei PV

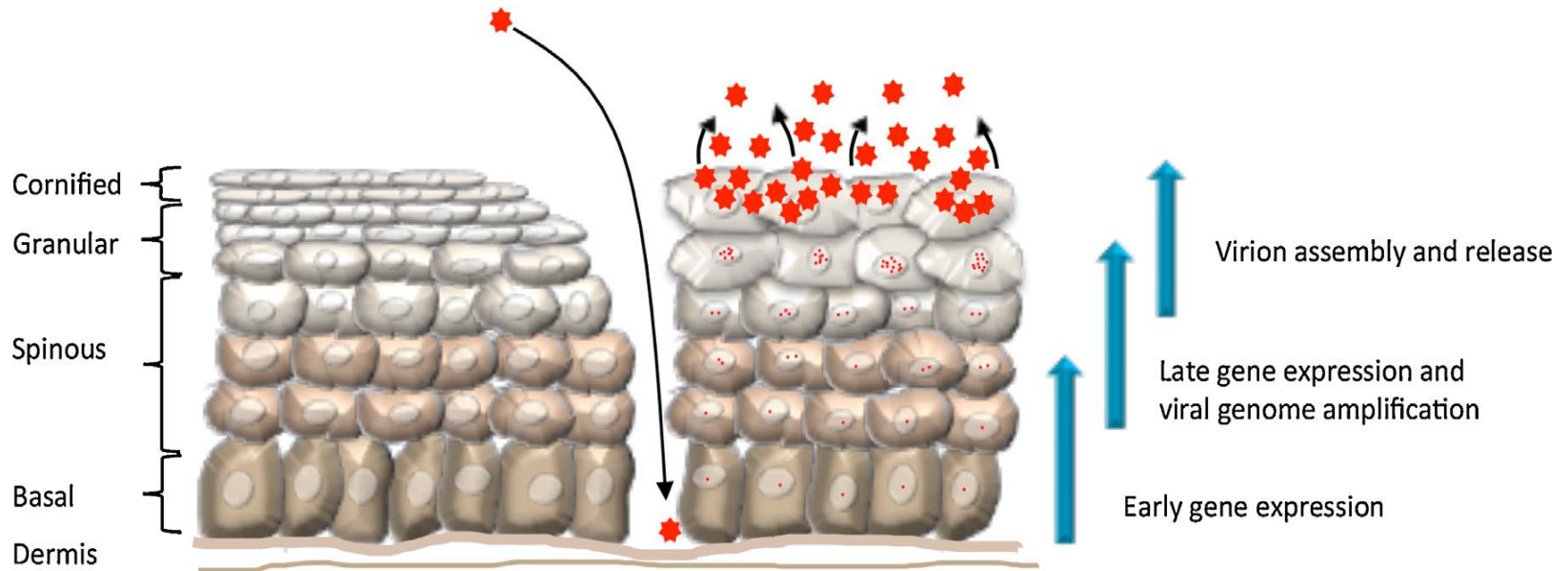


HPV

- L'analisi filogenetica del gene L1 ha incluso quasi tutti gli HPV isolati da tessuti cervicovaginali nel genere α -PV raggruppandoli in 15 specie (α 1- α 15)
- Gli HPV di una specie tendono ad avere caratteristiche simili per oncogenicità e tropismo
- Gli HPV HR sono (almeno) 15 e comprendono i tipi: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (26 e 66).



Replicazione virale



- Gli HPV sono specie specifici e hanno spiccato tropismo per le cellule epitelio squamoso
- Recettori probabili: $\alpha 6$ integrina, eparansolfato e gliccoaminoglicani
- Il ciclo replicativo di HPV è strettamente legato alla differenziazione cellulare dell'epitelio squamoso
- La sintesi del DNA virale e delle proteine capsidiche e l'assemblaggio dei virioni ha luogo nei cheratinociti differenziati

Ingresso nella cellula

I capsidi HPV si legano a componenti della matrice extracellulare (ECM) che è una rete di molecole che supporta la cellula nell'adesione, nella comunicazione cellula-cellula, nella differenziazione e nella organizzazione della struttura.

Ingresso nella cellula

- Il capside di si lega ad alcune molecole nell'ECM e sulla superficie della cellula principalmente attraverso L1.
- Questo legame determina modificazioni conformazionali delle proteine L1 e L2
- In particolare l'esposizione dell'estremità aminoterminale di L2 viene seguita dal clivaggio proteolitico dei primi 12 aminoacidi N-terminali di L2.
- In seguito a queste modificazioni conformazionali che riducono l'affinità all'eparansolfato il virione si lega a ad altri recettori (integrine, tetraspanine, recettori per fattori di crescita e annessina A2)

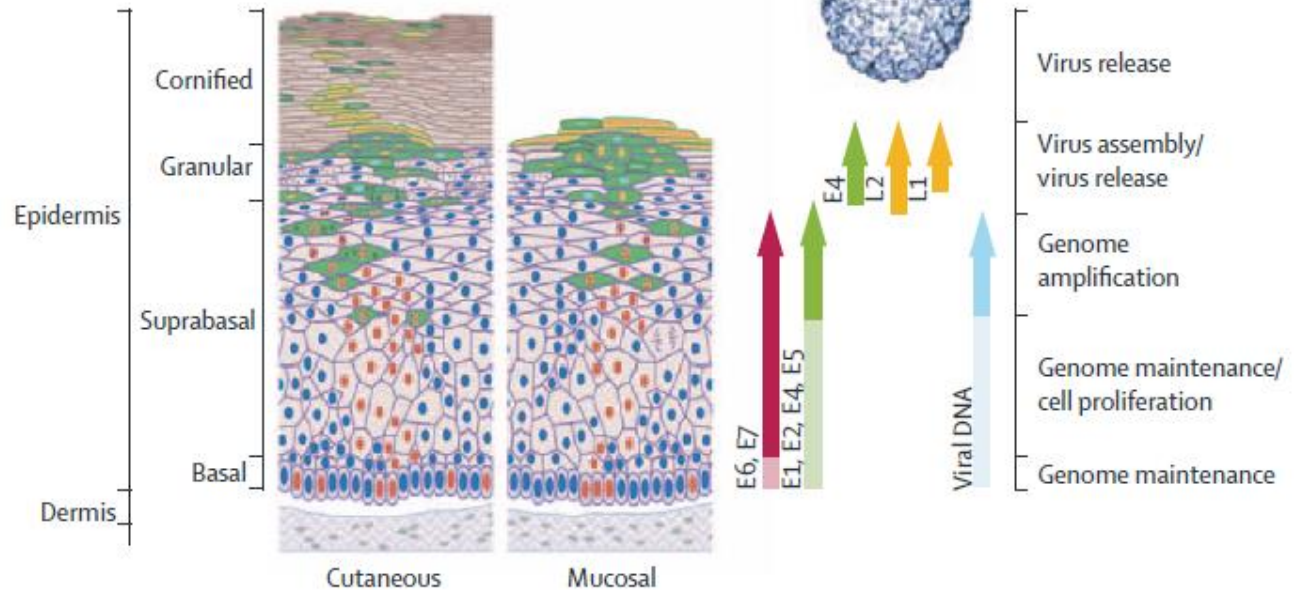
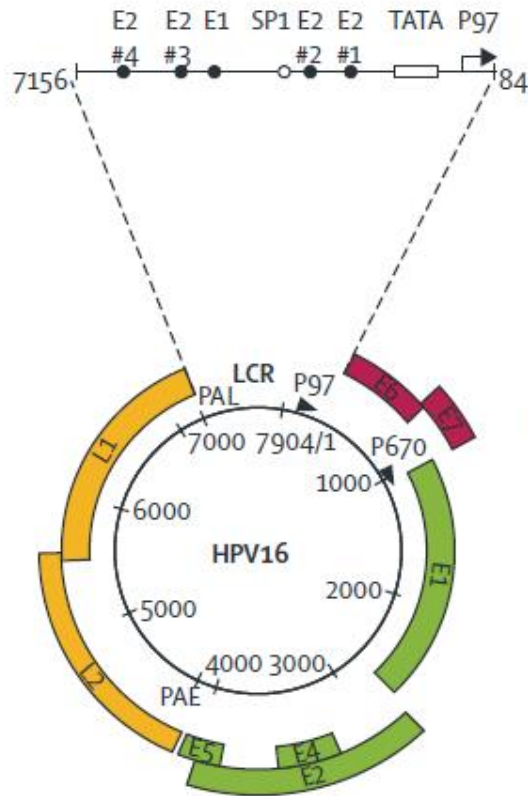
Ingresso nella cellula

- Questi eventi avvengono sulla superficie della cellula e sono essenziali per l'uncoating nel compartimento endocitico e nei successivi spostamenti all'interno della cellula.
- Il virione viene quindi internalizzato con un meccanismo particolare, simile alla micropinocitosi, che porta alla formazione di piccole vescicole endocitiche contenenti il virus.
- La traslocazione del genoma di HPV nel nucleo avviene attraverso le interruzioni della membrana nucleare durante la mitosi cellulare.

Ciclo

- Il ciclo replicativo di HPV è strettamente legato alla differenziazione dei cheratinociti nell'ospite.
- Per la limitata capacità codificante del genoma, l'HPV dipende dai fattori cellulari per la replicazione virale.

Replicazione virale



- L' infezione delle cellule basali (probabilmente attraverso abrasioni o ferite) è necessaria per stabilire l' infezione e la persistenza del virus in queste cellule.
- Stadio I il genoma virale si stabilisce in un numero limitato di copie (50- 100 copie per cellula) nelle cellule infette.
- Stadio II il genoma virale si replica parallelamente al DNA cellulare.
- Stadio III amplificazione del DNA virale nelle in cellule soprabasali, fase replicazione del DNA.
- Espressione dei geni tardivi è ristretta agli strati differenziati dell' epitelio; la contemporanea replicazione del DNA e l' espressione dei geni tardivi porta al packaging del DNA virale e alla morfogenesi dei virioni.

Fase I - Infezione iniziale

- HPV infetta the cellule in attiva moltiplicazione dello strato basale dell'epitelio stratificato.
- Una volta entrati nella cellula i virioni liberano il genoma che entra nel nucleo dove vengono espresse E1, E2, E6 ed E7.
- E2 si lega al sito di origine della replicazione precoce reclutando la E1 elicasi; E1 lega anche fattori cellulari necessari per la replicazione virale (polimerasi alfa, topoisomerasi 1 e la Replication Protein A).
- E1 e E2 sono necessarie per la rapida e temporanea amplificazione iniziale dei genomi che porta alla stabilizzazione ad un basso numero di copie virali (50–100 copie/cell).

Fase II - Mantenimento

- Dopo l'infezione iniziale il genoma virale viene mantenuto ad un numero stabile di copie nello strato proliferativo basale dell'epitelio.
- E2 contribuisce al mantenimento degli episomi virali assicurando un'eguale ripartizione dei genomi HPV nelle cellule figlie al momento della divisione "incatenando" i genomi virali ai cromosomi mitotici dell'ospite.
- E6 ed E7 contribuiscono al mantenimento dei genomi virali creando un ambiente permissivo alla replicazione virale.

Fase III - Produttiva

- Quando una cellula dello strato basale si divide una delle due cellule figlie rimane nello strato basale mentre l'altra inizia il processo di differenziazione.
- La differenziazione attiva il *late promoter* localizzato nell'ORF E7 che porta a elevati livelli di E1 e di E2 per facilitare la replicazione virale e anche di E1^{E4}, E5, L1 e L2.
- La differenziazione attiva l'amplificazione dei genomi virali a migliaia di copie per cellula.
- E4 ed E5 sono associate rispettivamente al rilascio dei virioni e alla immuno-evasione.
- L'espressione delle proteine virali è regolata anche da microRNA che però non sono codificati da HPV.

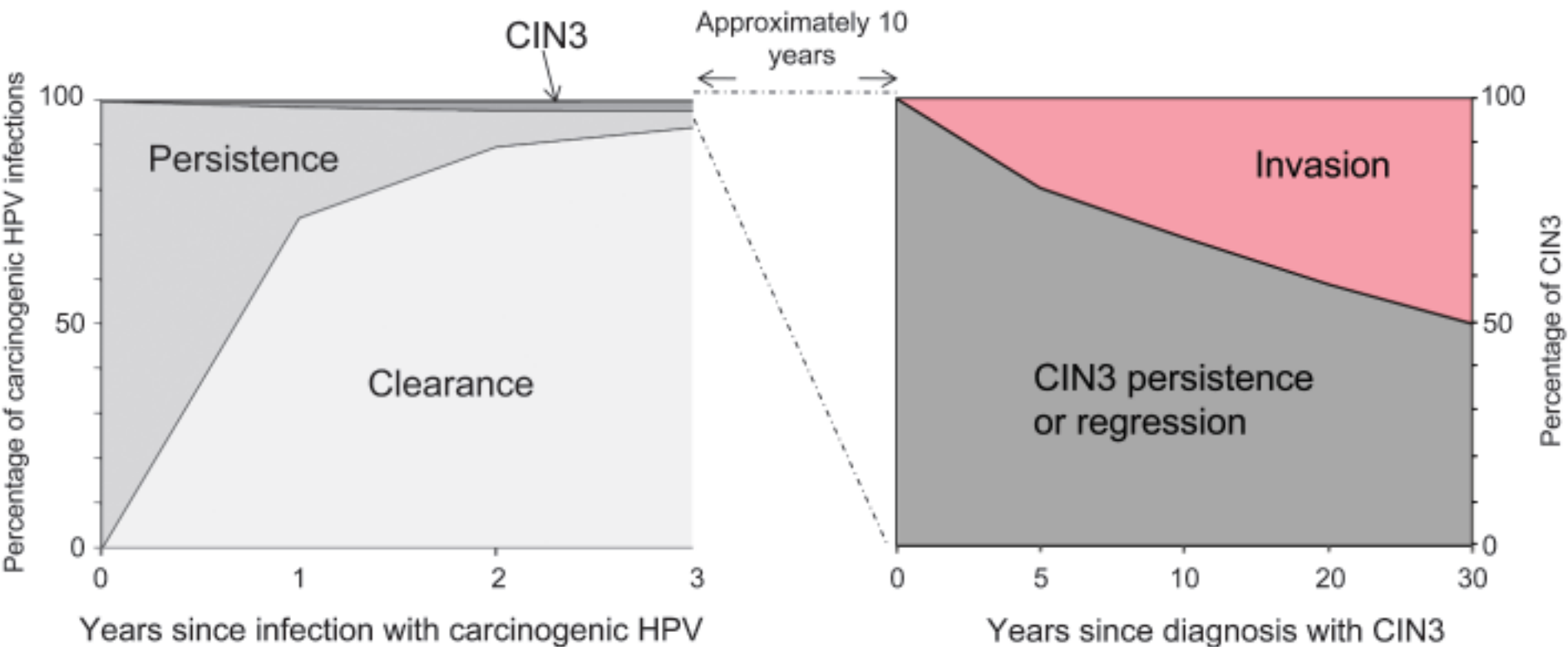
Fase III – Infezione produttiva

- Normalmente le cellule epiteliali destinate alla differenziazione escono dal ciclo cellulare ma HPV deve mantenere le cellule nel ciclo cellulare per poter disporre dei fattori cellulari necessari alla replicazione virale.
- La capacità di E7 di guidare Rb alla degradazione è critica per riportare le cellule post-mitotiche nel ciclo cellulare e fornire un ambiente permissivo alla replicazione virale nelle cellule in differenziazione.
- Inoltre HPV nella replicazione virale utilizza anche le pathways di riparazione del DNA attraverso l'attivazione delle chinasi ATM e ATR DNA.

HPV e tumori

- HPV è associato a:
 - Cancro del collo dell' utero
 - Cancro dell'ano, vulva, vagina e pene
 - Cancro della testa e del collo
 - Papillomatosi respiratoria ricorrente
 - Verruche anogenitali
 - Cancro del Polmone (?)
 - Cancro della vescica(?)

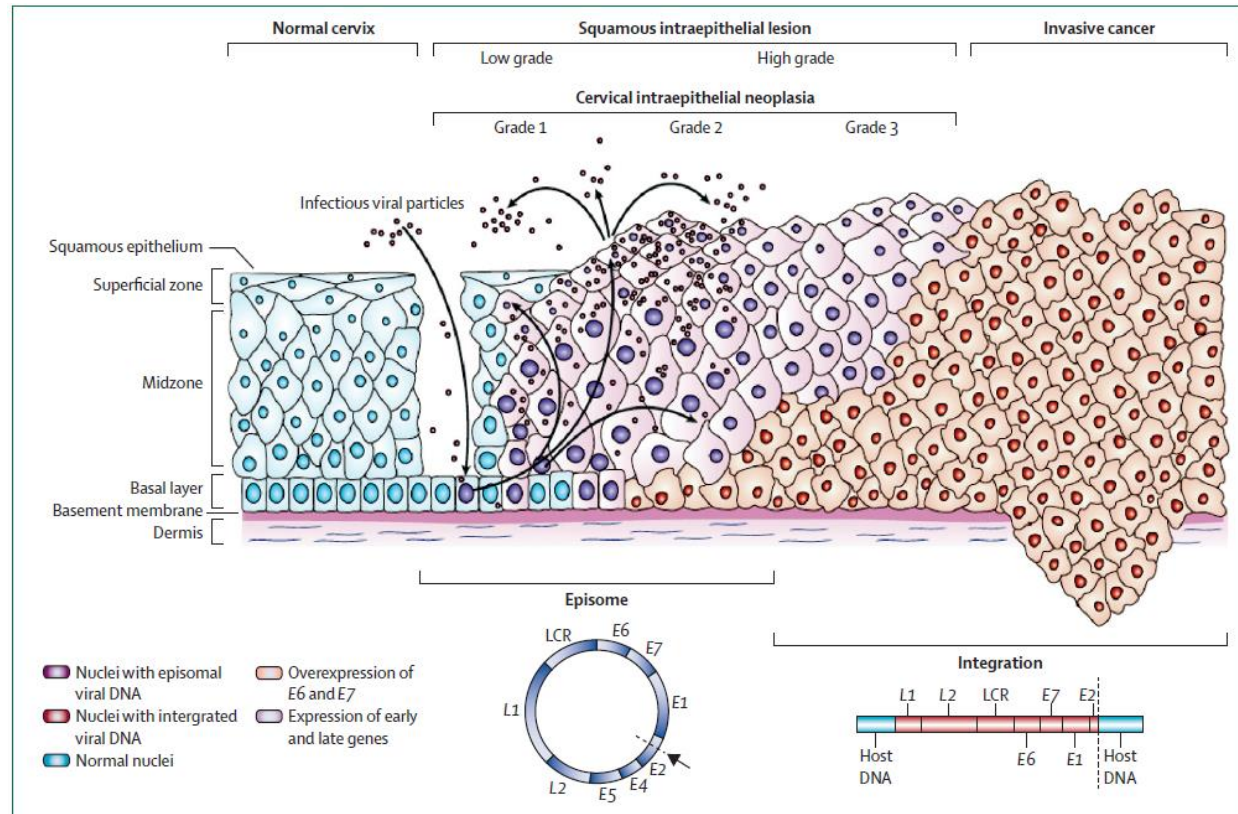
Evoluzione delle infezioni da HPV



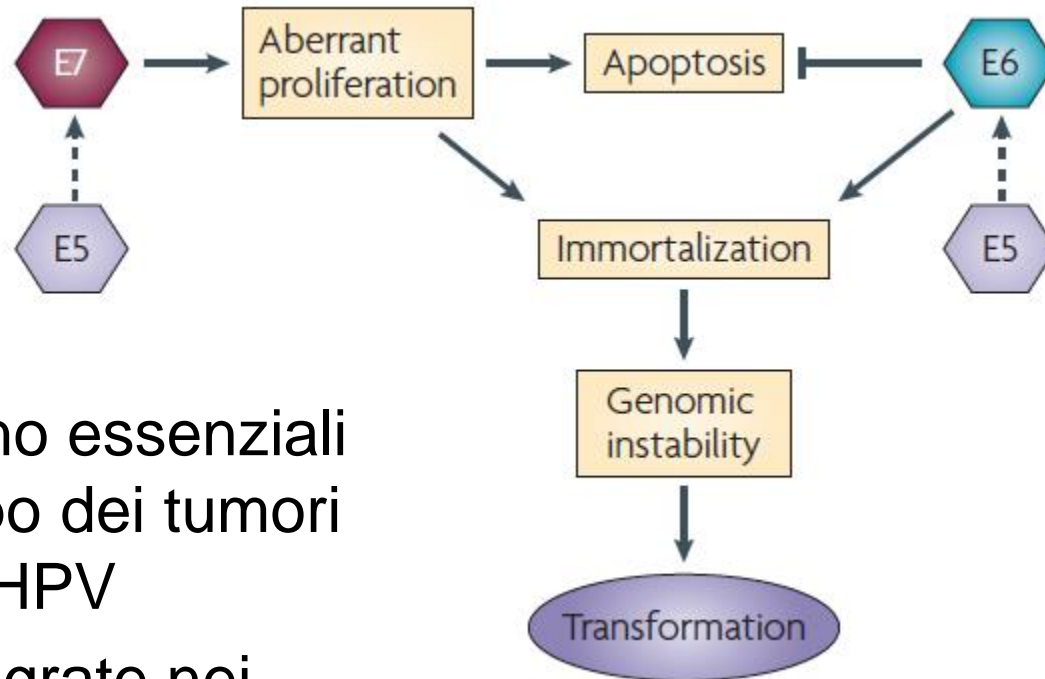
- **Metà delle infezioni da HPV scompaiono dopo 6-12 mesi**
- **Il 90% scompare dopo 2-3 anni**
- **Nel 25-33% delle donne HPV HR+ è presente una citologia anomala**
- **Il rischio di cancro aumenta significativamente per le infezioni persistenti più di 5 anni**

Meccanismi oncogenetici di HPV

- Mantenimento della proliferazione cellulare
- Instabilità genomica delle cellule infettate
- Blocco dell'apoptosi
- Integrazione del genoma virale in quello dell'ospite
- Immuno-evasione

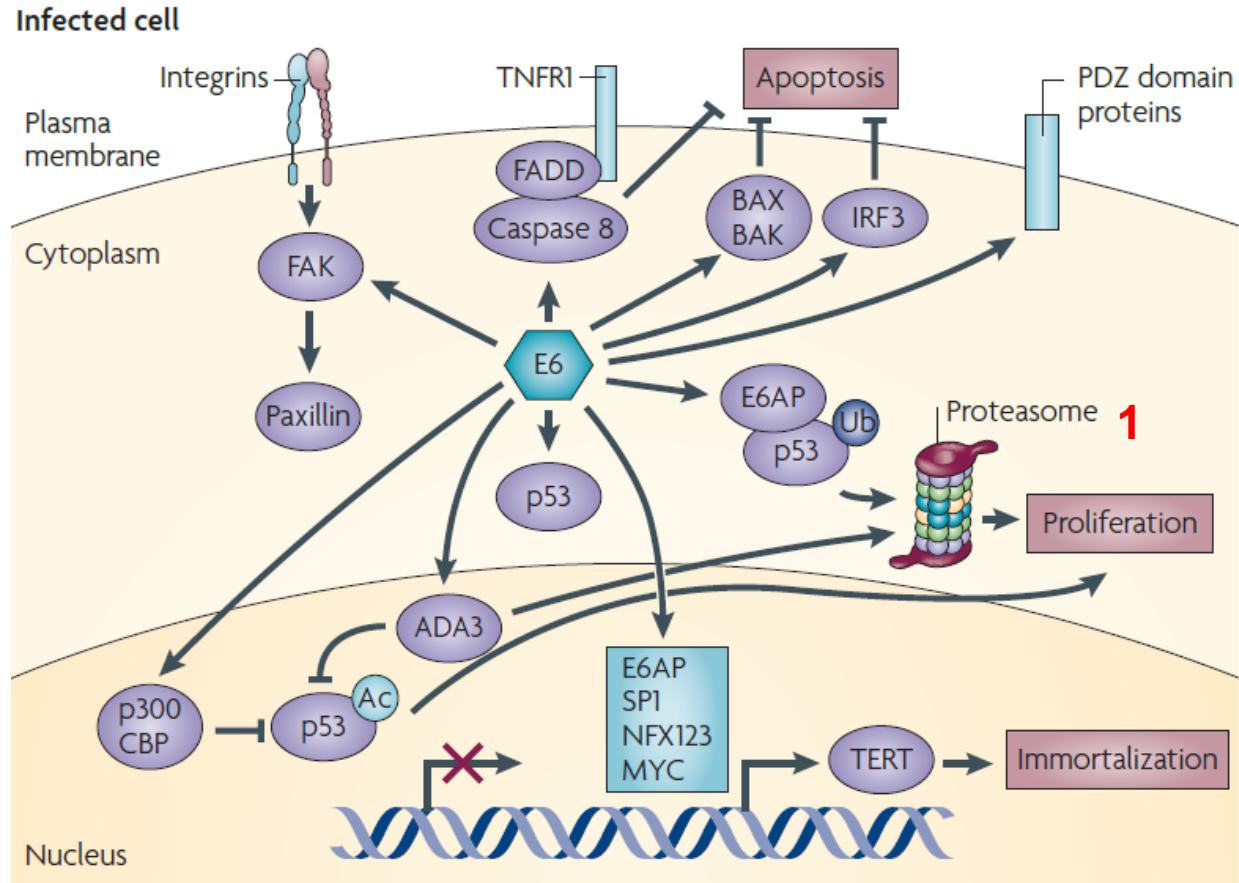


Oncoproteine di HPV

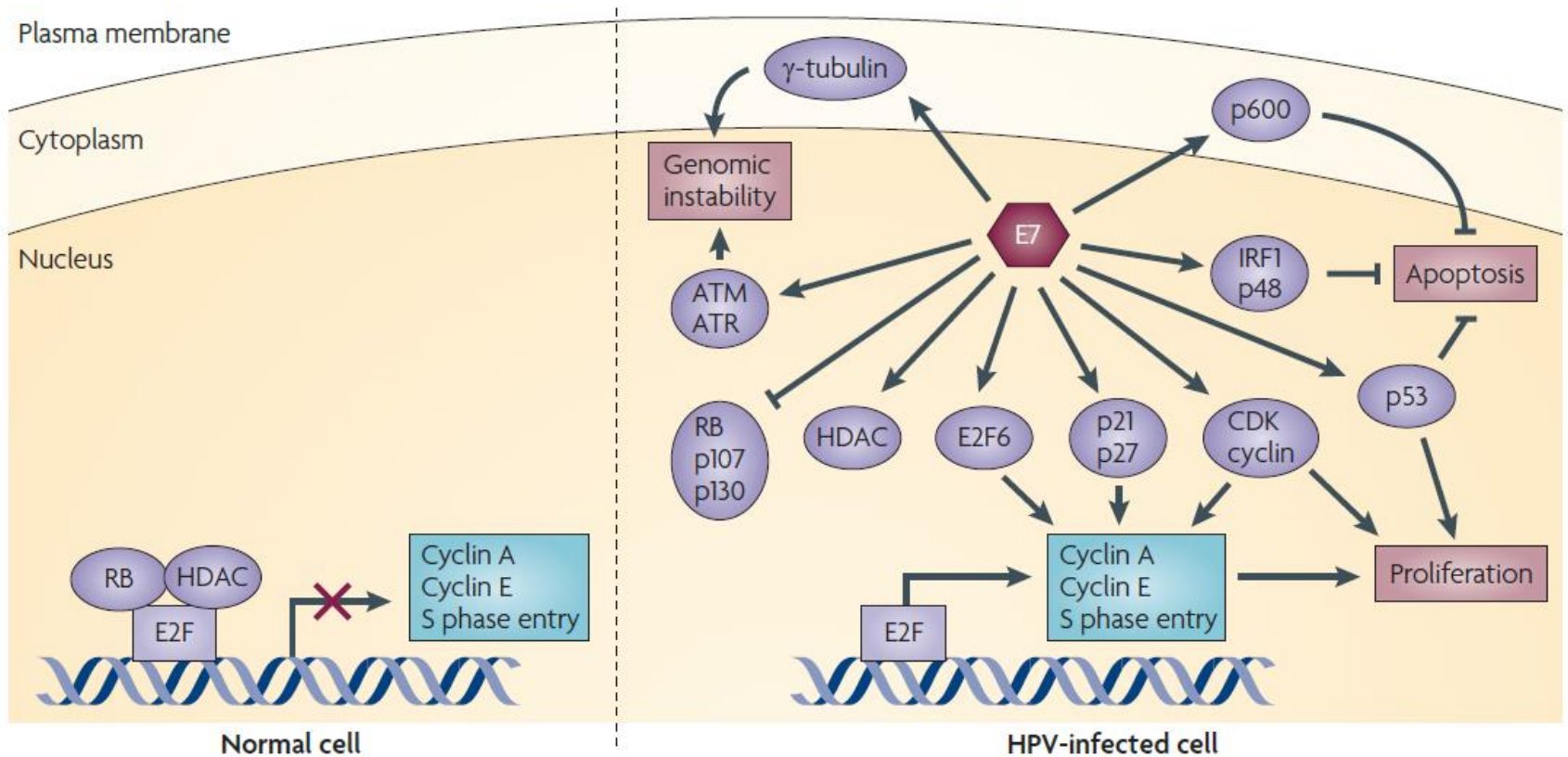


- E6 ed E7 sono essenziali per lo sviluppo dei tumori associati ad HPV
- Le forme integrate nei cromosomi cellulari mantengono l'espressione solo di E6 e di E7

E6 (HR-HPV)



E7 (HR-HPV)

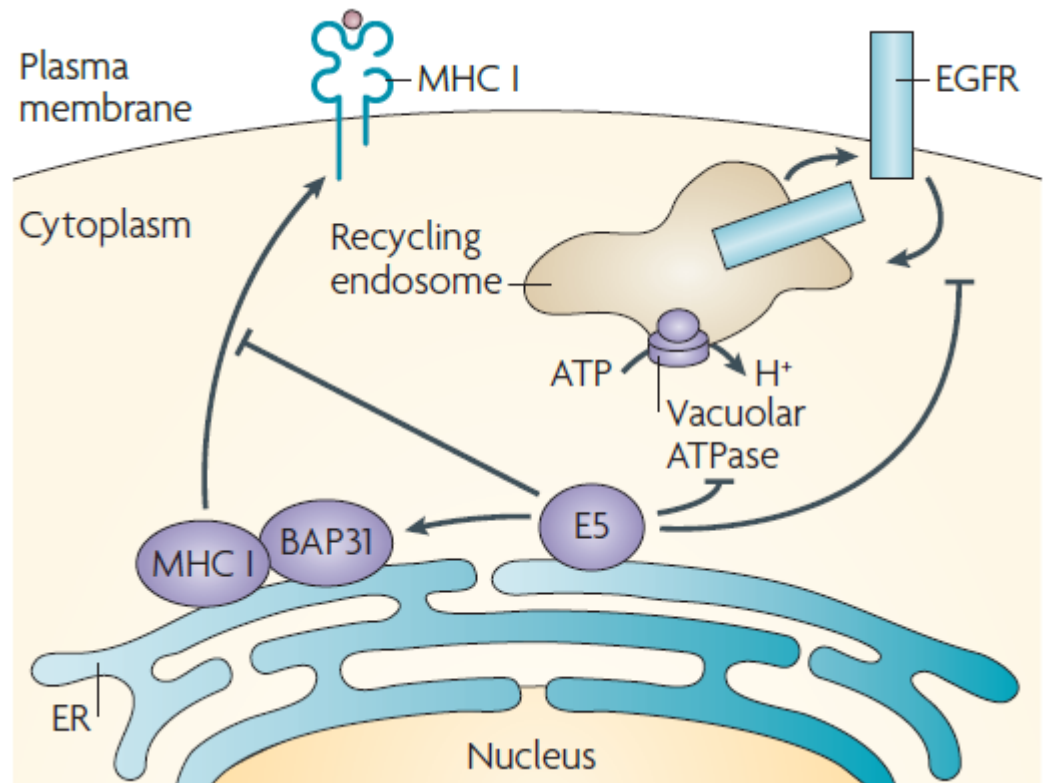


E7 (HR-HPV)

- Induce iper-proliferazione attraverso:
 - legame con proteine RB con dissociazione dei complessi RB-E2F e attivazione della trascrizione dei fattori responsabili del controllo del passaggio G1-S (cicline A ed E)
 - Interazione diretta con E2F6 inibendo la repressione della trascrizione dei geni controllati da E2F
 - Attivazione della degradazione proteosomale delle proteine del complesso RB via ubiquitina con eliminazione di altre attività RB associate come la riparazione del DNA e il mantenimento dell'integrità del genoma cellulare
 - Legame con HDAC con mantenimento in fase S necessario per la replicazione produttiva nelle cellule nello strato soprabasale e per il mantenimento del genoma episomiale nelle cellule.
 - Inibizione di P21 e P27, inibitori della CDK2 che è importante nel passaggio G1-S mediato dalle cicline E ed A.

E5

- Altera il turnover di EGFR
- Riduce l'espressione di MHC-1
- Contribuisce all'immuno-evasione



Integrazione del genoma virale

- L'integrazione è random nel genoma dell'ospite.
- Molti geni del virus vengono persi nel processo di integrazione ad eccezione di E6 e di E7.
- E6 ed E7 sono responsabili del processo di immortalizzazione che porta a trasformazione e, quindi, alla progressione al tumore

Immunoevasione

- Bassi livelli di replicazione virale nello strato basale
- Diminuita espressione di MHC1 indotta da E5
- Soppressione della risposta all'interferon e al TNF- α indotta da HPV
- Attivazione di citochine soppressive e di Tregs da parte di E6 ed E7

Classificazione degli agenti cancerogeni

Group 1 Carcinogenic to Humans	Group 2A Probably Carcinogenic to Humans	Group 2B Possibly Carcinogenic to Humans	Group 3 Not classifiable	Group 4 Probably not Carcinogenic to Humans
Sufficient evidence of carcinogenicity in humans and in experimental animals	Limited evidence of carcinogenicity in humans and sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals	Limited evidence of carcinogenicity in humans and insufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals	Inadequate evidence of carcinogenicity in humans and in experimental animals	Evidence suggesting lack of carcinogenicity in humans and in experimental animals
111 agents, including 8 biological agents: <ul style="list-style-type: none"> - Epstein-Barr virus - Helicobacter pylori (infection with) - Hepatitis B virus (chronic infection with) - Hepatitis C virus (chronic infection with) - Human immunodeficiency virus type 1 (infection with) - <u>Human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59</u> - Human T-cell lymphotropic virus type I - Kaposi sarcoma herpesvirus 	65 agents, including 3 biological agents: <ul style="list-style-type: none"> - <u>Human papillomavirus type 68</u> - Malaria (caused by infection with Plasmodium falciparum in holoendemic areas) - Merkel cell polyomavirus 	274 agents, including 6 biological agents: <ul style="list-style-type: none"> - BK polyomavirus - Human immunodeficiency virus type 2 (infection with) - <u>Human papillomavirus types 5 and 8</u> (in patients with epidermodysplasia verruciformis) - <u>Human papillomavirus types 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82</u> - <u>Human papillomavirus types 30, 34, 69, 85, 97</u> (Classified by phylogenetic analogy to the HPV genus alpha types classified in Group 1) - JC polyomavirus 	504 agents, including 5 biological agents: <ul style="list-style-type: none"> - <u>Human papillomavirus genus beta (except types 5 and 8)</u> - <u>Human papillomavirus types 6 and 11</u> - Human T-cell lymphotropic virus type II - SV40 polyomavirus - Hepatitis D virus 	1 agent, no biological agent

Grazie per l'attenzione!