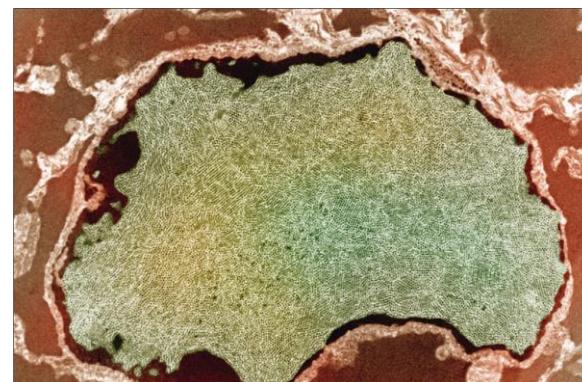




Trieste, 12/06/2017

I Papillomavirus umani storia naturale dell'infezione

Prof. Pierlanfranco D'AGARO

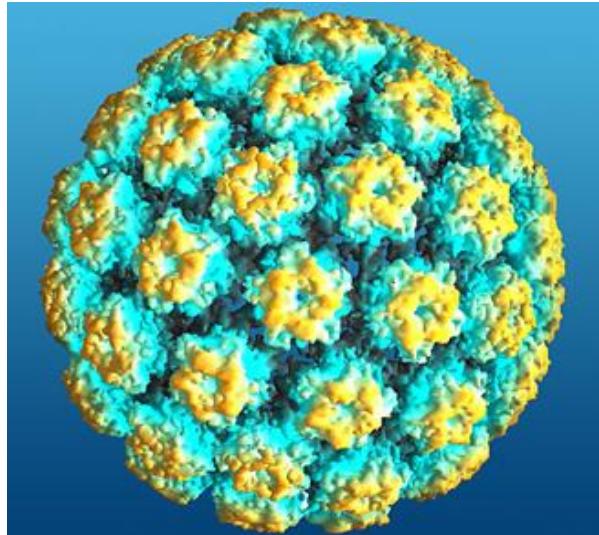
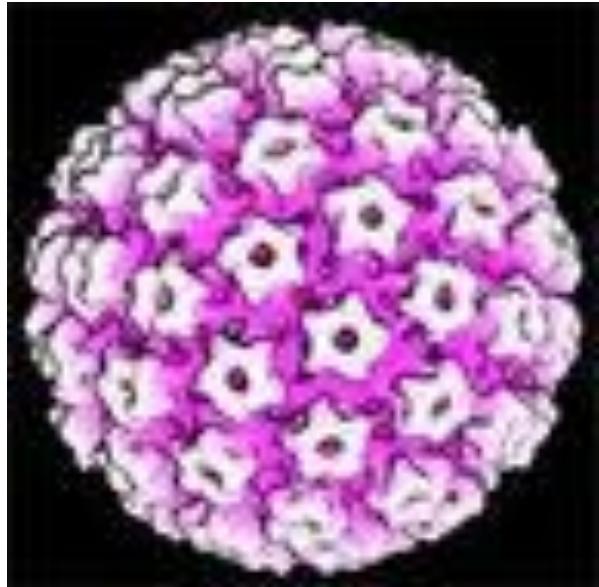


I Papillomavirus umani

- Gli HPV sono piccoli virus privi di mantello con genoma a DNA bicanenario, 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.

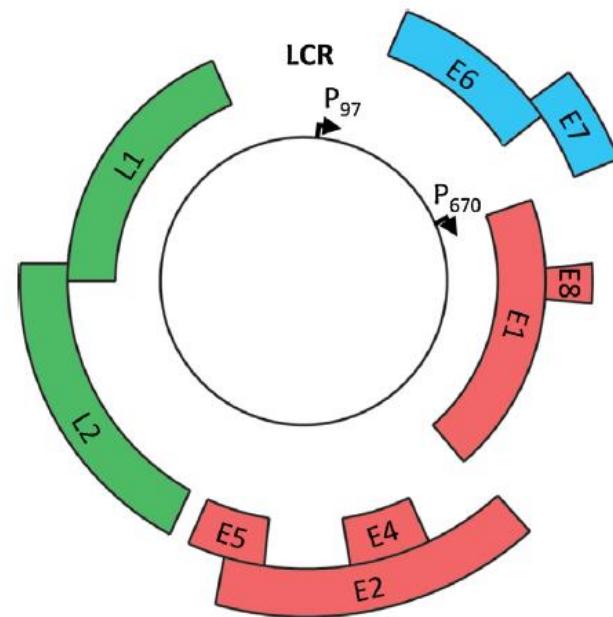
Human Papillomavirus (HPV)

- Famiglia delle *Papillomaviridae*
- Piccoli virus di 52-55 nm con capsid 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 capsid; solo una porzione N-terminale (residui 60–120) è esposta alla superficie.



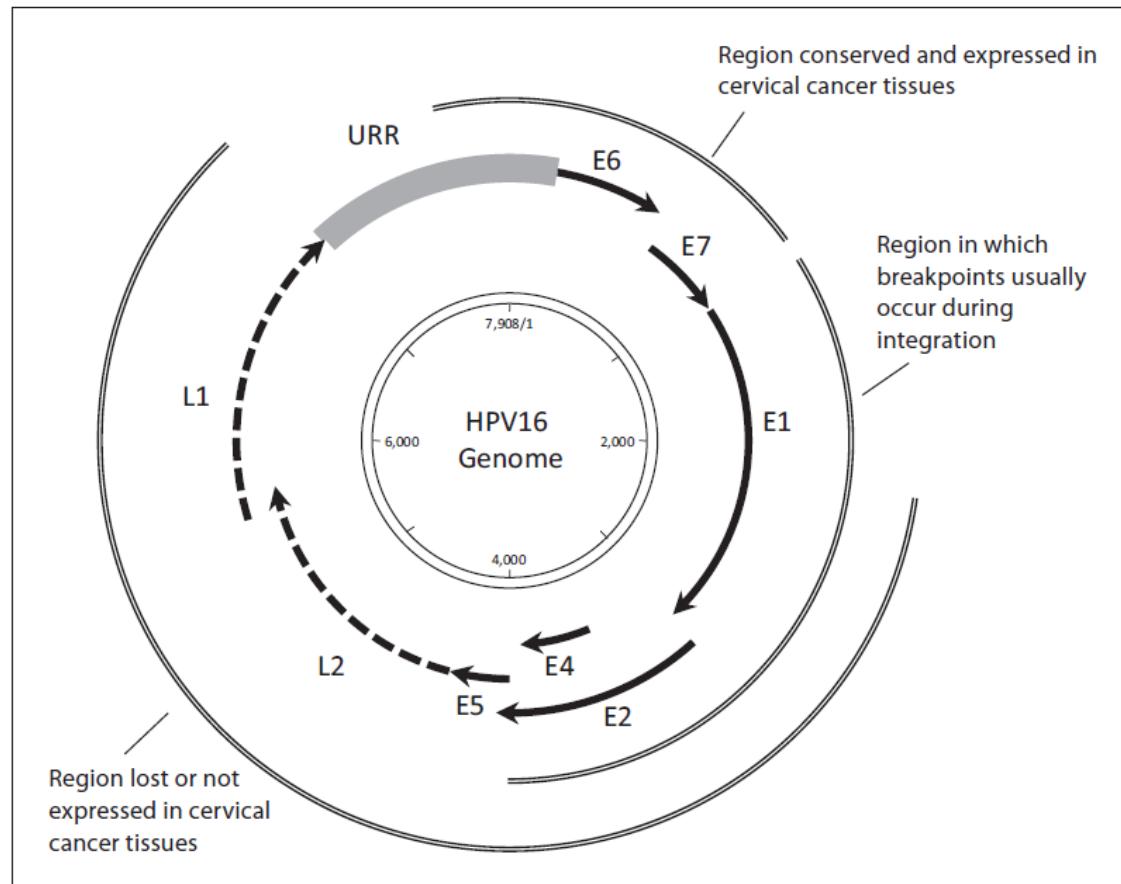
Genoma

- 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 istori, 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



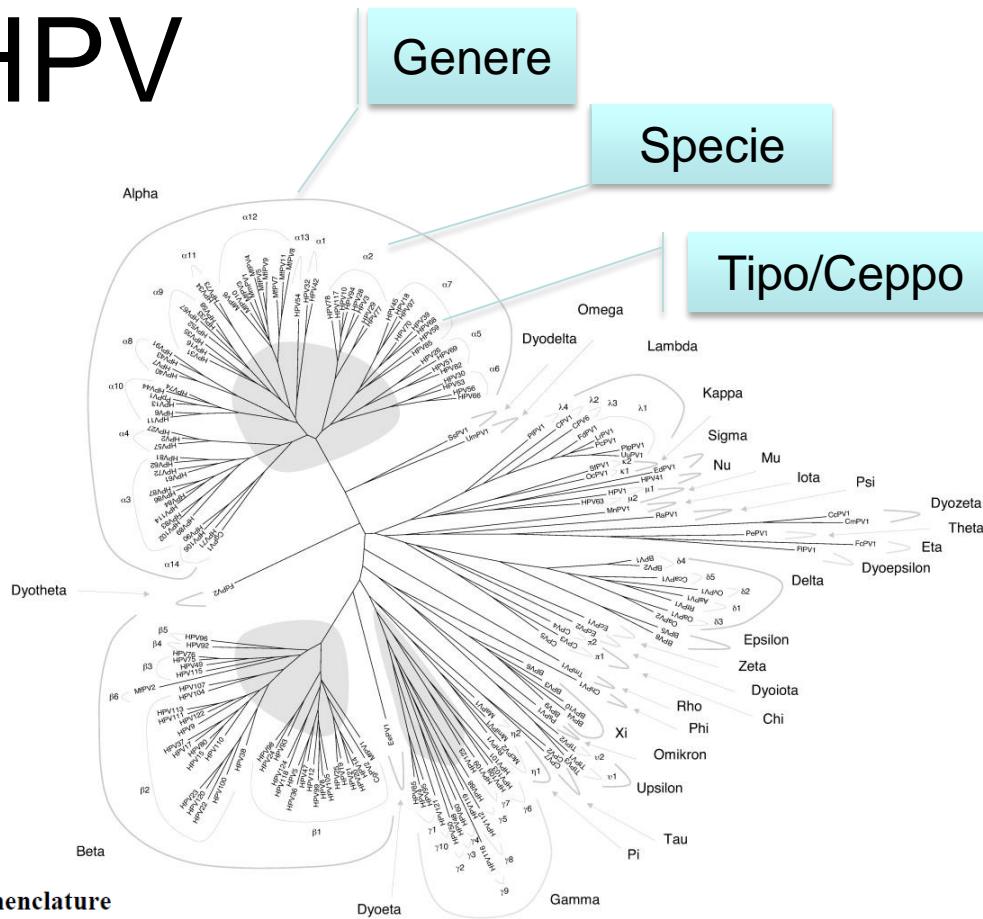
HPV

- 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)

Genere

Specie

Tipi/Ceppo



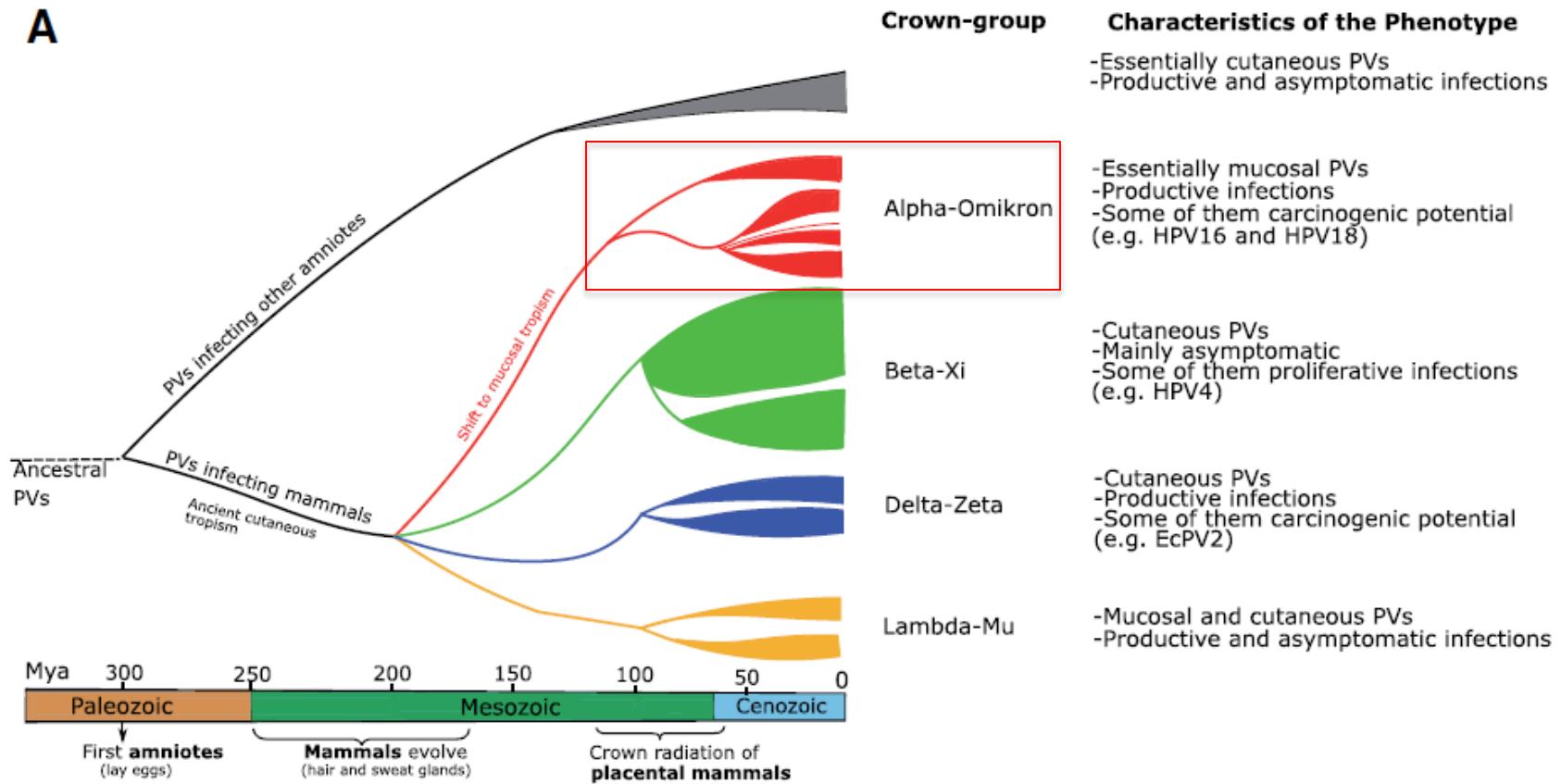
Comparison of commonly used and ICTV Papillomavirus nomenclature

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

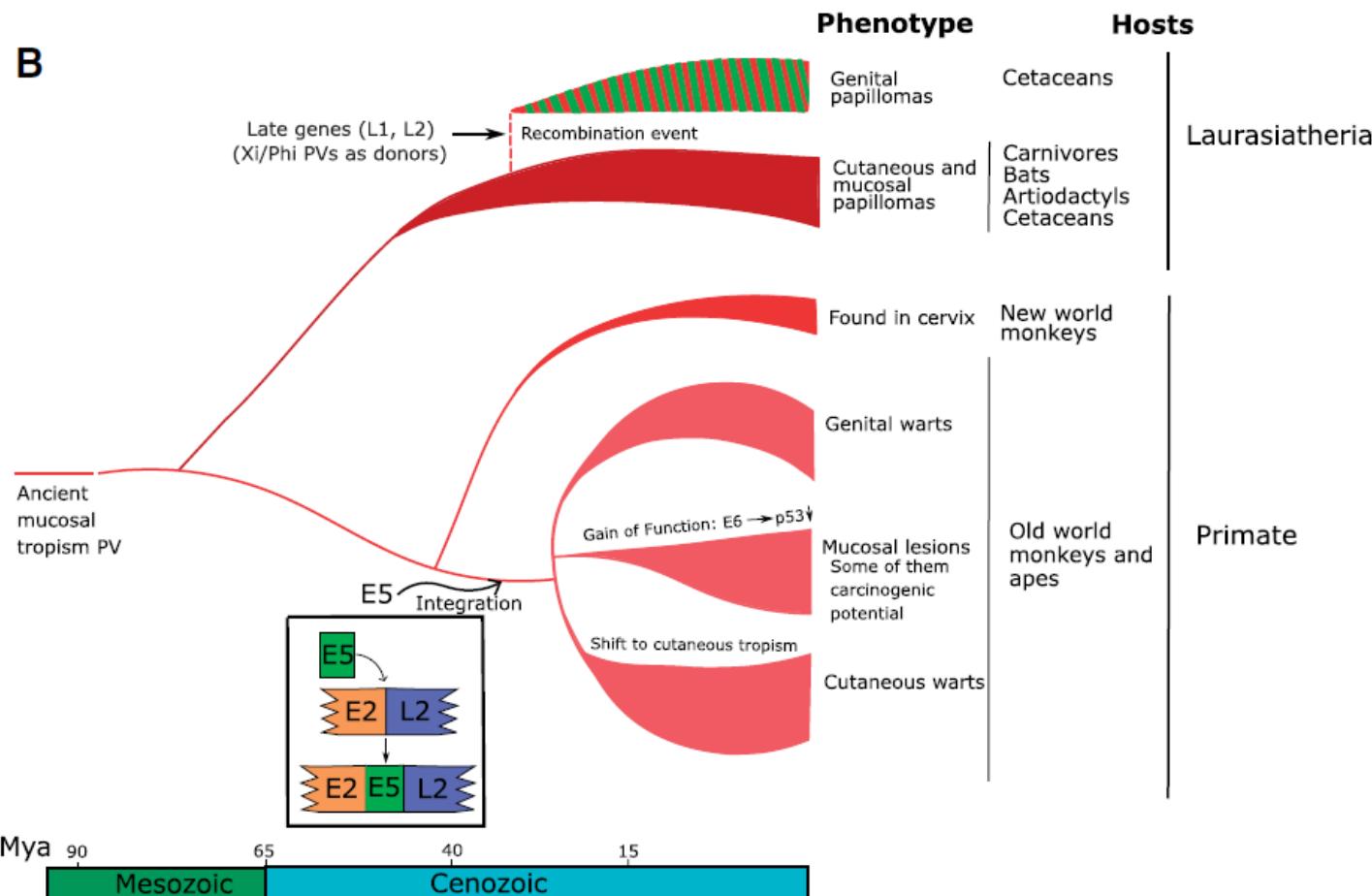
Commonly used names	ICTV term
Taxonomic level	
Family: Papillomavirus	Family: <i>Papillomaviridae</i>
Genus: alpha papillomavirus	Genus: <i>Alphapapillomavirus</i>
Species: alpha papillomavirus-9	Species: Human papillomavirus 16
Types: Human papillomavirus 16, 31, 33, etc.	Strains: Human papillomavirus 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

A

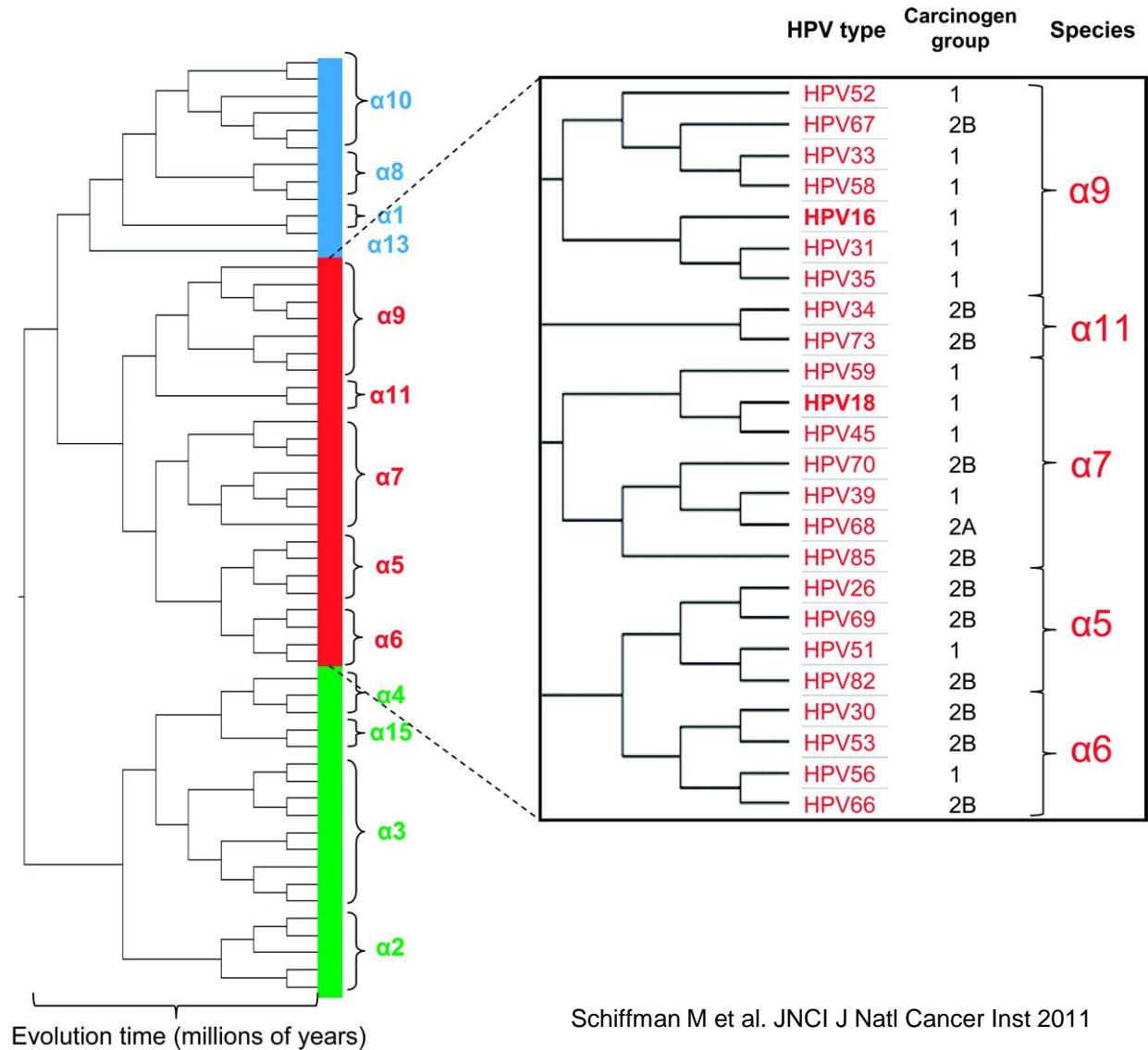


Evoluzione dei PV

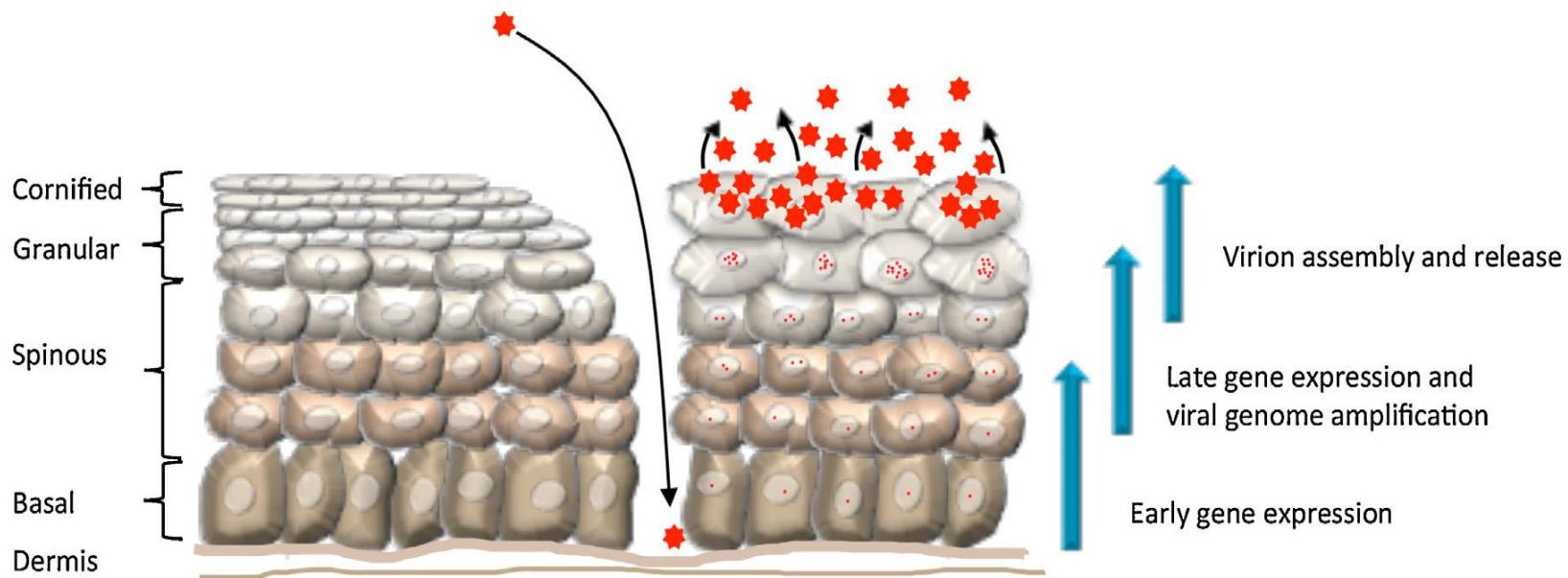


HPV

- 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).



Repli**c**azione virale



- Gli HPV sono specie specifici e hanno spiccato tropismo per le cellule epitelio squamoso
- Recettori probabili: $\alpha 6$ integrina, eparansolfato e glicoaminoglicani
- 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 capsid 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)

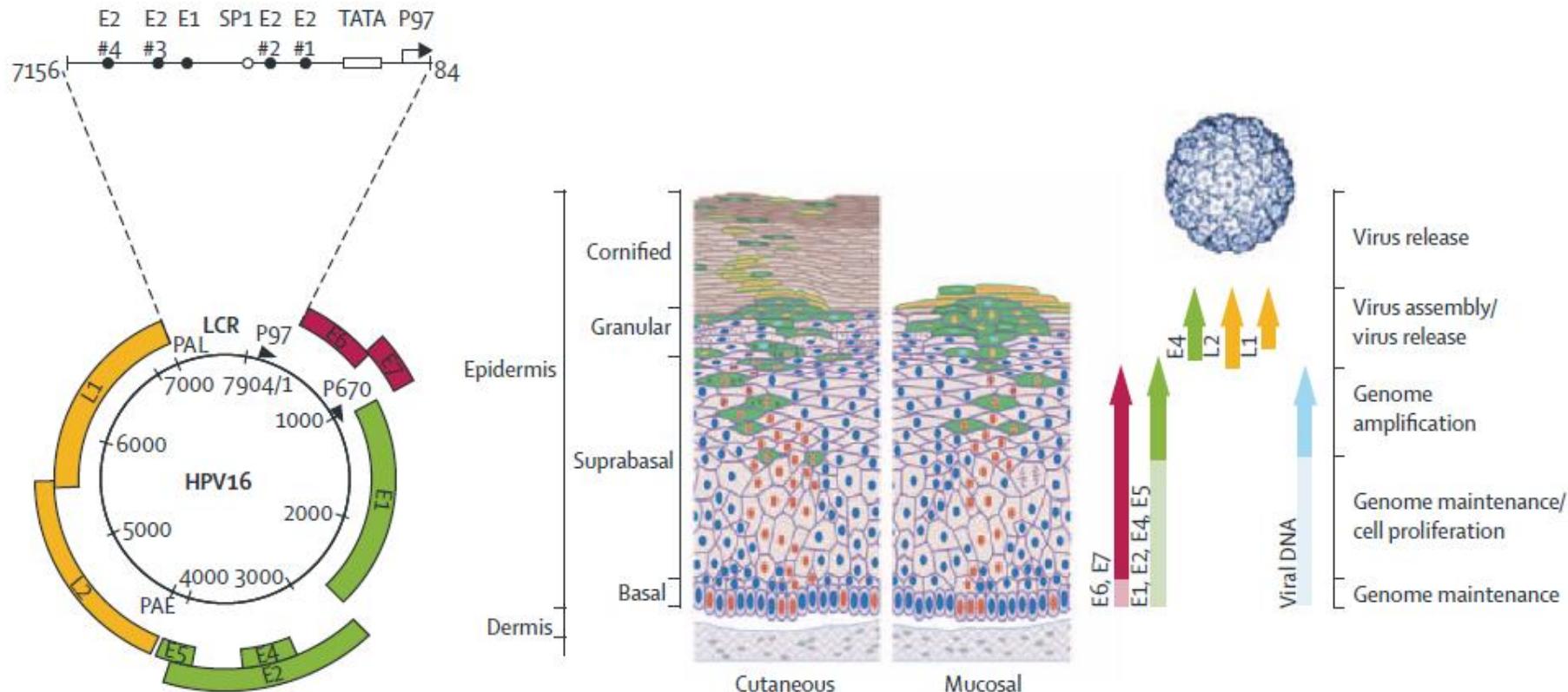
Ingresso nella cellula

- 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 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 le 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.

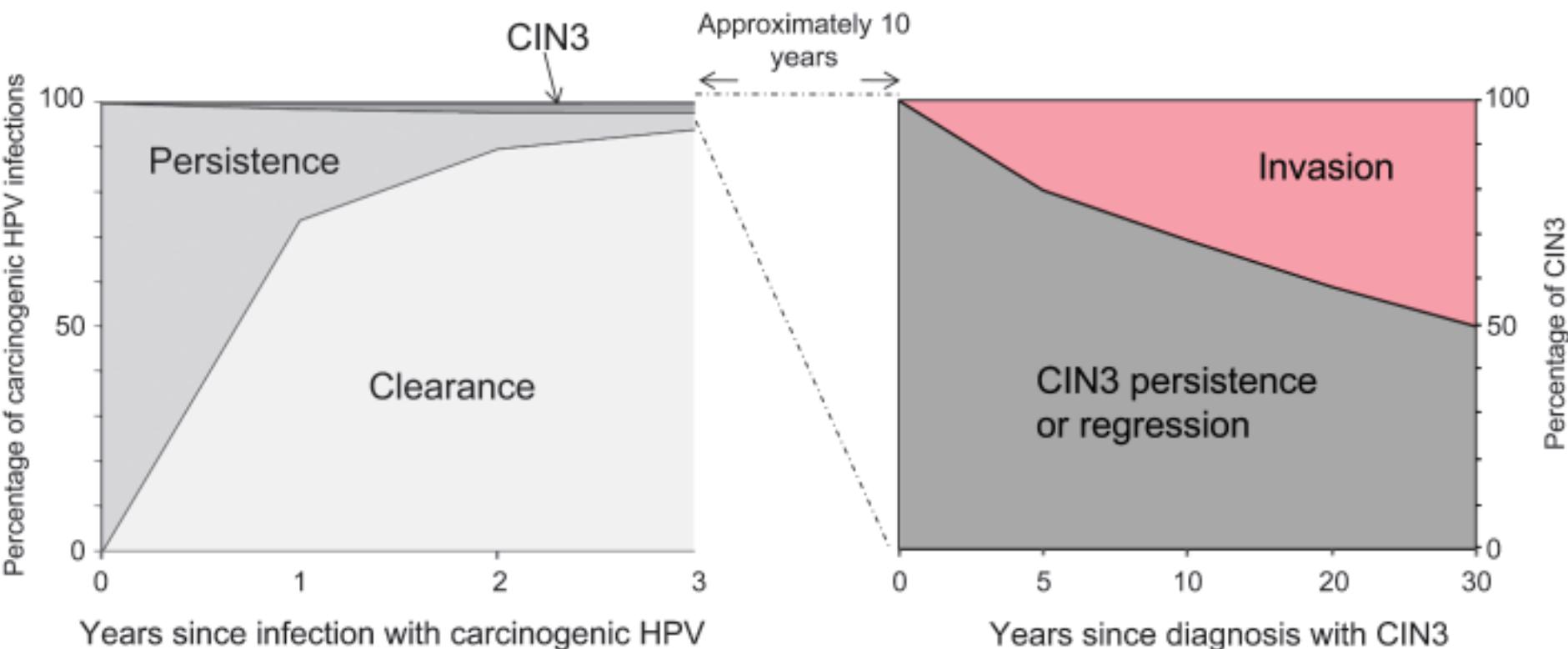
Fase III – Infezione produttiva

- 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(?)

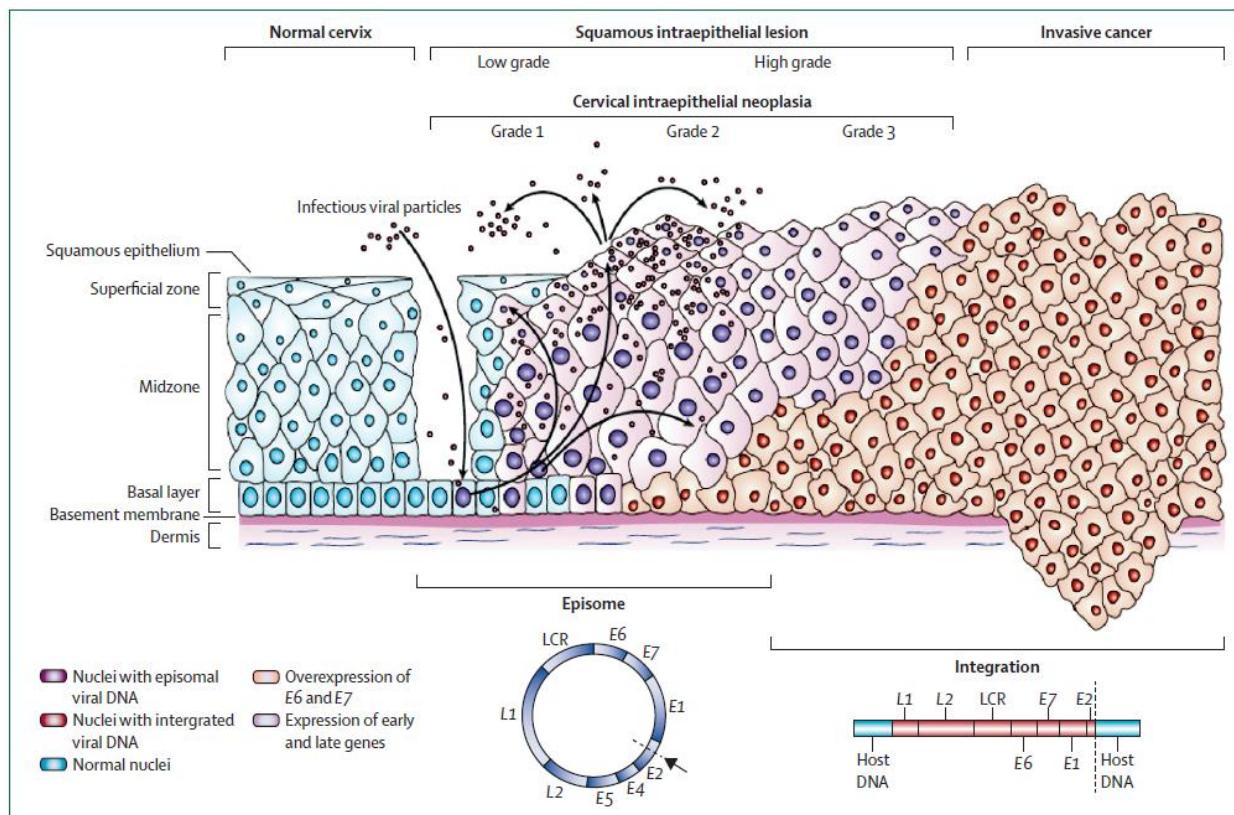
Evoluzione delle infezioni da HPV



- **Metà delle infezioni da HPV scompare 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**

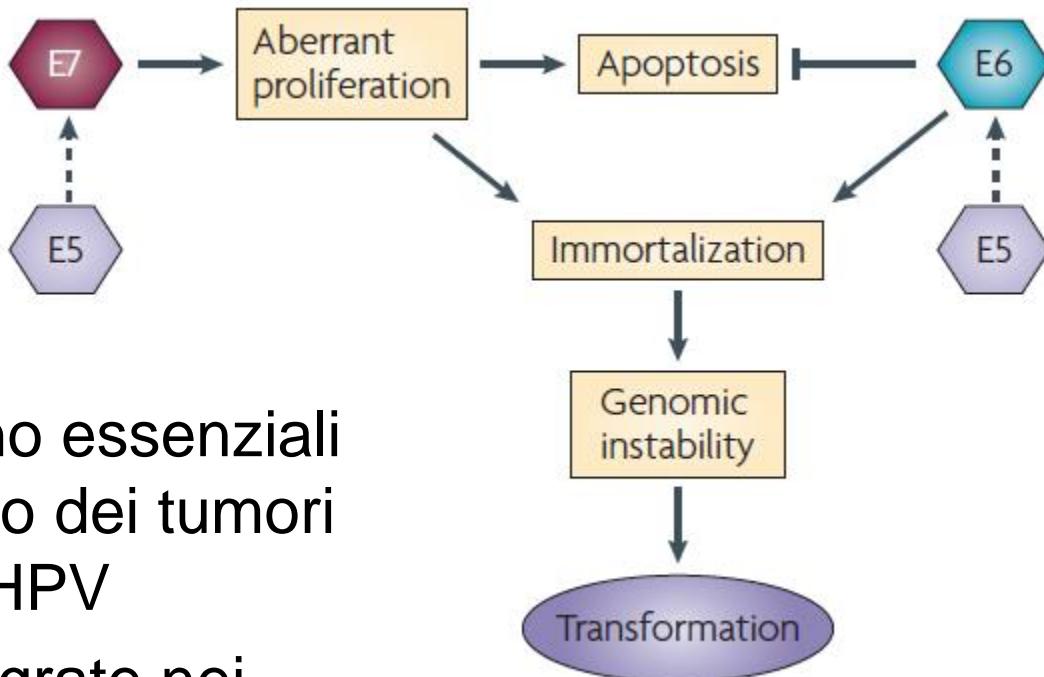
Meccanismi oncogenetici di HPV

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

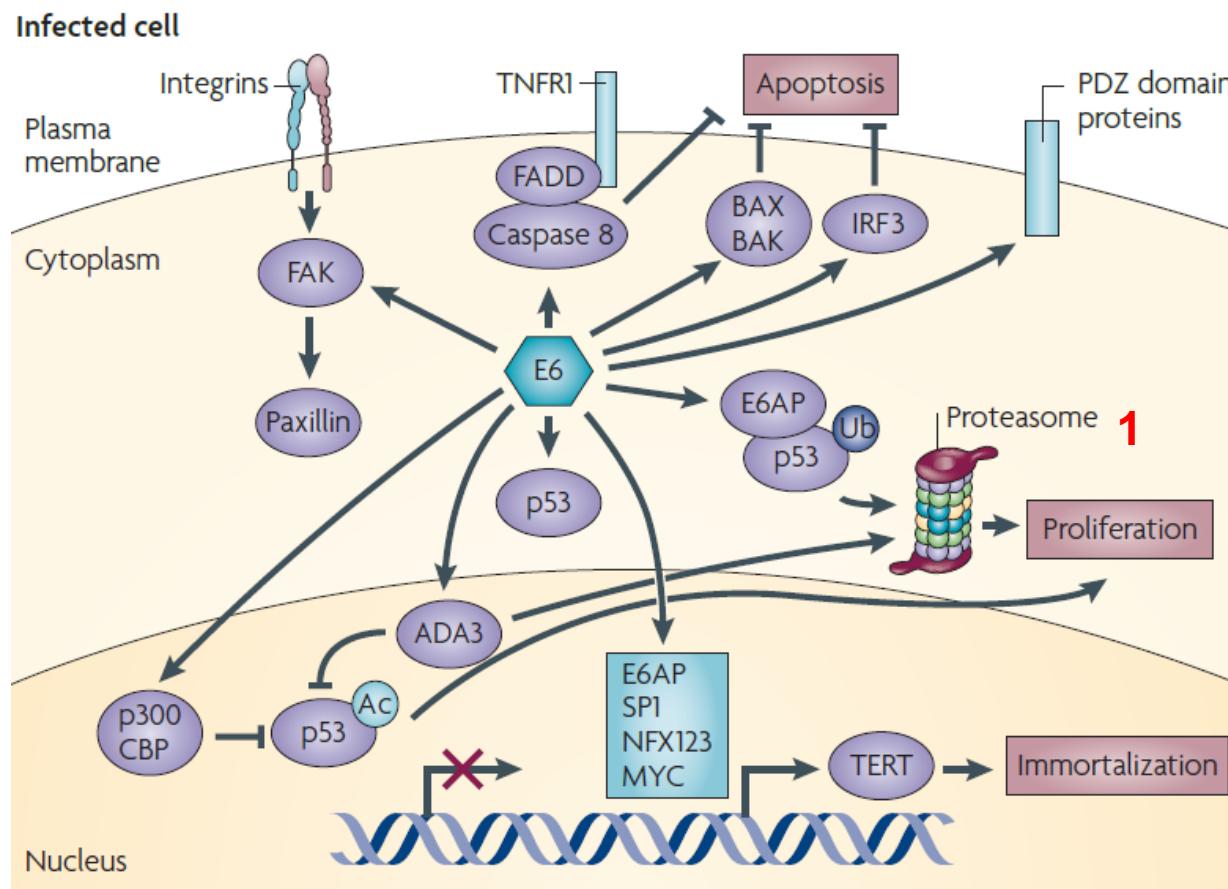


Oncoproteine di HPV

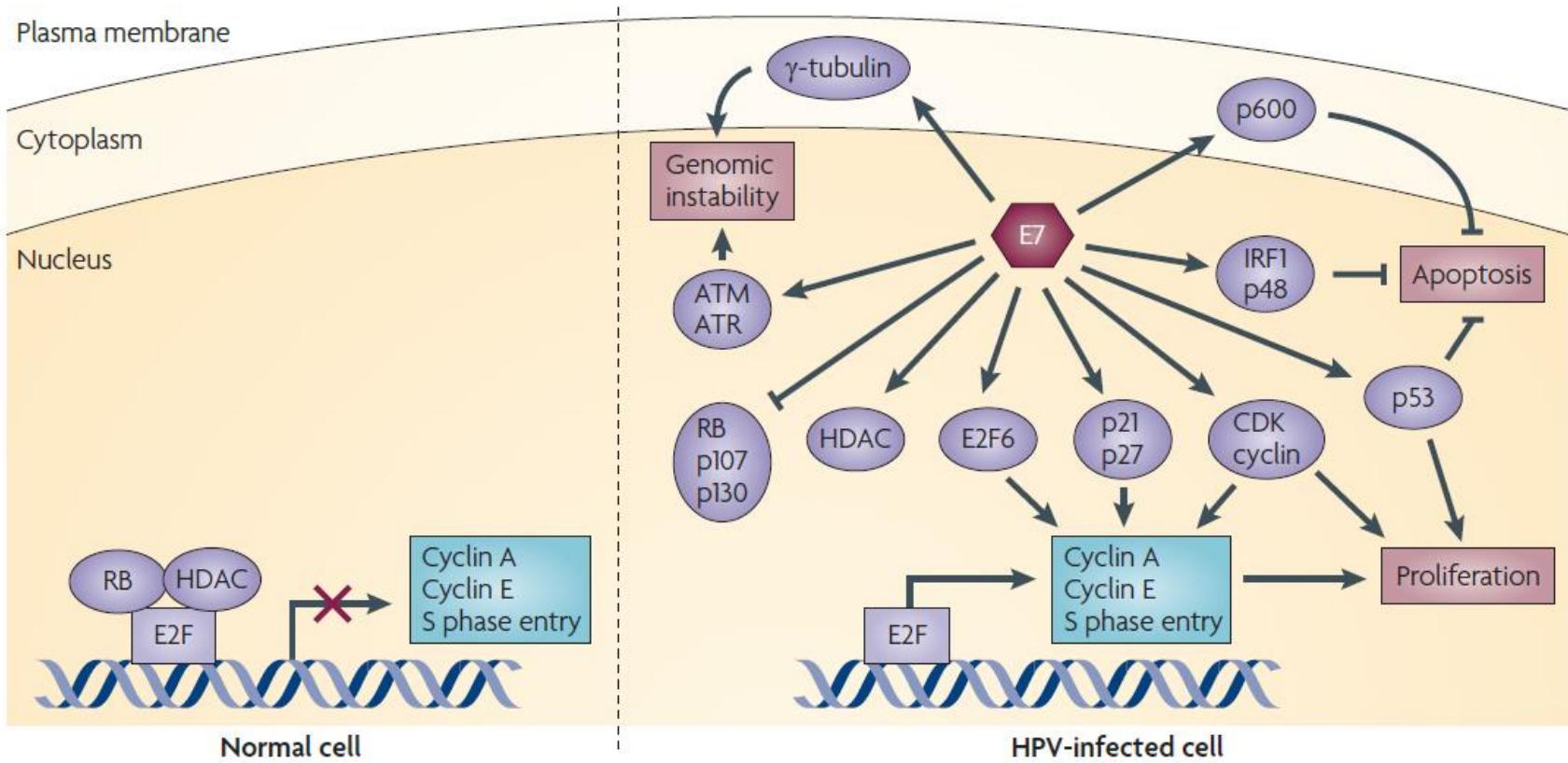
- E6 ed E7 sono essenziali per lo sviluppo dei tumori associati ad HPV
- Le forme integrate nei cromosomi cellulari mantengono l'espresione solo di E6 e di E7



E6 (HR-HPV)



E7 (HR-HPV)

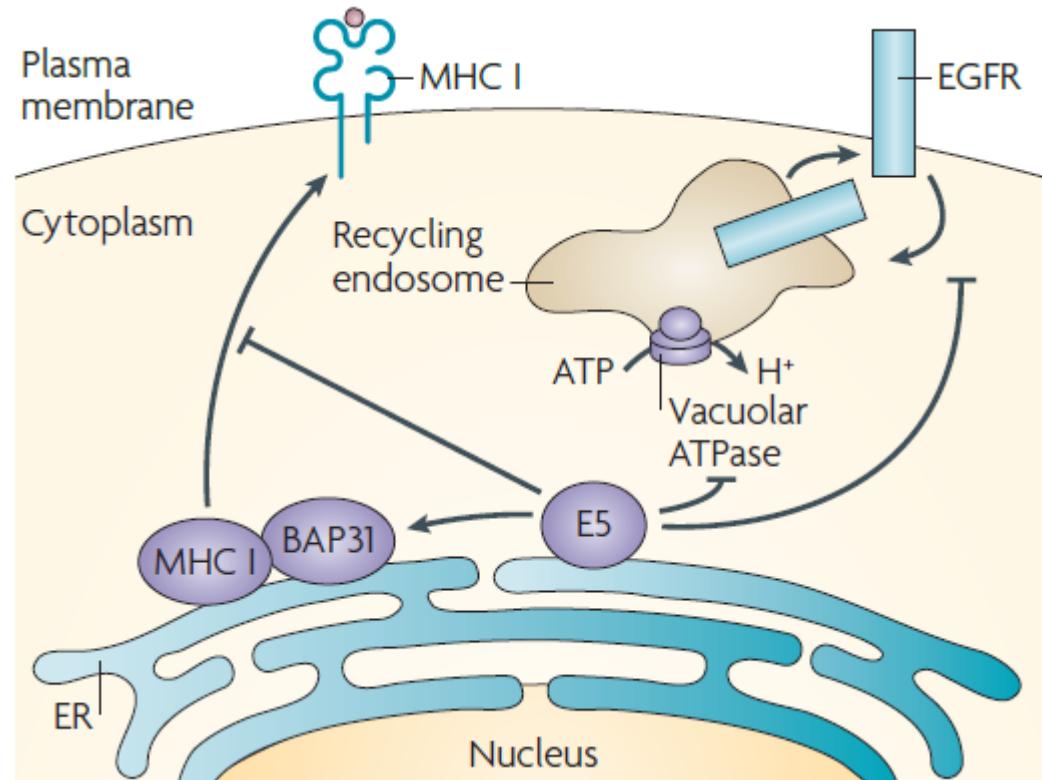


E7 (HR-HPV)

- 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 (cycline 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 cycline 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
<p>Sufficient evidence of carcinogenicity in humans and in experimental animals</p> <p>111 agents, including 8 biological agents:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Epstein-Barr virus - <i>Helicobacter pylori</i> (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 	<p>Limited evidence of carcinogenicity in humans and sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals</p> <p>65 agents, including 3 biological agents:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>Human papillomavirus type 68</u> - Malaria (caused by infection with <i>Plasmodium falciparum</i> in holoendemic areas) - Merkel cell polyomavirus 	<p>Limited evidence of carcinogenicity in humans and insufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals</p> <p>274 agents, including 6 biological agents:</p> <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 	<p>Inadequate evidence of carcinogenicity in humans and in experimental animals</p> <p>504 agents, including 5 biological agents:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>Human papillomavirus genus beta (except types 5 and 8)</u> and <u>genus gamma</u> - <u>Human papillomavirus types 6 and 11</u> - Human T-cell lymphotropic virus type II - SV40 polyomavirus - Hepatitis D virus 	<p>Evidence suggesting lack of carcinogenicity in humans and in experimental animals</p> <p>1 agent, no biological agent</p>

Grazie per l'attenzione!