

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA

DOTTORATO DI RICERCA
IN FARMACOLOGIA E ONCOLOGIA MOLECOLARE
Ciclo XXIV

Coordinatore Prof. Antonio Cuneo

***MECCANISMO TRASFORMANTE
DEI VIRUS ONCOGENI HPV
IN CELLULE EPITELIALI UMANE DELLA
CERVICE UTERINA***

Settore Scientifico Disciplinare BIO/13

Dottoranda

Dott.ssa Bosi Silvia

Tutore

Prof.ssa Martini Fernanda

Anni 2009-2011

INDICE

INTRODUZIONE

Capitolo 1.....pag. 4

I PAPILOMAVIRUS

1.1.-Classificazione dei papilloma virus

1.1.1. Classificazione Filogenetica

1.1.2. Classificazione Epidemiologica

1.2.-Genoma di HPV

1.3.-Ciclo vitale di HPV

1.4.-Le proteine responsabili della trasformazione cellulare: E6 ed E7

1.5.-HPV e tumorigenesi

Capitolo 2.....pag. 18

CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA

2.1.-Anatomia della cervice uterina

2.1.1. Canale endocervicale

2.1.2. Esocervice

2.2.-Epidemiologia del carcinoma della cervice uterina nel mondo e in Italia

2.3.-Classificazione delle lesioni precancerose

2.3.1. Test citologico Pap-test

2.3.2. Classificazione istologica europea

2.3.3. Classificazione istologica americana

2.4.-Epidemiologia delle lesioni precancerose

2.5.-Andamento clinico delle lesioni precancerose

2.6.-Diagnosi e chirurgia

Capitolo 3.....pag. 25

BACKGROUND DELLA RICERCA

3.1.-La diagnosi delle CIN e i marker della progressione neoplastica

3.1.1. Test molecolari

3.1.2. Test immunoistochimici

- 3.2.-Microarray per la ricerca di nuovi marcatori della progressione neoplastica
 - 3.2.1. Microarray su tessuti
 - 3.2.2. Microarray su cheratinociti trasfettati con HPV
 - 3.2.3. Microarray su cellule epiteliali cervicali
- 3.3.-Le colture cellulari di cheratinociti CIN come modello di studio della progressione delle lesioni cervicali
 - 3.3.1. Le tecniche di coltura di cellule epiteliali
 - 3.3.1.1. Protocollo di Rheinwald e Green
 - 3.3.1.2. Protocollo dei terreni selettivi
 - 3.3.2.-Colture di cheratinociti cervicali
 - 3.3.2.1. Colture di cheratinociti cervicali normali
 - 3.3.2.2. Colture di cheratinociti cervicali CIN
 - 3.3.2.3. Colture di cheratinociti cervicali CIN per lo studio della progressione neoplastica

Capitolo 4.....pag. 38
SCOPO DELLA RICERCA

Capitolo 5.....pag. 40
MATERIALI E METODI

- 5.1.-Tessuti cervicali impiegati
- 5.2.-Allestimento di colture primarie di cellule epiteliali normali e CIN
- 5.3.-Estrazione del DNA dai tessuti CIN e NUC
- 5.4.-Ricerca di sequenze dei virus HPV in campioni CIN e NUC mediante PCR
- 5.5.-Genotipizzazione degli HPV
- 5.6.-Colorazione dei cloni con rodamina-B
- 5.7.-Subcolture delle colture primarie di CIN e NUC
- 5.8.-Espansione dei cloni primari di CIN e NUC
- 5.9.-Caratterizzazione dei cloni di CIN e NUC con la tecnica dell'immunofluorescenza
- 5.10.-Analisi statistica dei risultati
- 5.11.-Estrazione dell'RNA totale e studio del profilo di espressione genica mediante microarray
 - 5.11.1. Estrazione dell'RNA
 - 5.11.2. Quantificazione dell'RNA totale

- 5.11.3. Microarray
- 5.12.-RT-PCR
- 5.13.-PCR real-time
 - 5.13.1. Analisi dei dati
 - 5.13.2. Quantificazione

Capitolo 6.....pag. 55

RISULTATI

- 6.1.-Analisi con PCR e tipizzazione degli HPV nei tessuti CIN e NUC
- 6.2.-Comprtamento di crescita delle colture primarie di CIN e NUC
- 6.3.-Saggio di colorazione dei cloni di cheratinociti con la rodamina-B
- 6.4.-Subcolture delle colture primarie di CIN e NUC
- 6.5.-Isolamento ed espansione dei cloni epiteliali di CIN e NUC
- 6.6.-Caratterizzazione dei cloni primari di CIN e NUC
- 6.7.-Analisi del profilo di espressione genica mediante microarray
 - 6.7.1. Geni up- e down-regolati nelle Cin
 - 6.7.2. Geni differenzialmente espressi tra CIN e NUC
 - 6.7.3. Geni up- e down-regolati nella progressione neoplastica

Capitolo 7.....pag. 73

DISCUSSIONE

BIBLIOGRAFIA.....pag. 82

INTRODUZIONE

Capitolo 1

I PAPILLOMAVIRUS

I papillomavirus (HPV, dall'inglese *Human Papilloma Virus*) sono piccoli virus a DNA privi di envelope appartenenti alla famiglia dei *Papillomaviridae*, che infettano i tessuti epiteliali delle mucose e dell'epidermide inducendo lesioni proliferative quali verruche, a livello di mani e piedi, e condilomi, a livello del tratto genitale, labiale e respiratorio.

A tutt'oggi sono stati identificati circa 200 differenti genotipi che infettano sia l'uomo sia gli animali ed il genoma di 120 di questi è stato completamente sequenziato e caratterizzato; tra questi, circa 35-40 infettano il tratto ano-genitale.

L'HPV è costituito da un nucleo centrale o *core* rivestito da un capsido proteico senza involucro esterno (capsido nudo) di 55 nm di diametro composto da 72 capsomeri a forma di pentamero disposti a simmetria icosaedrica.

1.1-Classificazione dei papillomavirus

1.1.1 Classificazione Filogenetica

L'ufficiale tassonomia dei Papillomavirus è basata sul confronto della sequenza nucleotidica di L1, sebbene altri geni siano stati usati per la classificazione, portando ad associazioni tassonomiche simili, ma non identiche (Van Ranst *et al.*, 1992). Un "tipo" di HPV si distingue rispetto ad un altro tipo per la sequenza genica di L1 diversa per più del 10%. Ciascun tipo di HPV è identificato da un numero. I tipi che differiscono per il gene L1 dal 2 al 10% sono rari e sono definiti "sottotipi" (Calleja-Macias *et al.*, 2005). In presenza di differenze geniche di L1 inferiori al 2% i tipi si definiscono "varianti". (Ho L *et al.*, 1991). Nell'uomo sono stati descritti più di 100 tipi, di cui 40 di essi infettano la mucosa genitale e molti altri sono stati identificati in mammiferi ed uccelli. I Papillomavirus formano una famiglia

(*Papillomaviridae*) separata dai polyomavirus (*Polyomaviridae*), sebbene questi due gruppi di virus siano stati precedentemente considerati correlati. Ciascun principale assemblaggio filogenetico è considerato un genere ed è identificato da una lettera greca, per un totale di 16 generi (Figura 1) (De Villiers *et al.*, 2004).

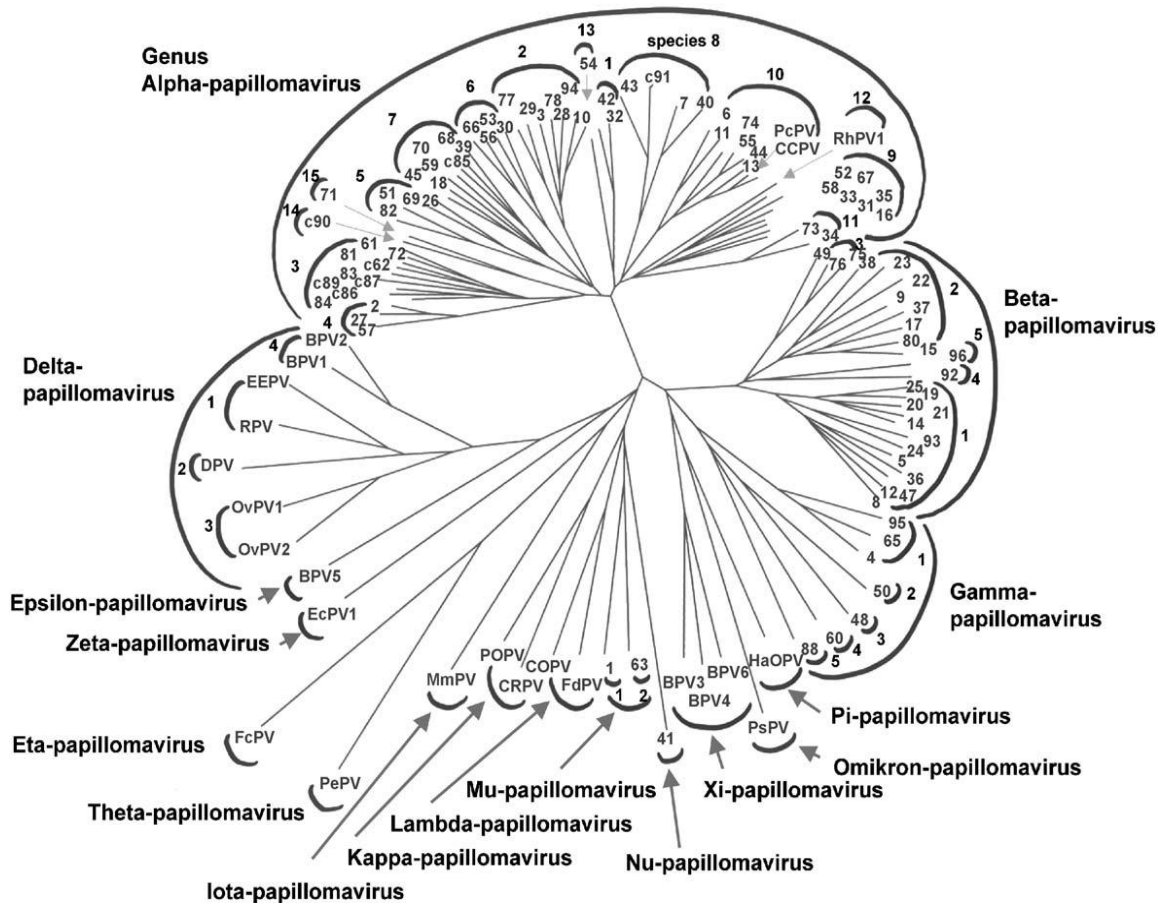


Figura 1. Albero filogenetico delle sequenze di 118 tipi di papilloma virus.

I numeri alla fine di ciascun cluster identificano un tipo di HPV. I simboli semicircolari più esterni identificano i generi di papilloma virus, ad esempio il genere alfa-papillomavirus. Il numero sopra al simbolo semicircolare si riferisce alle specie di papillomavirus (De Villiers *et al.*, 2004).

1.1.2 Classificazione Epidemiologica

In base al loro potenziale oncogeno gli HPV sono classificati in tipi a basso rischio (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108), i quali causano principalmente lesioni anogenitali

benigne, verruche o condilomi e tipi ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59), associati a cancro anogenitale e a più del 90% dei tumori cervicali (Muñoz *et al.*, 2003). L'HPV16 è coinvolto in circa il 50-70% dei carcinomi cervicali e l'HPV18 in un altro 10-20% (Muñoz *et al.*, 2006).

1.2-Genoma di HPV

I papillomavirus sono piccoli virus privi di envelope contenenti un genoma di DNA circolare a doppia elica di circa 8000 paia di basi (Narisawa-Saito & Kiyono, 2007) che si divide in 3 domini: una regione regolatoria non codificante chiamata “long control region” (LCR) o “upstream regulatory region” (URR) di circa 1Kb; una regione precoce composta da 6 geni, E1, E2, E4, E5, E6, ed E7, e una regione tardiva codificante per le proteine strutturali L1 (proteina maggiore) ed L2 (proteina minore) che costituiscono il capsido icosaedrico che racchiude il genoma virale (Figura 2A e 2B).

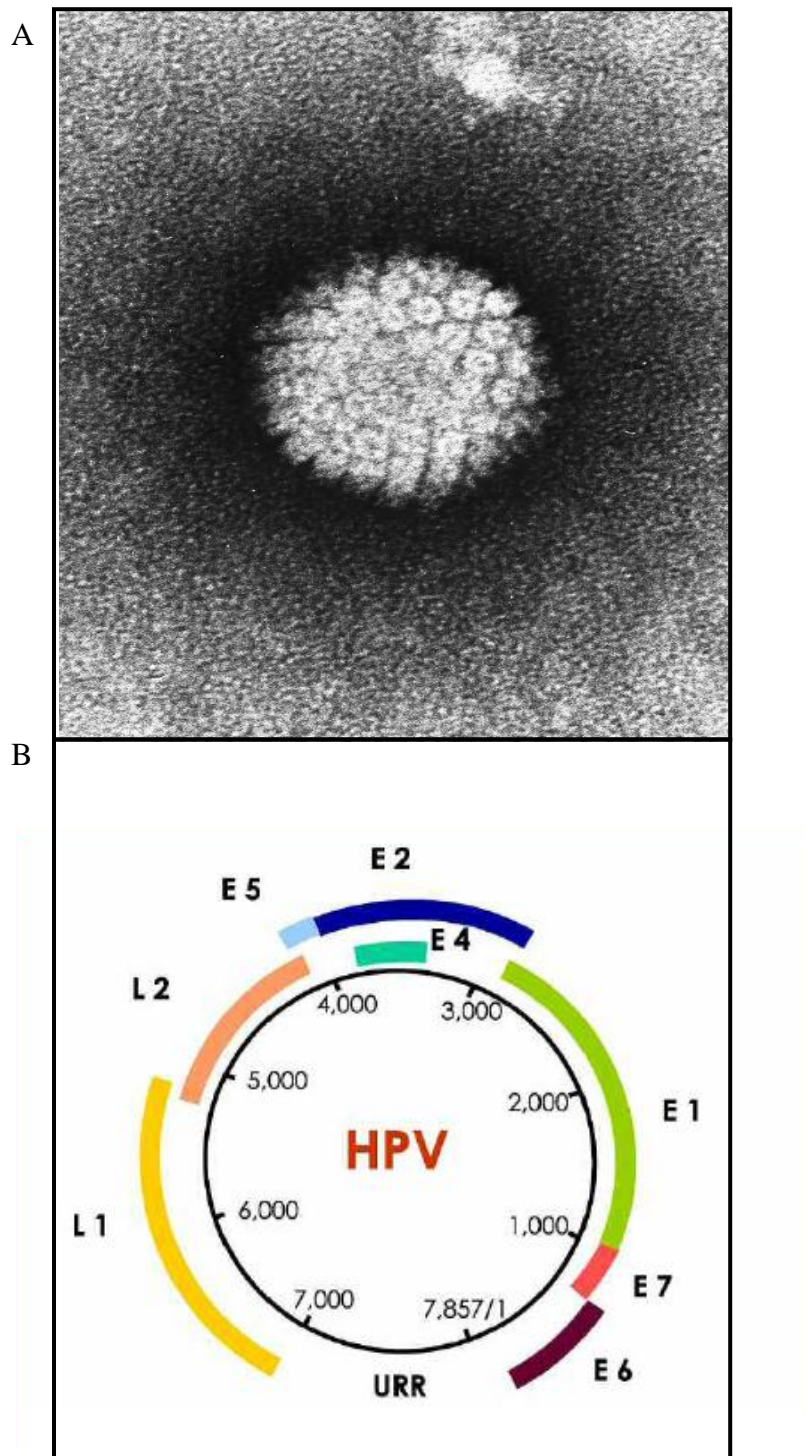


Figura 2. Immagine di HPV al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) (National Institutes of Health (NIH), Laboratory of Tumor Virus Biology) (A).

Rappresentazione schematica del genoma di HPV. Il genoma è suddiviso in tre regioni funzionali: regione precoce (E), che codifica per le proteine E1, E2, E4, E5, E6 ed E7; regione tardiva (L), che codifica per le proteine virali del capsido L1 e L2; e la regione URR (upstream regulatory region) (Muñoz, 2006) (B).

I geni precoci codificano per proteine che interagiscono con il genoma dell'ospite per replicare il DNA virale, mentre quelli tardivi sono espressi dopo la replicazione del DNA virale. Alcune sequenze codificanti presentano le Open Reading Frames (ORF) sovrapposte: ad esempio l'ORF di E4 è inserita nell'ORF di E2. I geni precoci e tardivi sono separati dalla sequenza non codificante LCR che contiene una serie di elementi in *cis* necessari per la regolazione dell'espressione genica, la replicazione del DNA e l'incapsidazione del genoma virale (Muñoz *et al.*, 2006). I prodotti proteici codificati hanno la stessa nomenclatura dei geni: sei proteine regolatrici non strutturali (E1, E2, E4, E5, E6, E7) e due proteine strutturali L1 e L2. E1 ed E2 sono specificatamente coinvolte nella replicazione del DNA virale, mentre E4, E5, E6, ed E7 contribuiscono alla iniziale destabilizzazione proliferativa e differenziativa della cellula ospite (Bravo & Alonso, 2007). La trascrizione dei geni è in senso orario ma non è sequenziale. Ogni proteina virale ha una precisa funzione durante il ciclo replicativo del virus.

E1 è una proteina essenziale per la replicazione virale; svolge un ruolo importante nella fase iniziale della replicazione del genoma virale, insieme ad E2. E1 presenta un'attività elicastica ATP-dipendente necessaria per il riconoscimento e la sintesi del DNA.

E2 è una proteina dimerica importante nella regolazione della replicazione e della trascrizione virale. Strutturalmente è divisa in una porzione C-terminale in cui si trova una sequenza che lega specifici domini del DNA, una regione centrale e una regione N-terminale (Wilson *et al.*, 2002). E2 regola la trascrizione dei geni virali precoci. A bassi livelli, E2 si lega a specifiche sequenze di riconoscimento ed attiva i promotori precoci, mentre a concentrazioni elevate reprime la trascrizione bloccando il legame dei fattori di trascrizione. Il ruolo di E2 come repressore è molto importante nel regolare i livelli di espressione di E6 ed E7, le due principali oncoproteine di HPV.

E4 viene espressa tardivamente nel ciclo di replicazione virale. Il suo ruolo è legato all'infezione produttiva, dal momento che sembra interagire con i filamenti intermedi di cheratina, rendendoli meccanicamente instabili e facilitando così il rilascio dei virioni maturi dalla cellula epiteliale.

E5 è una proteina altamente idrofobica composta da 83 aminoacidi. Partecipa, con le proteine E1, E2 ed E4, alla replicazione del DNA virale. La sua espressione induce diversi cambiamenti cellulari, come l'aumento del segnale dei fattori di crescita (Crusius *et al.*, 1998), l'attivazione del pathway di MAPK, down-regolazione delle molecole MHC di classe I e di classe II (Ashrafi *et al.*, 2005). Nonostante le diverse attività citate, le attività biologiche della proteina e il suo ruolo nella patogenesi indotte da HPV rimangono poco caratterizzati.

Le proteine **E6** ed **E7** sono le principali responsabili della trasformazione cellulare e della progressione maligna del cancro cervicale e per questo definite proteine oncogene (Klaes *et al.*, 1999). L'azione oncogena delle proteine E6 ed E7 risiede nella capacità di inattivare due importanti proteine oncosoppressorie, la p53 e la proteina del retinoblastoma, pRb (Sheffner *et al.*, 1990; Munger *et al.*, 1989).

Le proteine tardive **L1** ed **L2** hanno una funzione strutturale. L1 è la proteina maggiore del capsido virale, mentre L2 è la proteina minore. Le L1 si autoassemblano in 72 pentameri che unendosi costituiscono la parte preponderante del capsido virale. Le L2 si intercalano tra le L1 e partecipano all'incapsidazione del genoma virale.

1.3-Ciclo vitale di HPV

L'infezione da papillomavirus avviene attraverso il contatto iniziale del virus con lo strato superficiale dell'epitelio squamoso pluristratificato cervicale e il successivo accesso allo strato basale. Questo è possibile grazie a microlesioni che permettono al virus di penetrare attraverso i vari strati e raggiungere lo strato basale di cellule staminali. Attualmente esistono ancora controversie sul preciso recettore coinvolto nell'entrata del virus nelle cellule basali. Si pensa che i proteoglicani eparan solfato giochino un ruolo nella fase iniziale dell'entrata del virus (Patterson *et al.*, 2005; Joyce *et al.*, 1999). Come per altri virus (Chung *et al.*, 1998; Summerford *et al.*, 1999) sembra che HPV abbia bisogno di recettori secondari per un'infezione efficiente come il recettore integrina $\alpha 4\beta 6$ (Evander *et al.*, 1997; Bossis *et al.*, 2005). L'endocitosi di HPV 16 avviene con vescicole rivestite di clatrina. Dopo il legame con i recettori, i virioni entrano lentamente nel compartimento citoplasmatico (Culp T.D. & Christensen N.D., 2004), si disassemblano nei lisosomi e in seguito il DNA virale viene trasferito nel nucleo trasportato dalla proteina capsidica minore L2 (Day *et al.*, 2003). Nello strato basale dell'epitelio, il DNA di HPV è mantenuto nella forma episomale ed inizia ad esprimere le proteine E1 ed E2 che attivano la replicazione del genoma virale. Nelle cellule basali infettate, il DNA è mantenuto a un basso numero di copie episomali, circa 10-100 genomi per cellula. La replicazione del DNA dipende quasi totalmente da fattori di replicazione della cellula ospite a parte l'elicasi virale E1. A livello basale e parabasale dell'epitelio cervicale pluristratificato il virus esprime le proteine precoci E1-E2 ed E6-E7 (Figura 3). In questo stadio la proteina E2 attiva l'espressione controllata delle proteine E6 ed

E7 che stimolano la cellula ospite a proliferare. Negli strati cellulari intermedi il DNA virale interrompe la replicazione ed inizia ad esprimere le proteine precoci E4 ed E5 che servono rispettivamente ad attivare l'espressione dei geni tardivi L1 ed L2 e ad incapsidare il DNA virale all'interno del virione (Figura 3). Negli strati più superficiali dell'epitelio, nelle cellule squamose, viene completato l'assemblaggio del virus (Figura 3). In seguito, la progenie virale è rilasciata dalle cellule superficiali in sfaldamento dell'epitelio e i virioni rilasciati all'esterno iniziano una nuova infezione. I processi di maturazione del virus, dagli strati profondi al rilascio, richiedono ciascuno circa 6 settimane.

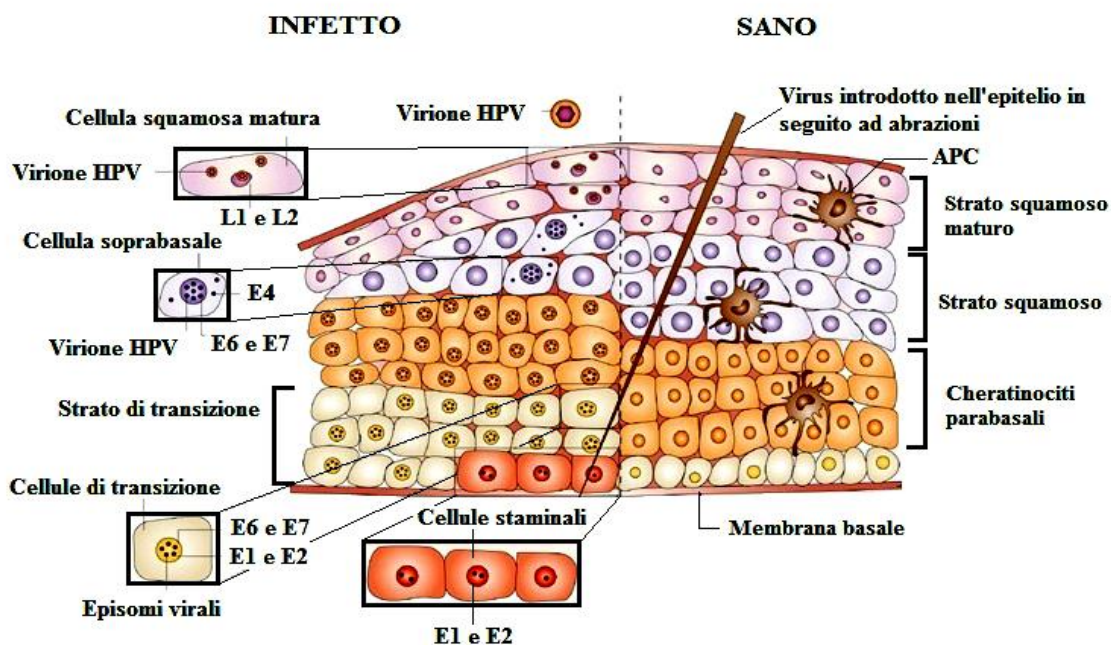


Figura 3. Rappresentazione schematica dell'epitelio cervicale infettato dal virus HPV confrontato con un epitelio cervicale sano (Frazer, 2004).

1.4-Le proteine responsabili della trasformazione cellulare: E6 ed E7

E6 è uno dei primi geni ad essere espresso durante l'infezione dei papillomavirus. Codifica per una proteina di 150 aminoacidi con un peso molecolare di circa 18 kD. Essa presenta

quattro motivi Cys-X-X-Cys che permettono la formazione di due strutture “zinc finger” (Thomas *et al.*, 1999).

La proteina E6 degli HPV oncogeni è distribuita nel nucleo; è priva di attività enzimatica intrinseca e per esercitare la sua funzione deve interagire con diverse proteine cellulari: fattori di trascrizione, proteine pro-apoptotiche, proteine coinvolte nella formazione e mantenimento dell'architettura cellulare, polarità e adesione, e fattori di replicazione e riparo del DNA. (Zur Hausen, 2002). La funzione più nota di E6 dei virus HPV oncogeni è quella di legare la proteina oncosoppressoria p53 e indurne la degradazione (Scheffner *et al.*, 1990; Werness *et al.*, 1990). p53 svolge un ruolo di primaria importanza nel regolare l'espressione di proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare. In particolare, p53 viene attivata in seguito a danno al DNA e promuove la trascrizione di p21, un inibitore del complesso ciclina/chinasi dipendente da ciclina (cdk), che blocca la progressione del ciclo cellulare; in alternativa, induce la cellula all'apoptosi quando il danno al DNA è irreparabile (Vogelstein *et al.*, 2000). L'apoptosi è uno dei meccanismi cellulari in risposta ad infezioni virali per limitare la diffusione del virus nelle cellule circostanti. Molti virus, tra cui gli HPV, hanno evoluto un sistema di evasione dell'apoptosi che contribuisce a favorire i processi della trasformazione cellulare. E6 degrada p53 complessandosi alla proteina cellulare E6-AP (E6 associated protein) che determina l'ubiquitinazione della p53 per successiva degradazione nel proteasoma. E6 è in grado di interferire con le normali funzioni di altre proteine apoptiche come Bak, un membro della famiglia Bcl-2, FADD e la procaspasi 8 (Thomas & Banks, 1999; Garnett *et al.*, 2006). E6 interferisce con p53 anche indirettamente, associandosi a p300/CBP, un coattivatore di p53. In seguito all'inattivazione funzionale di p53, vengono deregolati i principali meccanismi di controllo del ciclo cellulare in G1/S e G2/M con conseguenti anomalie a livello della duplicazione e della struttura dei cromosomi. Variazioni polimorfiche nella sequenza di p53, come il polimorfismo nel codone 72, risultano più suscettibili alla degradazione indotta da E6 (Storey *et al.*, 1998). E6 presenta anche un'attività indipendente da p53, importante per l'immortalizzazione di cellule umane. Infatti, sono state identificate proteine E6 di HPV-16 incapaci di degradare p53, ma che immortalizzano cellule epiteliali mammarie umane. Viceversa, altri mutanti mantengono la capacità di degradare p53, ma non sono in grado di immortalizzare le cellule (Liu, 1999). Questi dati dimostrano che per l'immortalizzazione cellulare è importante l'interazione di E6 con altre proteine, oltre che con p53. Ad esempio E6 interagisce con proteine appartenenti alla famiglia PDZ; queste presentano un dominio conservato che si trova spesso in proteine situate nelle aree di contatto tra le cellule, come le giunzioni strette tra le cellule epiteliali o le giunzioni sinaptiche delle

cellule neurali. Le proteine PDZ sono importanti per il mantenimento dell'architettura molecolare al fine di rendere possibile la trasmissione del segnale. Membri della famiglia PDZ, MUPP-1, hDLG e hSCRIB, MAGI-1, -2 e -3, GIPC, PATJ, PTPN3 e PSD95, sono legate all'estremità C-terminale delle proteine E6 degli HPV oncogeni e successivamente degradate (Gardiol *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Glaunsinger *et al.*, 2000; Nakagawa & Huibregtse, 2000; Massimi *et al.*, 2004). La degradazione di queste proteine indotta da E6 causa potenzialmente la perdita dei contatti cellulari mediati da giunzioni aderenti e quindi contribuisce alla perdita di polarità delle cellule. Queste alterazioni sono state evidenziate nelle cellule di carcinomi del collo dell'utero associati ad HPV. Non è chiaro quali siano i meccanismi attivati in seguito al legame di E6 alle proteine PDZ e quali membri di tale famiglia siano più importanti per alterare i fenotipi delle cellule.

Un'altra funzione fondamentale della proteina E6 nell'immortalizzazione cellulare è la capacità di attivare l'espressione della subunità catalitica della telomerasi, hTERT. La telomerasi umana è un complesso ribonucleoproteico composto dalla trascrittasi inversa, che ha funzione catalitica, (hTERT) e una componente ad RNA. hTERT è espressa solo in specifiche cellule germinali, cellule staminali proliferative, la cui funzione è il rinnovamento dei tessuti, ma anche nelle cellule tumorali. Nelle cellule germinali l'espressione di hTERT garantisce l'attività della telomerasi e la soppressione della senescenza cellulare. L'attività della telomerasi non è presente nella maggior parte dei tessuti somatici e i telomeri accorciandosi a ogni divisione cellulare portano la cellula alla senescenza (invecchiamento). E6 attiva la trascrizione di hTERT attraverso l'azione combinata dei fattori di trascrizione Myc e Sp1. E6 associandosi a Myc e al suo cofattore Max, attiva il promotore di hTERT (Veldman *et al.*, 2001). Recentemente è stato identificato NFX1-91 come repressore cellulare del promotore di hTERT. E' stato dimostrato che il complesso E6/E6AP degrada NFX1-91 consentendo il legame di myc al promotore hTERT (Gewin *et al.*, 2004). Al contrario una variante di splicing di NFX1 chiamata NFX1-123 non può interagire con la proteina virale E6 e quindi l'espressione di hTERT nelle cellule epiteliali viene mantenuta repressa (Katzenellenbogen *et al.*, 2007).

E7 è una fosfoproteina acida di circa 100 aminoacidi che si trova prevalentemente nel nucleo. E7 è importante per l'immortalizzazione delle cellule, ma per stabilire un'efficiente immortalizzazione di cheratinociti umani è necessaria l'azione combinata di E6 ed E7 (Felsani *et al.*, 2006). E7 è composta da tre domini: CR1, CR2 e CR3. CR1 e CR2 si trovano

nella regione N-terminale e CR3, che contiene due domini “zinc finger” importanti per la dimerizzazione, nella frazione C-terminale. Il dominio CR2 contiene una sequenza LXCXE omologa alla proteina E1A degli Adenovirus e all’Antigene T grande dei Poliomavirus (Phelps et al., 1988; Vousden and Jat, 1989).

E7 interagisce con numerose proteine cellulari: fattori di trascrizione e proteine che rimodellano la cromatina, regolatori negativi del ciclo cellulare, e componenti della risposta immunitaria innata.

Il ruolo oncogeno principale di E7 riguarda la sua capacità di associarsi alle proteine appartenenti alla famiglia del retinoblastoma: pRb, p107 e p130 (Dyson et al., 1989; Davies et al., 1993). pRb è una fosfoproteina nucleare che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare. Nel suo stato attivo ipofosforilato pRb costituisce un freno al passaggio dalla fase G1 alla fase S. Quando le cellule sono stimolate a dividersi, pRb viene inattivata mediante fosforilazione e la cellula passa dalla fase G1 alla fase S. Nelle cellule quiescenti la forma attiva di pRb, cioè ipofosforilata, inibisce la replicazione cellulare legandosi a specifici fattori di trascrizione, appartenenti alla famiglia E2F, posizionati sui promotori dei geni. Quando le cellule quiescenti vengono stimolate da fattori di crescita e da mitogeni, si attivano i complessi ciclina D/CDK4 e ciclina D/CDK6 che fosforilando pRb lo rimuovono dai fattori di trascrizione E2F. In questo modo E2F possono attivare la trascrizione di diversi geni bersaglio. Gli altri due membri della famiglia del retinoblastoma, p107 e p130, sono coinvolti nel controllo delle diverse fasi del ciclo cellulare. p130 esercita la sua funzione regolatoria durante la fase G0/G1, mentre p107 è attiva nella transizione G1/S.

Oltre a legare pRb, E7 ne media anche la degradazione attraverso il sistema del proteasoma. I membri della famiglia pRb sono i principali regolatori dell’uscita dal ciclo cellulare, che avviene durante la differenziazione degli epitelii. E7 è in grado anche di interagire con le chinasi dipendenti da ciclina, CDK2 dipendente dalle ciclina A ed E (Arroyo *et al.*, 1993) e si associa agli inibitori dei complessi ciclina/cdk come p21 e p27 bloccandone l’azione inibitoria e favorendo l’attività dei complessi ciclina/cdk (Funk *et al.*, 1997). Un inibitore del complesso ciclina/cdk, p16INK4a, che impedisce la fosforilazione dei membri della famiglia pRb, è sovraespresso quando pRb è inattivato a causa della presenza di E7 di HPV. Normalmente, l’iperespressione di questo inibitore dovrebbe indurre l’arresto del ciclo cellulare ma in presenza di E7, con meccanismi che ancora non sono noti, non è in grado svolgere il suo ruolo inibitorio. Sebbene l’iperespressione di p16INK4a non influisca direttamente sul ciclo vitale del virus, tale inibitore è considerato un utile marker biomolecolare della progressione delle lesioni cervicali preneoplastiche (Ishikawa *et al.*, 2006). Un altro gruppo di proteine

legate da E7 sono le istone deacetilasi (HDAC). Generalmente la repressione di promotori indotti da E2F è mediata non solo dal legame a pRb, ma anche dall'azione di HDAC (Brehm *et al.*, 1999). Nelle cellule normali, pRb lega le HDAC e le recluta a livello di promotori inducibili da E2F. Recentemente si è visto che le proteine E7 legano HDAC indipendentemente dal loro legame con pRb e questa associazione permetterebbe ad E7 di immortalizzare la cellula e di mantenere il DNA virale in forma episomale. Le proteine HDAC sono espresse in tutte le cellule e agiscono per rimuovere i gruppi acetile da code N-terminali degli istoni che formano i nucleosomi, bloccando così la replicazione. Inoltre, le HDAC deacetilano direttamente i fattori di trascrizione E2F, con conseguente perdita della loro funzione. Sono state identificate tre classi di HDAC, ma i membri delle prime due classi sono quelli maggiormente studiati. Le HDAC di classe I sono attive solo quando legate a cofattori che ne modulano l'attività o le dirigono al sito dove verranno deacetilate. Fanno parte di questa classe le HDAC 1, 2, 3, 8, localizzate esclusivamente nel nucleo. Le HDAC di classe II entrano ed escono dal nucleo. Le proteine E7 degli HPV ad alto rischio si legano alle HDAC 1 e 2 attraverso MIP2 β , che si lega direttamente a E7. In particolare, la proteina E7 di HPV-16 e HPV-31 spiazza HDAC da pRb e lega questa proteina indipendentemente da pRb. Si è visto che inducendo mutazione nel sito di legame per HDAC sulla proteina E7 di HPV-31, il genoma virale è incapace di mantenersi stabilmente in forma episomale. Non è chiaro il motivo per cui il legame di HDAC ad E7 sia necessario per il mantenimento del genoma virale. Una possibilità è che il legame di HDAC ad E7 blocchi la capacità di deacetilare i fattori di trascrizione E2F, portando alla loro rilocalizzazione all'esterno del nucleo. La rimozione dell'attività di HDAC dai promotori ne rende possibile l'acetilazione e la successiva attivazione. Un altro importante bersaglio di E7, necessario per lo svolgimento del suo ruolo nel contesto della patogenesi virale è la transattivazione dell'enzima fosfatasi cdc25. In esperimenti di trasfezione transiente, si è visto che E7 transattiva il promotore della fosfatasi cdc25A associandosi a pRb e HDAC sui siti di legame E2F presenti su tale promotore. cdc25A è importante per la defosforilazione e attivazione dei complessi ciclina/cdk ed è necessario per la progressione nel ciclo cellulare (Jinno *et al.*, 1994). Infine, E7 silenzia i geni reclutando le HDAC, come l'"interferon regulatory factor 1", (IRF1) la cui espressione è importante per la risposta del sistema immunitario e degli interferoni verso infezioni di papillomavirus persistenti (Park *et al.*, 2000).

La regione C-terminale di proteine E7 appartenenti agli HPV oncogeni presenta domini Cys-X-X-Cys, simili a domini a dita di zinco. La mutazione di una o di entrambe le cisteine in uno di questi domini porta alla perdita della capacità di immortalizzare cheratinociti umani del

derma (HFK) e di trasformare cellule di roditore (Dyson *et al.*, 1989). Inoltre, la stabilità di E7 diminuisce notevolmente in seguito alla mutazione di queste cisteine, dimostrando la loro importanza nel mantenere l'integrità strutturale di E7. Una delle proprietà più salienti della proteina E7 degli HPV ad elevato rischio è la loro capacità di indurre instabilità genomica. Molti tipi di cancro positivi all'HPV contengono diverse aneuploidie, ad indicare che variazioni nel numero di cromosomi sono eventi importanti nella progressione tumorale. L'espressione unicamente di E7 è sufficiente ad indurre un aumento anomalo nel numero di cromosomi in cheratinociti umani primari (Duensing *et al.*, 2000). Proteine E7 mutate che non legano o degradano pRb, ma si associano a p107, mantengono la capacità di indurre anomalie a livello dei centrosomi che sono i principali centri di organizzazione dei microtubuli del fuso mitotico e di segregazione dei cromosomi nelle cellule figlie durante la divisione cellulare (Duensing & Munger, 2003). Tali anomalie si osservano anche in cellule prive di pRb e p53 e in fibroblasti embrionali di topi "knock out" per pRb, p130 e p107. E' possibile che il legame di una combinazione di membri della famiglia pRb o di altri fattori sia richiesta per mediare le anomalie del centrosoma (Duensing & Munger, 2003).

1.5-HPV e tumorigenesi

Un aspetto importante del ciclo vitale degli HPV è la capacità di stabilire infezioni persistenti negli epitelii cervicali squamosi. Gli HPV ad "alto rischio" utilizzano questa strategia per contrastare efficientemente il differenziamento cellulare e favorire la trasformazione neoplastica. Un evento chiave della tumorigenesi indotta da HPV è l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite (Figura 4) (Kalantari *et al.*, 1998; Kalantari *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 1985). L'integrazione del genoma di HPV è un processo ordinato e ormai ben caratterizzato. Alcune regioni del DNA virale sono delete, come E2, altre vengono integrate ma trascrizionalmente silenziate mentre le sequenze E6 ed E7 sono integrate e trascrizionalmente attive. In particolare, la perdita della sequenza genica E2, che normalmente controlla l'espressione regolata di E6 ed E7, comporta la trascrizione incontrollata delle oncoproteine virali. Ne consegue che la cellula ospite che contiene le sequenze E6 ed E7 integrate acquisisce un vantaggio di crescita selettivo rispetto a quella che contiene il DNA virale in forma episomiale. E' stato dimostrato che l'inibizione dell'espressione di E6 ed E7 in cellule in coltura trasformate reverte il fenotipo maligno, evidenziando l'importanza

primaria delle oncoproteine virali nel processo tumorigenico (Jiang & Milner, 2005; Hall & Alexander, 2003; Goodwin *et al.*, 1998). Analogamente riattivando l'espressione della sequenza genica E2 in linee tumorali cervicali viene arrestata la proliferazione cellulare.

Il processo tumorigenico di HPV modifica le caratteristiche istologiche del tessuto cervicale pluristratificato. Clinicamente i cambiamenti del tessuto cervicale indotti da HPV vengono diagnosticati come lesioni displastiche o pre-neoplastica o "cervical intraepithelial neoplasia" (CIN) (Figura 4). Nelle lesioni CIN1, il DNA virale è presente solo in forma episomale e i livelli di espressione delle oncoproteine E6 ed E7 sono mantenuti relativamente bassi (Schiller *et al.*, 2010). Nelle CIN2, che rappresentano le lesioni di transizione tra le CIN1 e le CIN3, il DNA virale è presente in parte in forma episomale e in parte in forma integrata. In questa fase, come anticipato precedentemente, i cheratinociti che contengono le sequenze di E6 ed E7 integrate sovraesprimono le oncoproteine virali e acquisiscono un vantaggio proliferativo che farà progredire la cellula verso un grado di malignità maggiore, il CIN3. La lesione CIN3 è caratterizzata da cheratinociti che esprimono in modo incontrollato le oncoproteine E6 ed E7 e hanno perso definitivamente le capacità di regolare la proliferazione e il differenziamento.

Studi epidemiologici e dati sperimentali indicano che la presenza di HPV nei cheratinociti cervicali è una condizione necessaria ma non sufficiente per indurre il cancro, ed altri eventi genetici ed epigenetici a carico della cellula ospite sarebbero implicati nel processo multifasico di trasformazione neoplastica (Zur Hausen, 2002). Nei carcinomi e nelle lesioni cervicali premaligne sono state rilevate alterazioni strutturali o funzionali di protooncogeni, geni oncosoppressori e modificazioni epigenetiche. Tra i protooncogeni cellulari sono state identificate mutazioni e/o amplificazioni geniche nei geni della subunità p110 α dell'enzima fosfatidilinositolo 3kinasi, la PIK3CA, di RAS, MYC, ErbB2 e cIAP1 (Bertelsen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002; Imoto *et al.*, 2002). Tra i geni oncosoppressori la perdita di PTEN e TSLC1 e NOTCH sembra associata alla progressione del tumore.

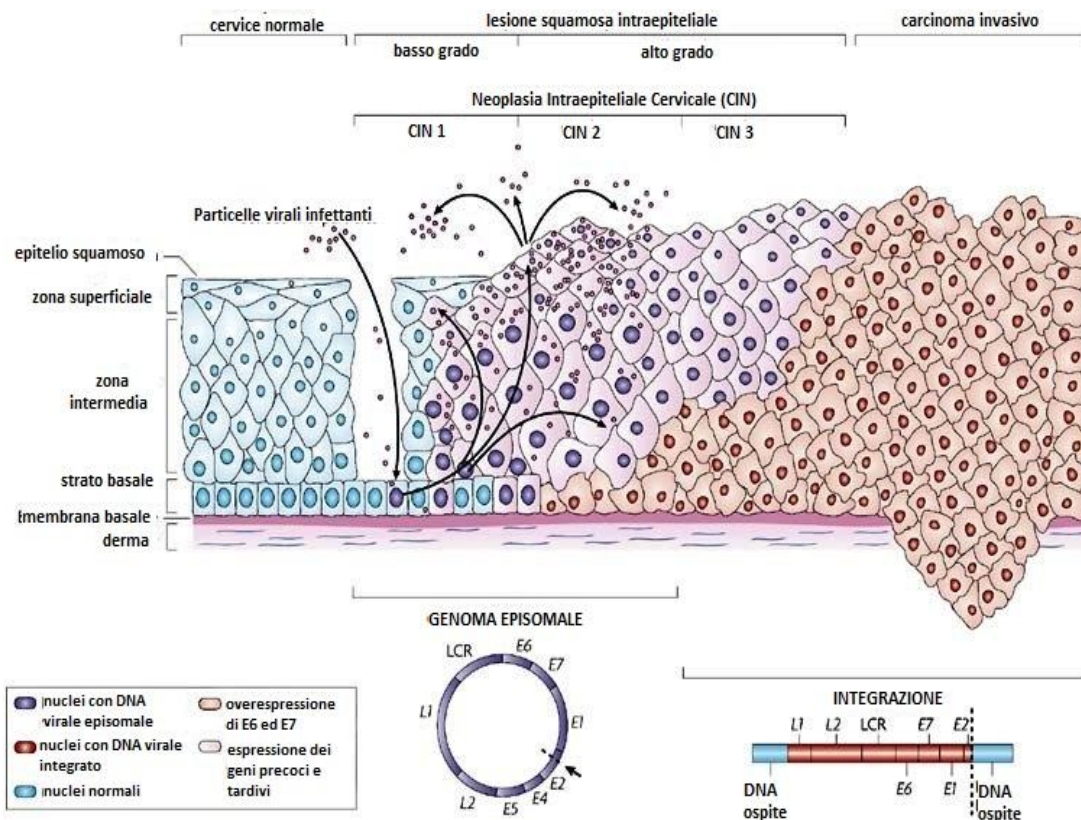


Figura 4. Meccanismo di integrazione del DNA di HPV nel genoma cellulare dei cheratinociti e corrispondente grado di malignità delle lesioni. (Ciaran et al., 2007).

Capitolo 2

CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA

2.1-Anatomia della cervice uterina

La cervice uterina, o collo dell'utero, è la porzione inferiore dell'utero in continuità con la regione anteriore e superiore della vagina attraverso l'orifizio uterino esterno. Ha un aspetto conico-cilindrico, con un diametro ridotto rispetto al corpo e al fondo dell'utero. Si distinguono due porzioni, ben demarcate dalla presenza dell'orifizio uterino esterno: il canale endocervicale e l'esocervice (Zanoio, 2007) (Figura 5A).

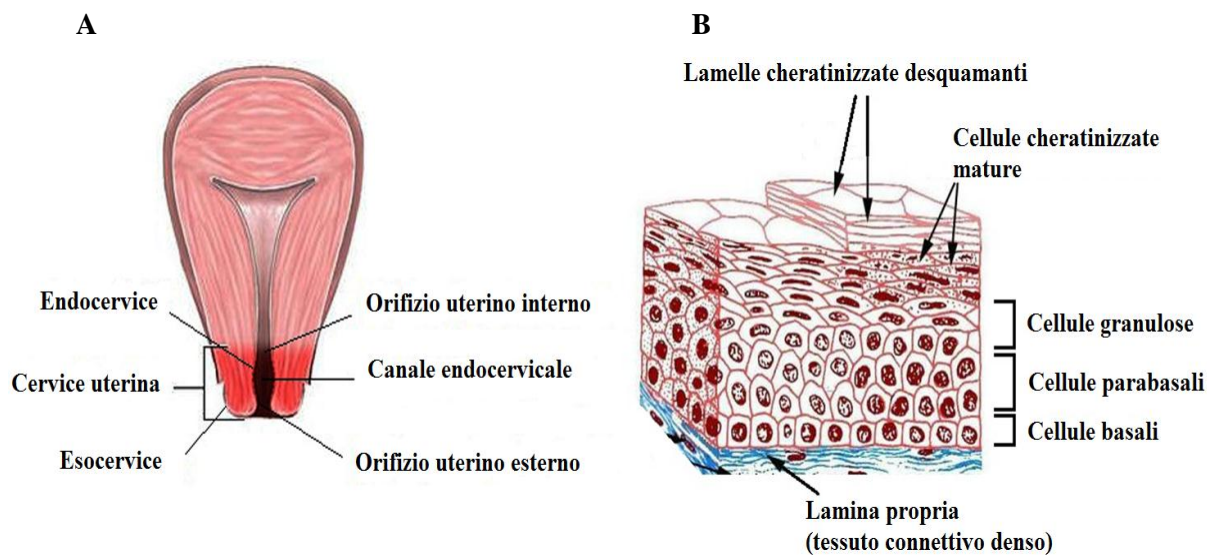


Figura 5. Rappresentazione schematica della cervice uterina (A) e dell'epitelio esocervicale (B).

2.1.1 Canale endocervicale

Il canale endocervicale attraversa l'intera cervice e rappresenta il passaggio tra la cavità uterina e quella vaginale (Figura 5A). Esso è appiattito in senso antero-posteriore e varia notevolmente in lunghezza e larghezza; nelle donne in età riproduttiva misura da 7 a 8 mm nel punto più largo.

Il canale endocervicale è circondato internamente dal tessuto endocervicale che si estende dall'orifizio uterino esterno, vaginale, a quello interno, uterino (Figura 5A). Nel tessuto endocervicale sono presenti pliche che delimitano cripte cervicali deputate alla produzione di muco. La mucosa endocervicale è costituita da un epitelio di rivestimento a cellule cilindriche semplici e ciliate e da cellule del muco; è delimitata da una tonaca propria di fitti fasci connettivali ricchi di fibre di collagene e fibroblasti; presenta numerose ghiandole cervicali tubulari ramificate (Zanoio, 2007).

2.1.2 Esocervice

L'esocervice o portio, è la parete esterna del collo dell'utero visibile attraverso la vagina con un l'aiuto dello speculum vaginale (Figura 5A). Rappresenta il tratto di cervice uterina che sporge nella vagina. Essa continua da una estremità l'endocervice e dall'altra la mucosa vaginale. La mucosa esocervicale è costituita da un epitelio di rivestimento pavimentoso pluristratificato e da una tonaca propria di connettivo sollevata in papille riccamente vascolarizzate (Figura 5B); non contiene ghiandole (Zanoio, 2007). Il punto di congiunzione tra l'endocervice e l'esocervice è detto "giunzione squamo-colonnare", punto dinamico che si colloca superiormente o inferiormente all'orifizio uterino esterno in funzione dell'età della donna e della sua stimolazione ormonale. Cefalicamente alla giunzione esiste la "zona di trasformazione" costituita da cellule totipotenti di riserva che cambiano l'epitelio colonnare in epitelio squamoso pluristratificato attraverso un passaggio intermedio definito "metaplasia squamosa".

2.2-Epidemiologia del carcinoma della cervice uterina nel mondo e in Italia

Il cancro cervicale è tra i più comuni tumori dopo quello al seno e al coloretto ed il secondo tra i tumori femminili. Nel 2008 sono stati stimati circa 530.000 nuovi casi e 270.000 decessi attribuiti a cancro cervicale invasivo, con l'86% di casi e l'88% di morti nei Paesi in via di sviluppo (Arbyn *et al.*, 2011). In questi Paesi l'incidenza è di 18 donne/100.000 e la mortalità 10/100.000, mentre nei Paesi sviluppati l'incidenza è di 9 donne/100.000 e la mortalità 3/100.000. Le differenze riflettono il divario tra i diversi programmi di screening, la diversa

esposizione agli HPV e altri cofattori come, il fumo, l'uso di contraccettivi orali e altre infezioni sessualmente trasmesse come il virus dell'immunodeficienza acquisita o HIV (Arbyn *et al.*, 2011). In Italia si verificano ogni anno circa 3.500 nuovi casi di carcinoma della cervice uterina e 1.500 decessi. Il rapporto 2010 dell'Associazione Italiana Registro Tumori (AIRTUM) relativo all'anno 2006 indica che in Italia la prevalenza è di 53.361 casi. Nello specifico sono stati individuati 222/100.000 casi nel Nord-Ovest, 194/100.000 nel Nord-Est, 175/100.000 nel centro Italia, 140/100.000 nel Sud. In Italia i programmi di screening sono iniziati in alcune località a partire dagli anni '70; dal 1996 la loro applicazione è regolata su base regionale e prevede inviti ambulatoriali, ogni tre anni, alle donne di età compresa tra i 25 e i 64 anni per effettuare l'esame citologico Pap-test.

2.3-Classificazione delle lesioni precancerose

Il carcinoma della cervice uterina è preceduto da una fase di lesioni preinvasive o precancerose asintomatiche e non evidenti macroscopicamente, che possono essere rilevate mediante test citologico Pap-test.

2.3.1 Test citologico Pap-test

Negli ultimi 40 anni, nei Paesi Occidentali l'incidenza dei tumori dell'utero è diminuita grazie ai programmi di screening e all'utilizzo della metodica diagnostica Pap-test. Esso fu ideato oltre 60 anni fa da Georgos Papanicolau prima che si sapesse quale fosse la causa del cancro alla cervice uterina. Questa tecnica si basa sull'osservazione dei cambiamenti morfologici subiti dalle cellule cervicali trasformate e rappresenta a tutt'oggi uno dei test di screening meno invasivi e costosi utilizzato nella diagnostica medica. Il Pap-test consiste nel prelievo di alcune cellule a livello del collo dell'utero sia a livello esocervicale che endocervicale. I due prelievi vengono strisciati su due vetrini separati o su un unico vetrino in due segmenti diversi e fissati con apposito spray. La colorazione e la lettura del vetrino sarà competenza di un laboratorio analisi. E' un esame quindi rapido e indolore, ma estremamente importante per diagnosticare eventuali processi infiammatori e/o infettivi, patologie displastiche o neoplastiche.

2.3.2 Classificazione istologica europea

Il norvegese Ralph Richart propose nel 1967 una classificazione denominata CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasm) in cui le lesioni venivano suddivise in tre gradi: CIN1 o displasia lieve; CIN2 o displasia moderata; CIN3 e CIS o displasia grave, per cui la diagnosi differenziale tra queste due entità non diviene più necessaria. La classificazione CIN suddivide le lesioni in tre gradi utilizzando un metodo semi-quantitativo che valuta la progressiva perdita di maturazione morfologica delle sue cellule epiteliali (Mariuzzi, 2006). L'epitelio pluristrificato escocervicale subisce modificazioni nella cellularità, differenziazione, polarità, caratteristiche nucleari e attività mitotica delle cellule (Fu, Regan, 1989).

Le lesioni CIN1 sono caratterizzate da alterazioni precoci delle cellule epiteliali cervicali come le dimensioni, la morfologia e il numero e si estendono nel terzo inferiore dell'epitelio escocervicale (WHO/ICO, 2010). Le alterazioni sono indotte dall'effetto citopatico dell'infezione replicativa del virus HPV. Le cellule epiteliali sono caratterizzate da lieve atipia e l'organizzazione architetturale è pressoché mantenuta; è presente vacuolizzazione citoplasmatica perinucleare (coilocitosi) in tutti gli strati epiteliali, aumento di volume dei nuclei, possibile perdita della polarità, lieve aumento delle mitosi e della cellularità dello strato basale (Mariuzzi, 2006; Fu, Regan, 1989).

La displasia moderata (CIN2), la displasia grave (CIN3) ed il carcinoma in situ (CIS) sono tutte definite lesioni ad alto grado, in quanto il loro potenziale di trasformazione oncogenica è più elevato rispetto a CIN1, ma pressoché simile tra loro. In confronto al CIN1 mostrano maggiori atipie citologiche ed un maggior grado di disorganizzazione, mentre la coilocitosi è molto attenuata o del tutto assente. Queste lesioni possiedono la simile tendenza ad invadere i tessuti più profondi della cervice e per questo motivo attualmente tutti i protocolli ne indicano il trattamento (WHO/ICO, 2010).

Nel CIN2 le cellule immature occupano fino ai 2/3 inferiori dell'epitelio cervicale e presentano atipie nucleari maggiori che in CIN1 (irregolarità nel volume nucleare, nella forma nucleare, nella distribuzione della cromatina e nel rapporto nucleo/citoplasma) e più frequenti figure mitotiche atipiche, caratteristica distintiva rispetto alle lesioni di basso grado perché indice di aneuploidia (Fu, Regan, 1989).

CIN3/CIS corrispondono ad una displasia severa: tutto l'epitelio mostra un'alta cellularità, immaturità, orientamento verticale ed attiva proliferazione, potendo raggiungere la superficie della mucosa. In alcune lesioni gli elementi cellulari risultano pleomorfi ed eterogenei. La differenziazione e la stratificazione sono pressoché assenti o presenti solo nel quarto

superficiale dell'epitelio con numerose figure mitotiche. Alcune cellule possono presentare caratteri di malignità e per questo motivo è consuetudine considerare queste lesioni come dirette precorritrici della neoplasia cervicale invasiva (Fu, Regan, 1989).

2.3.3 Classificazione istologica americana

La classificazione americana Bethesda, nata nel 1988 e successivamente modificata nel 2001, individua in dettaglio tutte le alterazioni citologiche potenzialmente riscontrabili in un Pap-test. Questa classificazione tiene conto anche degli aspetti infiammatori e infettivi, oltre a quelli displastici e neoplastici. La classificazione Bethesda suddivide le anomalie citologiche in Lesioni intraepiteliali di basso grado (LSIL), che comprendono HPV/displasia lieve, CIN1 e Lesioni intraepiteliali di alto grado (HSIL), che comprendono displasia moderata CIN2, displasia grave CIN3 e carcinoma in situ della classificazione europea.

2.4-Epidemiologia delle lesioni precancerose

Grazie all'introduzione dei programmi di screening nei Paesi sviluppati, negli ultimi 50 anni, accanto alla riduzione dell'incidenza della neoplasia cervicale, si è contemporaneamente verificato un aumento dell'incidenza delle lesioni preneoplastiche (ACOG, 2004). Nel 2006 la WHO ha stimato che, in una popolazione tra i 25 ed i 65 anni sottoposta allo screening cervicale per la prima volta, le lesioni CIN1 sono diagnosticate nel 3-10% delle donne e le CIN2 e CIN3/CIS nell'1-5%. Il numero di lesioni precancerose che si possono riscontrare in una popolazione dipende da diversi fattori tra cui la prevalenza dei fattori eziopatogenetici nella popolazione indagata, l'età del gruppo oggetto di studio, l'adesione continuativa al programma di diagnosi precoce, la prevalenza dell'HPV nella popolazione in esame e lo stato immunitario dell'ospite (WHO, 2006).

2.5-Andamento clinico delle lesioni precancerose

La progressione delle lesioni CIN verso il cancro cervicale è un processo molto lungo e complesso ed è fortemente condizionato dalla risposta immunitaria dell'ospite. Infatti, non tutte le lesioni CIN progrediscono e soprattutto le CIN1 regrediscono spontaneamente in circa l'80% dei casi grazie ad una adeguata risposta immunitaria. Le percentuali di regressione e progressione dei diversi gradi di displasia sono indicate nella Tabella riportata di seguito (Tabella 1).

| Lesione | Regressione | Persistenza | Progressione a CIN3 | Progressione a carcinoma invasivo |
|----------|-------------|-------------|---------------------|-----------------------------------|
| CIN1 | 57% | 32% | 11% | 1% |
| CIN2 | 43% | 35% | 22% | 1.5% |
| CIN3/CIS | 32% | <56% | - | >12% |

Tabella 1. Percentuale di regressione - persistenza - progressione dei diversi gradi di lesioni preneoplastiche (Ostor et al., 1993)

Il tempo di sviluppo di una neoplasia CIN1 varia dai 2 ai 5 anni e sono necessari circa 4-5 anni affinché un CIN1 diventi CIN2 o CIN3 e 5-15 anni perché degeneri in carcinoma invasivo. Di conseguenza il picco medio delle displasie CIN è intorno ai 25 anni, del CIS ai 40 anni e del carcinoma invasivo ai 55 anni. Tuttavia, non sempre la lesione precoce iniziale segue un andamento progressivo di malignità e può trasformarsi in forme invasive più aggressive in meno di 12 mesi.

2.6-Diagnosi e chirurgia

La colposcopia riveste un ruolo importante nei programmi di screening per il Carcinoma Invasivo della Cervice (CIC), dal momento che costituisce l'indagine di riferimento per la valutazione di secondo livello dei Pap-test anormali (Broccolo, 2008). L'esame colposcopico ha inizio con l'osservazione, previa introduzione dello speculum e dopo la detersione della portio con un batuffolo intriso di soluzione fisiologica, dapprima direttamente con

ingrandimento da 6 a 12 volte (visione panoramica), poi con l'apposizione del filtro verde, che permette di evidenziare la rete vascolare sottostante, delle mucose della portio e della vagina. Il secondo passaggio dell'esame colposcopico consiste nell'applicazione di una soluzione acquosa di acido acetico al 3 o al 5% che, oltre a rimuovere il muco, crea un effetto di rigonfiamento dell'epitelio colonnare e di quello anormale, dovuto all'agglutinamento delle proteine nucleari (maggiori nell'epitelio atipico, che si presenterà più bianco di quello sano). Si evidenzia la giunzione squamo-colonnare, eventualmente utilizzando un apposito dilatatore cervicale (di Kogan), e poi si valutano eventuali anomalie di struttura, spessore, topografia dell'epitelio di rivestimento del collo dell'utero.

L'epitelio che diventa bianco all'acido acetico non è solo quello neoplastico, ma anche quello delle lesioni da virus HPV, quello della zona congenita di trasformazione e quello con metaplasia squamosa immatura (Broccolo, 2008). Successivamente si passa al test di Lugol o test di Schiller utilizzando una soluzione iodo-iodurata (1g di iodio + 2g di ioduro di potassio in 100 ml di acqua distillata), basato sul principio che solamente i tessuti maturi, contenenti glicogeno, e sani sono in grado di captare il reattivo, colorandosi di rosso mogano, a differenza dei tessuti immaturi e atipici che restano privi di colore (Zanoio, 2007). La biopsia della portio viene effettuata sotto guida colposcopica, prima o dopo il test di Schiller, in presenza di aree sospette o di citologia positiva, con apposite pinze con taglio a baionetta o ansa diatermica. La biopsia deve interessare a pieno la lesione e comprendere anche il connettivo (Zanoio, 2007).

Capitolo 3

BACKGROUND DELLA RICERCA

3.1-La diagnosi delle CIN e i marker della progressione neoplastica

Il grado delle CIN è definito a livello istologico con tecniche standardizzate di anatomia patologica ed influenza in modo incisivo la scelta del trattamento sulle pazienti. Un limite della diagnosi istologica è che valuta esclusivamente le *caratteristiche morfologiche* delle cellule epiteliali, contrastate peraltro con i semplici coloranti ematossilina ed eosina, escludendo altri parametri potenzialmente utili per la diagnosi approfondita delle lesioni cervicali. Un altro svantaggio della diagnosi istologica è che classifica le CIN in modo *statico*, raggruppandole in “gradi”, mentre una lesione CIN è il risultato di un processo dinamico, seppur bilanciato, che può progredire, persistere ma anche regredire. L’esame istologico non può distinguere le poche donne con lesioni che svilupperanno un carcinoma invasivo dalla vasta quantità di donne le cui anomalie regrediranno spontaneamente. Oltre a questo, rimane ancora la necessità di individuare parametri intra- ed inter- osservazionali riproducibili, che per quanto riguarda le CIN, sono ancora lontani dall’essere perfetti a tal punto che, in alcuni casi, è perfino difficile distinguere le reali lesioni CIN dalle lesioni non-neoplastiche, di conseguenza il rischio del sovra- o sotto-trattamento delle lesioni è un’evenienza ancora possibile.

Per quanto detto, negli ultimi anni gli studi si sono focalizzati sulla ricerca di nuovi marcatori diagnostici rivolti a migliorare la classificazione e la predittività clinica delle lesioni precancerose enfatizzando la loro natura in divenire e cambiando il concetto di una stadiazione morfologica statica verso un’interpretazione dinamica che presenti un effetto prognostico più forte (Baak *et al.*, 2006).

Alcuni test molecolari e immunoistochimici sono stati validati dall’ISS (Istituto Superiore di Sanità) ed introdotti come analisi di supporto alla routine diagnostica delle lesioni CIN. Altri sono ancora in fase sperimentale.

3.1.1 Test molecolari

Si basano principalmente sulla ricerca di sequenze virali HPV e tipizzazione dei genotipi utilizzando tecniche di biologia molecolare come l'ibridazione diretta, la Polymerase Chain Reaction, la Real Time PCR.

IBRIDIZZAZIONE DIRETTA O HYBRID CAPTURE TEST II (HCII)

È un test di ibridazione molecolare in fase liquida e cattura su micropiastra delle cellule di sfaldamento della cervice uterina. Le sonde di RNA utilizzate, previamente marcate con molecole chemiluminescenti, dividono in due gruppi i 18 HPV testati: a basso ed a medio-alto rischio oncogeno. La metodica è molto sensibile, rilevando fino ad 1 pg di DNA virale/ml. Non individua tuttavia il singolo tipo virale né la carica virale esatta che è calcolata in modo semiquantitativo tramite un gradiente di intensità di chemiluminescenza. Inoltre, la carica virale determinata con questa tecnica non varia con l'aumento della gravità delle lesioni. Infine, la carica virale cumulativa misurata in presenza di coinfezioni multiple sovrastima la carica virale tipo-specifica (WHO, 2009).

POLYMERASE CHAIN REACTION O TEST DI PCR QUALITATIVA

A differenza del test di ibridazione diretta, la PCR amplifica piccole quantità di campione. In Italia sono disponibili i seguenti test (WHO, 2009; Maestri):

Il *DuoPap test* (Bi-tech) abbina la metodica PCR alla citologia su strato sottile. Individua e genotipizza 13 HPV ad alto rischio.

Il *Linear Array test* (Roche) è una metodica qualitativa che identifica invece il singolo sottotipo virale su 37 genotipi di HPV ad alto e basso rischio. È risultato altamente sensibile su differenti materiali clinici e affidabile nella determinazione delle coinfezioni.

L'*Amplicor test* (Roche) è altamente sensibile ed affidabile: la "cross-contaminazione" con altri tipi di HPV è risultata pari a zero. L'*Amplicor test* si correla bene con il grado delle lesioni associate e la storia naturale della malattia vale a dire che un test negativo in presenza di CIN è associato a regressione o persistenza delle lesioni, mai a progressione. Non individua il singolo sottotipo virale ma identifica la presenza di 13 HPV ad alto rischio.

Il kit *PreTect HPV-Proofer test* indaga la persistenza dell'espressione oncogenica del virus e quindi permette di valutare il rischio di sviluppo del carcinoma. Viene eseguito rivelando la presenza dell'mRNA codificante per le proteine oncogeniche E6/E7 degli HPV 16, 18, 31, 33 e 45 (Benevolo *et al.*, 2011).

REAL TIME PCR O PCR QUANTITATIVA

Questa metodica permette di determinare la carica virale dell'infezione da HPV; diversi studi hanno mostrato che pazienti con alta carica virale possono avere un rischio aumentato di sviluppare il cancro della cervice (Maestri).

3.1.2 Test immunoistochimici

Si basano sulla ricerca di antigeni cellulari associati ai diversi gradi delle lesioni e alla loro progressione con tecniche di immunoistochimica.

KI-67 ED IL GRADO CIN

L'immunoquantificazione di Ki-67 è un importante adiuvante diagnostico del grading di CIN. Ki-67 è un marcatore della proliferazione cellulare e viene rilevato sul campione istologico CIN con anticorpi monoclonali specifici (Reuschenbach *et al.*, 2011). La positività del tessuto per Ki-67 viene valutata con la combinazione di due parametri: *l'indice di stratificazione* (IS) che indica l'intensità della positività nucleare a Ki-67 (più è alta, maggiore sarà l'IS ed il grado delle CIN) ed il *numero di nuclei positivi* (NNP) a Ki-67 in 100 µm di strato inferiore dell'epitelio (più aumenta il numero di nuclei positivi e maggiore sarà il grado di malignità). La specificità e la sensibilità della tecnica sono elevate ed i parametri immunoquantitativi di Ki-67 correlano con la presenza di HPV oncogeni nelle lesioni CIN.

VALORE PROGNOSTICO DI Ki-67

Il risultato di Ki-67 su una biopsia istologica CIN ha un valore predittivo di progressione a CIN3 maggiore di una diagnosi istologica di routine. Le caratteristiche prognostiche di Ki-67 sono valutate con l'IS e l'NNP che nei due terzi inferiori dell'epitelio, in condizioni basali, sono rispettivamente di 0,57 e 30%. Sono valori altamente riproducibili se le metodiche impiegate nei diversi laboratori per la processazione e la colorazione dei tessuti istologici sono identiche, condizione non sempre riscontrabile. Una positività a Ki-67 superiore ai due terzi dell'epitelio incrementa il valore IS e di conseguenza la probabilità della lesione alla progressione.

LA TELOMERASI COME MARCATORE DELLA PROGRESSIONE DELLE LESIONI DI ALTO GRADO

Alcuni studi hanno dimostrato che l'85% circa dei tumori invasivi della cervice hanno un aumento del numero di copie in 3q26 del loro genoma, dove mappa il gene per la telomerasi umana (hTERT), amplificazione assente nel tessuto normale adiacente. L'amplificazione di questa regione è conseguenza dell'integrazione del DNA di HPV nel genoma della cellula ospite e della produzione di proteine virali che, alterando i fisiologici meccanismi di controllo genico cellulare, portano ad un accumulo di diverse aberrazioni cromosomiche e allo sviluppo di instabilità genomica (Boselli and Petrella, 2010).

L'importanza della telomerasi nel cancro, scaturisce dall'evidenza sperimentale che i cromosomi delle cellule tumorali non vanno incontro al normale accorciamento progressivo dei telomeri perché presentano una iperespressione della telomerasi che continua a riparare i cromosomi facendo sopravvivere e replicare attivamente la cellula (Reza, 2010). Questa evidenza indica che nel processo sequenziale di trasformazione maligna delle cellule epiteliali cervicali, si è giunti ad un punto di non ritorno dovuto al vantaggio selettivo di queste cellule rispetto a quelle sane, a cui segue un'espansione clonale illimitata delle cellule maligne immortalizzate (Heselmeyer-Haddad et al., 2005).

Veldman et al. (2001) hanno dimostrato che l'E6 di HPV-16 transattiva il promotore di hTERT (subunità catalitica) inducendone la trascrizione; questo dato correla con un aumento dell'attività enzimatica delle telomerasi (Veldman *et al.*, 2001; WHO, 2007).

È stato riportato che l'amplificazione del gene hTERT aumenta significativamente con l'aumentare del grado di displasia e che l'amplificazione del 3q26 è necessaria per la transizione da CIN1/CIN2 a CIN3. L'amplificazione 3q26 è stata riscontrata nel 33% dei Pap-test normali di donne che svilupparono CIN3 o carcinoma invasivo a breve distanza di tempo suggerendo che questo parametro potrebbe essere predittivo della progressione delle displasie. In pratica sembrerebbe che solo le CIN1/CIN2 positive per l'amplificazione di 3q26 progrediranno a CIN3 mentre le negative regrediranno spontaneamente (Heselmeyer-Haddad et al., 2005).

L'amplificazione 3q26 è stata, inoltre, rilevata nel 22% delle lesioni di basso grado, nell'85% delle lesioni di alto grado e nel 100% dei carcinomi invasivi (Alameda *et al.*, 2009). In uno studio parallelo, l'elevata percentuale di cellule con hTERT amplificato correlava maggiormente con le lesioni CIN di alto grado rispetto a quelle di basso grado o con citologia normale (Fan *et al.*, 2010).

Di recente è stata applicata la metodica *FISH* (Ibridazione Fluorescente In Situ) per la marcatura dei cromosomi delle cellule epiteliali cervicali mediante l'utilizzo di sonde fluorescenti che ibridano sulla regione 3q26. Il FISH test è prescrivibile mediante il Sistema Sanitario Nazionale (SSN) su impegnativa del medico di base (Boselli and Petrella, 2010).

Il test viene recentemente proposto in affiancamento allo screening citologico in quanto la ricerca dell'amplificazione del gene hTERT potrebbe essere considerato un marker di trasformazione neoplastica per individuare lesioni destinate a progredire in neoplasia (Boselli and Petrella, 2010).

P16^{INK4A} O CDKN2A (CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2A) O MST-1 (MULTIPLE TUMOR SUPPRESSOR 1)

Studi recenti hanno dimostrato che l'E7 degli HPV determina l'iperespressione della proteina p16 nelle cellule cervicali displastiche (Gravitt, 2011). Il test diagnostico si avvale di metodiche di immunistochemica che rilevano la positività di p16 nel nucleo e/o nel citoplasma delle cellule. Questa sovraespressione e la conseguente disregolazione del ciclo cellulare, indicano di fatto l'inizio del meccanismo trasformante che porterà allo sviluppo di cloni di cellule epiteliali cervicali basali e parabasali contenenti copie del genoma virale integrate nei loro cromosomi (Reuschenbach *et al.*, 2011; Chaiwongkot *et al.*, 2011). Si è dimostrato che solo i campioni positivi per p16 contengono la forma integrata del virus. Tale evidenza ha suggerito il possibile impiego di p16 come biomarcatore della progressione tumorale (Chaiwongkot *et al.*, 2011).

Il significato diagnostico e prognostico che questa proteina può rivestire non è del tutto chiaro. Tuttavia la relativa facilità della metodica di rilevazione ed il basso costo, hanno stimolato numerosi studi volti a migliorare l'impiego di questo marcatore nella diagnosi citologica ed istologica (Reuschenbach *et al.*, 2011; Stanescu *et al.*, 2011; Bergeron *et al.*, 2008).

ALTRI BIOMARCATORI DELLE LESIONI PRECOCI CIN

Diversi studi hanno comparato il valore prognostico di varie proteine che regolano il ciclo cellulare e il differenziamento: pRb, p53, p63, cicline A, E e D, p21, p27, involucrina, CK13, CK14 analizzate come marcatori della progressione su lesioni CIN hanno dato risultati contraddittori nei diversi studi. Un'analisi multivariata indicava che la combinazione dell'IS di Ki-67 e la riduzione di espressione di pRb nello strato più profondo dell'epitelio squamoso era predittiva della progressione delle lesioni CIN.

Inoltre, la diminuzione di espressione di CK13 e CK14, associata a Ki-67 elevata e bassa espressione di pRb, identificava un sottogruppo di displasie con un aumentato rischio di progressione. Altri studi hanno identificato la perdita di involucrina e di CK13 nelle sole lesioni di alto grado o la perdita di CK14 più spesso associata alle lesioni di alto grado che a quelle di basso grado. La quantificazione combinata di Ki-67, pRb, CK13 e CK14 in ogni strato epiteliale delle lesioni precoci CIN offre un aiuto nella valutazione del loro potenziale individuale di progressione o regressione (Baak *et al.*, 2006).

Sulla base dei dati riportati è stato sviluppato un modello di sviluppo della lesione precoce. Centrale di questo modello è l'oncoproteina virale E7 di HPV che inattiva pRb; in seguito, aumenta la divisione cellulare negli strati più superficiali dell'epitelio cervicale, associabile ad un aumento dell'SI di Ki-67 (maggiore di 0,57).

Quando l'infezione degli HPV oncogeni è eliminata dall'ospite, la lesione CIN guarisce. Il primo segno molecolare di guarigione (e rilevabile prima della scomparsa delle cellule atipiche identificate con il Pap-test) è l'aumento di pRb negli strati più profondi dell'epitelio. Quindi, si riducono progressivamente la proliferazione e la migrazione di cellule proliferative verso gli strati più alti dell'epitelio, come confermato dalla bassa espressione di Ki-67. Anche p53 è disattivata dall'oncoproteina E6, ma il valore prognostico di pRb è molto più indicativo e predittivo per la progressione delle lesioni CIN. Tuttavia, p53 ha valore prognostico più predittivo nella progressione delle lesioni CIN3.

3.2-Microarray per la ricerca di nuovi marcatori della progressione neoplastica

La conoscenza approfondita delle basi molecolari coinvolte nello sviluppo del cancro cervicale potrebbe favorire la diagnosi e il trattamento di questo tipo di tumore e potrebbe portare allo sviluppo di nuovi trattamenti, più specifici ed efficaci, per la prevenzione della progressione della malattia e anche per l'utilizzo in terapia.

Negli ultimi anni sono stati condotti studi che utilizzavano la tecnica del microarray, con l'intenzione di identificare cambiamenti di espressione genica in cheratinociti associati ad infezioni con HPV ad alto rischio o coinvolti nel processo di carcinogenesi cervicale (Chang and Laimins, 2000; Nees *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2001; Alazawi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Alcuni studi di espressione genica relativi al cancro cervicale sono stati condotti su

biopsie tumorali congelate, oppure su cheratinociti umani transfettati *in vitro* con HPV o su modelli di cellule epiteliali cervicali.

3.2.1 Microarray su tessuti

Numerosi studi di microarray sono stati condotti su biopsie di tessuto. Occorre tenere presente che biopsie congelate di tessuto cervicale tumorale e normale possono contenere un numero significativo di cellule stromali contaminanti e anche cellule immunitarie derivate dall'ospite, come monociti, cellule dendritiche e linfociti che potrebbero alterare il risultato del profilo di espressione genica. Per ottenere dati affidabili, occorre analizzare popolazioni di cellule omogenee e in alcuni casi, per raggiungere un grado di omogeneità soddisfacente, si utilizza la microdissezione laser (LMD), nota anche come microscopia laser capture. Tale tecnica permette di isolare sezioni di tessuto oppure un piccolo numero di cellule da tessuti congelati o fissati in formalina o inclusi in paraffina, evitando contaminanti circostanti l'area di interesse che possono alterare i risultati sperimentali. In questo modo è quindi possibile limitare le cellule derivanti dalla parte tumorale, separandola dal tessuto normale, dalla componente stromale e da cellule del sistema immunitario.

In diversi studi di microarray sono stati confrontati il pattern di espressione genica di biopsie di carcinoma cervicale e con quello di biopsie di tessuti normali (Cheng et al., 2002; Chen et al., 2003; Wong et al., 2003; Rosty et al., 2005; Wong et al., 2006; Chao et al., 2006). In questi studi tuttavia non sono stati studiati tutti i meccanismi molecolari che portano allo sviluppo del tumore, passando attraverso i vari stadi di progressione neoplastica delle lesioni intraepiteliali cervicali CIN. Tali meccanismi sono stati invece indagati da altri ricercatori che nel loro studio, oltre a tessuto di carcinoma cervicale e tessuto normale, includono biopsie di lesioni preneoplastiche CIN (Gius et al., 2007; Arvantis and Spandidos, 2008; Song et al., 2008; Rajcumar et al., 2011). Il lavoro di Gius e colleghi è il primo lavoro a mettere in evidenza l'espressione genica nei vari gradi CIN e ad individuare marcatori della progressione neoplastica nella componente epiteliale e nella componente stromale circostante. In questo modello, il grado CIN1 è caratterizzato dall'espressione di geni proliferativi/immunosoppressivi, dovuti probabilmente alla risposta epiteliale all'infezione ad opera del papillomavirus. La transizione verso il CIN2 coincide con l'attivazione di pathway di pro-angiogenesi nei fibroblasti e la transizione verso il CIN3 e verso il carcinoma

squamoso è caratterizzata da espressione genica proinvasiva, in un ambiente in cui i nutrienti diventano limitati (Gius *et al.*, 2007).

3.2.2 Microarray su cheratinociti trasfettati con HPV

Linee cellulari di cheratinociti trasfettati in vitro con il genoma di HPV rappresentano un modello in grado di mimare le caratteristiche delle cellule cancerose, acquisendo la capacità di crescere autonomamente e mostrando perdita di differenziamento, overespressione del recettore per EGF, resistenza all'inibizione della crescita ad opera di TGF-beta (Pirisi *et al.*, 1987; Pirisi *et al.*, 1988; Zyzak *et al.*, 1994; Creek *et al.*, 1995; Mi *et al.*, 2000; Borger *et al.*, 2000; Akerman *et al.*, 2001). (Chang and Laimins, 2000; Nees *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2001). Questo modello non rispecchia la situazione *in vivo* e per quanto riguarda lo studio del carcinoma cervicale non rappresenta un buon modello, poiché non studia direttamente cellule di cervice, ma cheratinociti epiteliali derivanti da altri distretti corporei successivamente trasfettati. Di conseguenza i pathway coinvolti in questo modello saranno diversi dai pathway coinvolti nello sviluppo della progressione neoplastica cervicale.

Nonostante ciò diversi ricercatori hanno continuato ad usare questo modello per cercare di individuare i processi molecolari coinvolti nella trasformazione indotta da HPV e lo sviluppo del tumore (Ruutu *et al.*, 2002; Duffy *et al.*, 2003 Kravchenko-Balasha *et al.*, 2009).

3.2.3 Microarray su cellule epiteliali cervicali

In letteratura non sono presenti molti lavori che utilizzano cellule cervicali per lo studio dell'espressione genica.

Un lavoro di Nees e colleghi si basa su colture primarie di cheratinociti ectocervicali ottenute da tessuto cervicale proveniente da isterectomie e coltivate in terreno privo di siero. Le cellule da lui utilizzate sono state infettate con retrovirus che esprimevano i geni E6 ed E7 di HPV-16 (Nees *et al.*, 2001).

In altri lavori vengono adottate linee cellulari commerciali, come la linea W12, che deriva da una naturale infezione cervicale di basso grado HSIL (Stanley *et al.*, 1989) e rappresenta un buon modello di studio per l'investigazione della storia naturale della neoplasia cervicale. Con questo modello, nel lavoro di Alazawi e colleghi è stato studiato l'effetto

dell'integrazione episomale nell'ospite sull'espressione genica di cheratinociti cervicali positivi per HPV-16, come un componente di progressione verso la malignità (Alazawi *et al.*, 2002). Sono stati individuati gruppi di geni che mostravano cambiamenti di espressione dovuti all'integrazione di HPV.

Anche nel lavoro di Pett e colleghi è stata usata la linea W12 come modello di carcinogenesi cervicale squamosa, dimostrando che la perdita di HPV in forma episomale è associata all'attivazione endogena di geni di risposta antivirale che sono inducibili attraverso il pathway dell'IFN di tipo I, durante l'integrazione di HPV-16 (Pett *et al.*, 2006). Questo modello presenta comunque dei limiti, in quanto si basa soltanto sullo studio di un tipo di lesione cervicale intraepiteliale a basso grado.

Un lavoro di Santin e colleghi, a partire da tumori primari, risulta essere l'unico basato sullo studio di microarray su cellule in coltura, derivate comunque da carcinomi cervicali, ma non da lesioni preneoplastiche CIN (Santin *et al.*, 2005). In questo lavoro lo studio del profilo di espressione genica è stato condotto su 15 linee cellulari cervicali primarie (11 colture primarie di cancro cervicale positive per HPV-16 o HPV-18 derivate da uno stadio precoce di malattia e 4 linee cellulari di cheratinociti cervicali normali).

3.3-Le colture cellulari di cheratinociti CIN come modello di studio della progressione delle lesioni cervicali

3.3.1 Le tecniche di coltura di cellule epiteliali

Le tecniche di coltura delle cellule epiteliali devono consentire:

(i) la messa in coltura di cheratinociti puri, privi di contaminazione da altre cellule; (ii) la propagazione seriale; (iii) il clonaggio da singola cellula; (iv) la possibilità di modulare il differenziamento cellulare in vitro.

L'isolamento dei cheratinociti dai tessuti epiteliali si ottiene come segue:

1) con trattamento enzimatico del tessuto. Prevede una digestione enzimatica del tessuto con l'enzima dispasi per scollare il foglietto dermico da quello epiteliale e successiva digestione dell'epitelio con tripsina/EDTA che separa i cheratinociti. È una tecnica efficace su tessuti di grandi dimensioni, minimo 1cm x 1cm, e consente di recuperare un elevato numero di cheratinociti puri;

2) migrazione delle cellule epiteliali da frammenti tissutali. I tessuti epiteliali vengono tagliati finemente con bisturi e i frammenti ottenuti depositati su una piastra di coltura e ricoperti di terreno. I cheratinociti migrano rapidamente dall'espianto e dopo qualche giorno possono essere recuperati e seminati in piastre di coltura. È una tecnica utilizzata su pezzi tissutali piccoli. I cheratinociti, tuttavia, migrano dall'espianto con una bassa efficienza e spesso sono contaminati da fibroblasti.

I protocolli di coltura dei cheratinociti attualmente impiegati sono due:

- 1) Il protocollo di Rheinwald e Green
- 2) Il protocollo dei terreni selettivi

3.3.1.1 Protocollo di Rheinwald e Green

Fino al 1975, quando Rheinwald e Green pubblicarono per la prima volta la coltivazione seriale di cheratinociti epiteliali in vitro, le tecniche di coltura di cellule epiteliali non consentivano la propagazione seriale, il clonaggio e la modulazione del differenziamento dei cheratinociti in vitro. Infatti, i cheratinociti primari aderiscono poco alla superficie delle piastre di coltura, vanno rapidamente incontro a senescenza e, molto spesso, la loro proliferazione in vitro viene superata da quella dei fibroblasti contaminanti. Centrali nella tecnica di Rheinwald e Green sono stati l'uso di feeder layers di fibroblasti di topo inattivati con mitomicina C o raggi gamma cocoltivati con i cheratinociti e l'aggiunta di additivi nel terreno di coltura, come il fattore di crescita epidermal growth factor (EGF) e la tossina colerica, che rallentano il processo di differenziamento dei cheratinociti e ne incrementano l'efficienza di formare colonie. Utilizzando questo approccio è stato possibile coltivare in modo seriale e clonale cheratinociti derivati da epiteli di diversi distretti anatomici umani ed animali (Freshney RI & Freshney MG, 2002).

3.3.1.2 Protocollo dei terreni selettivi

Un'alternativa alla metodica di Rheinwald e Green è l'utilizzo di terreni di coltura specifici per cheratinociti, formulati per favorire la crescita selettiva delle cellule epiteliali e inibire al contempo la proliferazione di eventuali fibroblasti contaminanti. Questi terreni sono utilizzati

senza siero e contengono basse concentrazioni di calcio, EGF, tossina colerica e idrocortisone.

Per entrambe le tecniche di coltura il numero di cheratinociti seminati influenza in modo decisivo il successo delle colture. In particolare, nella tecnica di Rheinwald e Green il numero di cheratinociti seminati deve rispettare il rapporto di densità di 1:2 con i fibroblasti murini cocoltivati (rispettivamente $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ e $2 \times 10^4/\text{cm}^2$), mentre nella tecnica dei terreni selettivi i cheratinociti devono essere seminati alla densità di $2 \times 10^5/\text{cm}^2$. Queste densità obbligano a disporre di tessuti di partenza molto grandi che tuttavia non sempre sono di facile reperibilità.

Una caratteristica dei cheratinociti coltivati è di crescere formando colonie. I tipi di colonie che si sviluppano in vitro dipendono dalle caratteristiche proliferative e differenziative dei cheratinociti che li compongono: colonie di cheratinociti piccoli, altamente proliferativi e indifferenziati, di cheratinociti medi, proliferativi e poco differenziati, e di cheratinociti grandi, poco proliferativi e differenziati. Le caratteristiche dei cheratinociti che compongono le colonie in vitro, riflettono, quindi, l'andamento proliferativo e differenziativo delle cellule dell'epitelio pluristratificato originario: basali, intermedie e superficiali.

3.3.2. Colture di cheratinociti cervicali

3.3.2.1 Colture di cheratinociti cervicali normali

L'esocervice è composta da epitelio squamoso pluristratificato. Dal punto di vista istologico l'epitelio esocervicale è composto da 5 strati di cheratinociti:

- 1) uno basale di cellule piccole e cilindriche e con nuclei larghi;
- 2) uno parabasale di cellule poliedriche con nuclei prominenti e ponti intercellulari distinti;
- 3) uno strato intermedio di cellule leggermente appiattite con citoplasma ricco di glicogeno e frequentemente vacuolizzato;
- 4) uno strato di spessore variabile di cellule poliedriche, strettamente associate tra loro, con granuli cheratoialini;
- 5) uno strato superficiale di cellule larghe, appiattite con nuclei piccoli e picnotici.

I cheratinociti proliferativi appartengono allo strato basale, parabasale e intermedio dell'epitelio esocervicale e, opportunamente isolati, possono essere coltivati in vitro.

Attualmente, i cheratinociti cervicali normali sono coltivati sia con la tecnica di Rheinwald e Green che con quella dei terreni selettivi. Tuttavia, la necessità di isolare un elevato numero di cheratinociti per ottenere colture di epiteliali cervicali con successo obbliga all'utilizzo di pezzi di cervice di partenza cospicui, ottenibili solo da isterectomie. La mancanza di una fonte di cheratinociti facilmente recuperabile condiziona pesantemente la possibilità di studiare le caratteristiche proliferative e differenziative dei cheratinociti cervicali *in vitro*.

3.3.2 2 Colture di cheratinociti cervicali CIN

L'incapacità di ottenere colture seriali di cheratinociti cervicali normali ha condizionato per molti anni anche la possibilità di coltivare cheratinociti cervicali neoplastici da displasie a diverso grado di malignità, CIN1-3. Sebbene esistano linee cellulari stabili derivate da carcinomi della cervice uterina come le CaSki e le SiHa e le HeLa, che è probabilmente la linea più utilizzata al mondo nell'ambito della biologia cellulare, non esistono linee cellulari continue di CIN ad eccezione delle linee W12 e 612, entrambe derivate da una lesione CIN1. Le difficoltà a derivare linee stabili di cheratinociti da tessuti cervicali normali sono le stesse che si incontrano per ottenere linee permanenti di cheratinociti CIN con l'ulteriore complicazione di dover selezionare linee pure di epiteliali da biopsie neoplastiche estremamente eterogenee. Un'ulteriore difficoltà riguarda l'elevata suscettibilità delle cellule cervicali epiteliali, e soprattutto le CIN, a contaminazioni endogene ed esogene di batteri e funghi, che compromettono rapidamente il successo della cultura. Ad oggi, il protocollo di Stanley è l'unico metodo pubblicato che descrive le tecniche per l'isolamento di colture di cheratinociti CIN da biopsie cervicali in dettaglio (Stanley, 2002). Brevemente, il tessuto cervicale è micro-sezionato e i frammenti derivati vengono successivamente posti nelle fiasche di coltura. Le cellule epiteliali emigrate dai frammenti sono successivamente recuperate e coltivate su feeder layers murini inattivati con terreno DMEM con aggiunta di idrocortisone, tossina colerica, EGF e 10% di siero fetale bovino (Freshney RI & Freshney MG, 2002).

3.3.2.3 Colture di cheratinociti cervicali CIN per lo studio della progressione neoplastica

I cheratinociti provenienti da lesioni CIN coltivati rappresentano un modello di studio unico per investigare il meccanismo di progressione delle neoplasie cervicali. Come noto, il cancro cervicale origina da un processo multifasico di trasformazione dei cheratinociti CIN con meccanismi molecolari progressivi ancora non noti. I virus HPV oncogeni sono necessari per indurre modificazioni preneoplastiche importanti nei cheratinociti infettati, come l'incremento della proliferazione e l'inibizione del differenziamento, ma non sono sufficienti per dirigere la piena trasformazione cellulare. Pertanto, altri fattori cellulari endogeni o extracellulari potrebbero contribuire al processo multifasico della trasformazione neoplastica verso il cancro cervicale.

Nonostante il protocollo dettagliato della Stanley (Stanley, 2002) sulle tecniche di coltura dei cheratinociti CIN, gli studi su queste cellule sono ancora molto limitati, come si evince dai pochi lavori scientifici pubblicati finora nel settore. Il protocollo Stanley, infatti, funziona bene se applicato a pezzi patologici grandi che consentano di recuperare il numero di cheratinociti CIN adatto alla densità di semina con feeder layers murini inattivati. Questo aspetto è un limite considerevole, dato che i campioni CIN sono spesso di dimensioni esigue. Due sono le principali ragioni delle esigue dimensioni delle lesioni CIN. Primo, lo screening cervicale annuale consente di identificare le lesioni displastiche nella loro fase precoce e quindi di dimensioni ancora poco estese. Secondo, i pezzi biotici CIN devono essere indirizzati al laboratorio di anatomia patologica per la diagnostica e solo una minima parte, quando possibile, può essere utilizzata per fini di ricerca.

Un buon modello di studio della progressione della trasformazione cellulare dovrebbe saper rappresentare *in vitro* l'intera eterogeneità cellulare del tessuto neoplastico da cui deriva. Infatti, ogni grado CIN è costituito da cloni di cheratinociti che putativamente differiscono tra loro per singoli cambiamenti genetici, in linea con il concetto di progressione multifasica della trasformazione neoplastica. L'isolamento dei diversi cloni cellulari CIN delle displasie a diverso grado di malignità e la loro caratterizzazione molecolare e cellulare potrebbero aiutare a definire i marcatori della progressione.

Capitolo 4

SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo della ricerca è di investigare i meccanismi della trasformazione e della progressione tumorale indotte da HPV utilizzando l'analisi del profilo di espressione genica in cloni di cheratinociti derivati da lesioni CIN a diverso grado di malignità.

La ricerca è stata articolata in diverse fasi:

1) allestimento di colture primarie di cheratinociti clonali partendo da piccoli frammenti di lesioni CIN1, CIN2 e CIN3/CIS. Allo scopo abbiamo considerato che: (i) per ottenere il massimo numero di cheratinociti era necessario isolare enzimaticamente le cellule dell'intero tessuto e co-seminare i fibroblasti ed i cheratinociti derivati nella stessa fiasca di coltura; (ii) la semina di fibroblasti e cheratinociti in ampie superfici di coltura avrebbe consentito ai cheratinociti di raggiungere una bassa densità, necessaria per proliferare in modo clonale, ed ai fibroblasti di espandersi senza interferire con la crescita dei cheratinociti. La copresenza dei fibroblasti nelle colture avrebbe inoltre favorito la proliferazione e l'efficienza dei cheratinociti a formare cloni, come precedentemente dimostrato per le colture di epiteliali co-coltivate con fibroblasti umani o murini inattivati (Okigaki *et al.*, 1980; Barrandon *et al.*, 1987; Coleman *et al.*, 1993; Hubert *et al.*, 1999; Stanley, 2002); (iii) l'uso di un terreno di coltura contenente alte concentrazioni di calcio e siero avrebbe favorito la selezione di cheratinociti cervicali preneoplastici HPV positivi. Infatti, studi pregressi avevano dimostrato che solo i cheratinociti cervicali o cutanei immortalizzati/trasformati con gli HPV oncogeni resistono al differenziamento indotto dal calcio e dal siero e crescono formando cloni (Sherman *et al.*, 1996; Pei *et al.*, 1998; Alfandari *et al.*, 1999; Sherman *et al.*, 2002).

2) Espansione dei cloni CIN e normali (NUC: Normal Uterine Cervix) mantenendo i cheratinociti indifferenziati e proliferativi.

3) Studio del profilo di espressione genica dei cheratinociti clonali derivati da CIN1-3/CIS e dei normali con la tecnica del microarray.

Tessuti CIN e corrispondenti tessuti normali (NUC) utilizzati come controlli, sono stati digeriti con collagenasi e le cellule derivate, fibroblasti e cheratinociti, sono state co-coltivate in DMEM-F12 al 10% di siero fetale bovino (SFB).

Le colture primarie delle CIN e dei NUC sono state sub-colturate per diversi passaggi mantenendo la capacità di formare cloni.

Cloni primari di cheratinociti CIN e NUC sono stati espansi in un terreno di coltura messo a punto nel nostro laboratorio per consentire ai cheratinociti di proliferare attivamente senza differenziare e di mantenere inalterate le caratteristiche morfologiche. I cloni primari CIN e NUC sono stati successivamente caratterizzati con la tecnica dell'immunofluorescenza, indagando l'espressione di marcatori epiteliali cervicali.

Cloni primari di cheratinociti CIN e NUC espansi sono stati sottoposti ad estrazione di RNA per l'analisi dell'espressione genica con la tecnica del microarray. Sono stati selezionati 9 geni sovraespressi e 6 geni sottoespressi come possibili geni coinvolti nella trasformazione e nella progressione neoplastica delle lesioni CIN.

Due geni up-regolati e due geni down-regolati sono stati anche indagati con la tecnica della PCR real-time per poter riconfermare il dato del microarray. L'analisi dei geni up- e down-regolati emersi in questo studio dovrà essere estesa ad altri campioni CIN, a diverso grado di malignità, per validare ulteriormente i risultati del profilo di espressione genica.

Capitolo 5

MATERIALI E METODI

5.1-Tessuti cervicali impiegati

Nove piccoli frammenti bioptici (2-3 mm³) di tessuto esocervicale CIN, 3 per ogni grado displastico CIN1-CIN3, e 9 corrispondenti tessuti normali (NUC) sono stati forniti dalla Clinica Ostetrica e Ginecologica, Direttore Prof. Alfredo Patella, dell'Azienda Ospedaliero/Universitaria Sant'Anna di Ferrara, nella persona della Dott.ssa Paola Garutti.

Le pazienti sono state sottoposte, previo consenso informato, a prelievo bioptico mediante asportazione con ansa diatermica attraverso esame colposcopico e utilizzo delle colorazioni con acido acetico al 5% e iodio Lugol. L'acido acetico colora il tessuto patologico, visibile con colore bianco, mentre lo iodio Lugol colora di marrone solamente il tessuto normale. Il ginecologo ha provveduto all'individuazione e alla suddivisione tra tessuto normale NUC e tessuto patologico CIN.

I campioni patologici CIN sono stati classificati dall'anatomo-patologo seguendo i criteri internazionali.

5.2-Allestimento di colture primarie di cellule epiteliali normali e CIN

I frammenti bioptici sono stati trasferiti in un tubo da 50 ml contenente terreno di trasporto DMEM-F12, antibiotici e antimicotici (400 U/ml di penicillina e streptomina (Lonza, Milano), 50 µg/ml di Nistatina (Gibco, USA), 80µg/ml di Gentalin (Essex, Italia) e 0,5 µg/ml di Fungizone (Sigma-Aldrich, USA) e mantenuti a temperatura ambiente fino all'arrivo in laboratorio. Il terreno di trasporto è stato eliminato e il tessuti sono stati lavati 3 volte con PBS 1x (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄ ·H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄), pH 7.4 contenente antibiotici e antimicotici (200 U/ml di penicillina e streptomina (Lonza, Milano), 50 µg/ml di Nistatina (Gibco, USA), 40µg/ml di Gentalin (Essex, Italia) e 0,25 µg/ml di Fungizone (Sigma-Aldrich, USA). In seguito, i tessuti sono stati trasferiti su piastre petri da 10 cm e frammentati ulteriormente con bisturi. I frammenti sono stati trasferiti in fiasche di coltura T25 con 5 ml di terreno DMEM-F12 e 500 µl di collagenasi di tipo II concentrata

2000 U/ml (Worthington, USA) e messi a digerire per una notte a 37°C e 5% di CO₂. Dopo 24 ore, la sospensione cellulare è stata raccolta, lavata 3 volte con PBS 1X e pellettizzata tramite centrifugazione. Le cellule sono state risospese in terreno DMEM-F12 al 10% di FBS e seminate in fiasche di coltura T25. Le cellule sono state incubate per 3 giorni a 37°C al 5% di CO₂. Dal momento che le cellule epiteliali hanno una capacità di ancoraggio minore rispetto ai fibroblasti, dopo tre giorni le cellule rimaste in sospensione sono state recuperate e seminate in una nuova fiasca T25 per farle aderire. Alla fine, quindi, per ogni tessuto NUC e CIN sono state allestite due T25.

5.3-Estrazione del DNA dai tessuti CIN e NUC

Una piccola aliquota di tessuto CIN e NUC è stata utilizzata per l'estrazione del DNA. I tessuti sono stati trasferiti in falcon da 15 ml e digeriti in 1 ml di buffer di lisi contenente 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM EDTA, pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,5% SDS e 100 µg/ml di enzima Proteinasi K (PK) (Sigma Aldrich), a 55°C per 2 ore. In seguito, il DNA è stato purificato con 3 estrazioni consecutive di una miscela di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (rapporto 25:24:1), seguite ciascuna da centrifugazione a 12000 r.p.m. a 4°C per 5 minuti. Successivamente il surnatante, contenente il DNA, è stato trasferito in un nuovo tubo falcon e decontaminato da eventuali residui di fenolo e di cloroformio con due estrazioni consecutive prima di cloroformio e poi di etere un ugual volume di cloroformio. Il DNA purificato è stato precipitato con 1/10 di volume di acetato di sodio 3 M e due volumi di etanolo assoluto, a -20°C O.N. Il DNA è stato precipitato attraverso centrifugazione a 12000 r.p.m., per 30 minuti, a 4° C. Il pellet è stato lavato con etanolo 70%, centrifugato a 12000 r.p.m. per 5 minuti e lasciato asciugare sotto cappa. Il pellet di DNA è stato risospeso in 20-30 µl di H₂O sterile.

5.4-Ricerca di sequenze dei virus HPV in campioni CIN e NUC mediante PCR

La bontà del DNA estratto dai campioni NUC e CIN è stata testata previamente in PCR con i primer che amplificano l'“housekeeping” β-globina. I primer utilizzati amplificano una regione di 176 bp e sono: β-globina R, 5'-GTAACCTTGATACCAACCTG-3', e β-globina F,

5'-CAGAGCCTACTATTGCTTAC-3'. La reazione di PCR è stata condotta in un volume di 50 µl contenenti 200 ng di DNA, Buffer + MgCl₂ 10X, dNTPs 10 mM, Primer R 0,2 mM, Primer F 0,2 mM, Taq DNA Polimerasi (ROCHE) 5U/µl e H₂O. I parametri di amplificazione sono: 5 minuti di denaturazione iniziale a 94°C e 30 secondi di denaturazione a 94°C, 30 secondi di annealing a 56°C e 30 secondi di estensione a 72°C per 35 cicli di reazione e un'estensione finale a 72°C per 10 min. I prodotti di PCR sono stati caricati su gel di agarosio al 2% (peso/volume) in presenza di etidio bromuro, fatti correre in elettroforesi e visualizzati agli UV con il transilluminatore.

Successivamente i campioni di DNA risultati positivi alla reazione di PCR con la β-globina sono stati sottoposti ad amplificazione per le sequenze dei virus HPV. In questo caso sono stati utilizzati primer universali, denominati GP5 (5'-TTTGTTACTTGTGGTAGATAC-3') e GP6 (5'-GAAAATAAACTGTAAATCA-3') (Martini *et al.*, 2004), che consentono di amplificare una regione che varia da 139 pb a 145 bp comune a 6 diversi genotipi HPV, 6, 11, 16, 18, 31 e 33 nella sequenza tardiva L1. La reazione di PCR è stata condotta in un volume di 50 µl contenenti 500 ng di DNA, Buffer + MgCl₂ 10X, dNTPs 10 mM, Primer GP5 0,2 mM, Primer GP6 0,2 mM, Taq DNA Polimerasi (ROCHE) 5U/µl e H₂O. I parametri di amplificazione sono: 5 minuti di denaturazione iniziale a 94°C, successivamente 1 minuto di denaturazione a 94°C, 2 minuti di annealing a 40°C e 1 minuto e 30 secondi di estensione a 72°C per 45 cicli di reazione e un'estensione finale a 72°C per 10 min. I prodotti di PCR sono stati fatti correre in elettroforesi su gel di agarosio al 2% (peso/volume) contenente etidio bromuro e visualizzati agli UV con il transilluminatore.

5.5-Genotipizzazione degli HPV

La genotipizzazione dei prodotti di PCR ottenuti con i primer GP5 e GP6 è stata condotta mediante digestione con l'enzima RsaI. La digestione degli amplificati è avvenuta in un volume di 50 µl contenente: 40 µl di reazione di PCR, 10 U di enzima RsaI, Buffer 1X Tango e H₂O. La digestione è stata effettuata a 37°C per 4 ore e 30 minuti. L'attività enzimatica residua è stata inibita a 65°C per 15 minuti.

I prodotti di digestione dei campioni CIN sono stati caricati su gel di poliacrilamide al 20% composto da una soluzione di acrilamide/ N,N'-metilenbisacrilamide (rapporto 19:1), TBE 1x (Tris base 4 mM, Acido Borico 4 mM, EDTA Na₂ 0,1 mM), Ammonio persolfato (APS)

all'1%, N, N, N', N' – tetrametiletilendiamina (TEMED) allo 0,3% in 100ml di gel (conc. finale 10 mg/ml).

I prodotti di PCR digeriti sono stati caricati su gel di acrilammide e corsi in elettroforesi a circa 150 Volts (8 Volts/cm), per circa 3 ore. Al termine della corsa il gel di acrilammide è stato colorato per 30 minuti, in agitazione, in una soluzione di TBE 1X contenente bromuro d'etidio alla concentrazione di 0,5 µg/ml. I DNA colorati sono stati visualizzati agli UV con il transilluminatore. Il pattern di digestione dei campioni migrati su gel è stato confrontato con le digestioni degli HPV di controllo.

5.6-Colorazione dei cloni con rodamina-B

La rodamina-B è un composto che colora selettivamente i cloni di cheratinociti, ma non i fibroblasti. Le cellule in fiasca T25 sono state lavate due volte per 5 minuti con PBS 1X e fissate con metanolo 100 % a -20°C per 1 ora. Dopodiché sono state reidratate con acqua distillata per 5 minuti e colorate con rodamina-B (Sigma-Aldrich) al 2% (peso/ volume), sciolta in acqua distillata per 1 ora. Dopo la colorazione, i cloni sono stati lavati più volte con PBS 1X per eliminare l'eccesso di colorante e lasciati ad asciugare a temperatura ambiente. I cloni colorati si possono osservare ad occhio nudo.

5.7-Subcolture delle colture primarie di CIN e NUC

Le colture primarie CIN e NUC sono state staccate dal fondo della fiasca con 0.05% di Tripsina, proveniente da pancreas bovino (ditta Sigma Aldrich) e 0,01% di EDTA diluiti in PBS 1X. $1-2 \times 10^5$ cellule sono state seminate in nuove fiasche T25 (T1) con DMEM-F12 e il 10% SFB. Dopo 3 giorni, le cellule in sospensione sono state recuperate e seminate in nuove fiasche T 25 (T2). Le subcolture sono state coltivate per 4 settimane fino al raggiungimento della confluenza.

5.8-Espansione dei cloni primari di CIN e NUC

Per verificare se i cheratinociti dei cloni primari potessero essere espansi mantenendosi proliferativi ed indifferenziati, un clone primario di CIN3 e uno corrispondente di NUC cresciuti in T25 sono state isolati con appositi cilindri di vetro sterili e tripsinizzati con 200 µl di 0,05% tripsina- 0,01% EDTA. Dopo 10 minuti a 37°C con la soluzione, l'intero volume contenente le cellule è stato prelevato e posto in piastre di coltura petri del diametro di 3 cm e mantenute in DMEM-F12, 10% SFB e 200U/ml di penicillina/streptomicina per 24 ore per consentire la sedimentazione. Il terreno è stato in seguito sostituito con una miscela di terreno DMEM-F12 (addizionato con Tossina Colerica 8,4 ng/ml) e defined Keratinocyte-Serum Free Medium (dKSFM): DMEM-F12/dKSFM, in un rapporto di 1:1, 5% SFB, 8,4 ng/ml tossina colerica (TC) (SIGMA), 1,4 nM idrocortisone (HYC) (Sigma Aldrich) e 200U/ml penicillina/streptomicina. Alla confluenza i cheratinociti sono stati tripsinizzati ed espansi in fiasche T25 con DMEM-F12/dKSFM. Il tempo di raddoppiamento della popolazione cellulare (DPT) è stato condotto in parallelo con il trasferimento dei cheratinociti in T25 ed è stato valutato con triplici esperimenti in pozzetti di coltura da 2 cm di diametro.

5.9-Caratterizzazione dei cloni di CIN e NUC con la tecnica dell'immunofluorescenza

Sia le cellule dei cloni NUC, sia quelle dei cloni CIN sono state sottoposte a saggi di immunofluorescenza per poterle caratterizzare e monitorate le espressioni dei marcatori epiteliali quali le citocheratine e marcatori cervicali come p63. I cloni primari di CIN e NUC sono stati fissati direttamente sulle fiasche di coltura o tripsinizzati e seminati su vetrini tondi coprioggetto per poter indagare la presenza di più marcatori all'interno della stessa colonia.

La metodica dell'immunofluorescenza prevede che le cellule vengano lavate 2 volte in PBS 1X e poi fissate in metanolo conservato a -20°C per 5 min a temperatura ambiente. Una volta tolto il metanolo le cellule vengono lasciate asciugare sotto cappa.

A questo punto si possono incubare per 1 ora a 37°C con l'anticorpo primario diluito in PBS 1X. Dopo 3 lavaggi con PBS 1X di 5 minuti ciascuno le cellule vengono incubate per 1 ora a 37°C, al buio, con l'anticorpo secondario coniugato con la fluoresceina e successivamente lavate 3 volte con PBS1X.

Gli anticorpi primari utilizzati sono:

- Anti-p63 (4A4) (monoclonale di topo) (Santa Cruz), diluizione 1:50, lega con elevata affinità i residui aminoacidici compresi tra le posizioni 1 e 205 nella regione N-terminale della proteina p63 umana.
- Anti-Citocheratina 14 (LL002) (monoclonale di topo) (Santa Cruz), diluizione 1:50, lega specificatamente i residui aminoacidici situati nella regione carbossi-terminale della Citocheratina umana 14.
- Anti-Citocheratina 17 (CLONE E3) (monoclonale di topo) (Dako), diluizione 1:20, lega specificatamente la Citocheratina umana 17.
- Anti-Citocheratina 19 (A53-B/A2) (monoclonale di topo) (Santa Cruz), diluizione 1:50, lega specificatamente i residui aminoacidici compresi tra le posizioni 312 e 335 della Citocheratina umana 19.

Gli anticorpi secondari utilizzati sono:

- Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin/FITC, (DAKO) anticorpo monoclonale che reagisce con tutte le sottoclassi di IgG, IgA e IgM murine.
- Donkey Anti-Goat IgG, (ditta Santa Cruz) anticorpo monoclonale che reagisce con tutte le sottoclassi di IgG, IgA e IgM murine.

Come controlli positivi sono state utilizzate due linee di cheratinociti commerciali, le NCTC e le HeLa, positive al virus HPV18. La sostituzione degli anticorpi primari con PBS 1X è stata utilizzata come controllo negativo. Gli stessi marcatori sono stati indagati con l'immunofluorescenza anche sui cloni espansi di cheratinociti CIN3 e NUC.

Dopo l'ultima incubazione con l'anticorpo secondario e 3 lavaggi di 5 minuti con PBS 1X i cloni di cheratinociti su fiasca sono stati coperti da un vetrino coprioggetto previa aggiunta di 3 μ l di montante contenente glicerolo:PBS 1X (7:3) e 4',6-Diamidino-2-Fenilindolo (DAPI) 0.5 μ g/ml, un colorante fluorescente per la cromatina che emette nel blu. I vetrini tondi invece, con i cheratinociti seminati, sono stati capovolti su una goccia di gel montante precedentemente depositata su un vetrino portagetto. Le immagini digitali del microscopio a fluorescenza Nikon TE2000E sono state catturate utilizzando il software 1-ACT per la fotocamera digitale DXM1200F (Nikon, Firenze, Italia). La percentuale di cellule che esprimono i marcatori di cheratina nelle colonie è stata quantificata contando 1.000 cellule in quattro campi selezionati in modo casuale.

5.10-Analisi statistica dei risultati

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il programma GraphPad Prism versione 5.0 per Windows (GraphPad La Jolla, CA, USA). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard (sd). La distribuzione normale dei dati è stata verificata con il test di normalità di Kolmogorov-Smirnov. L'analisi ANOVA seguita dal post-hoc test Turkey per la comparazione multipla è stato utilizzata per confrontare la significatività tra i gruppi CIN, con un α di 0,05. Il t test è stato applicato per rilevare differenze statisticamente significative tra i campioni CIN e NUC dello stesso paziente. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi con $p < 0,05$.

5.11-Estrazione dell'RNA totale e studio del profilo di espressione genica mediante microarray

5.11.1 Estrazione dell'RNA

L'RNA è una molecola instabile che viene facilmente degradata dalle RNasi presenti sulle superfici e dal calore. Per limitare il rischio di degradazione dovuto ad RNasi o di denaturazione al calore, il protocollo prevede che la vetreria necessaria e la vaschetta da elettroforesi vengono trattate con dietil-pirocarbonato (DEPC) allo 0.1 % per una notte a temperatura ambiente.

Il pellet di cellule è stato risospeso in 1 ml di buffer di lisi TRIzol (Invitrogen, USA) e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleo-proteici. Al lisato cellulare sono stati aggiunti 200 μ l di cloroformio, incubato il tutto per altri 3 minuti a temperatura ambiente e infine centrifugato a 12000 r.p.m. per 15 minuti a 4°C.

La fase acquosa, contenente l'RNA, è stata trasferita in un nuovo tubo da 2 ml, precipitata con isopropanolo a temperatura ambiente per 10 minuti e poi centrifugato per 10 minuti a 12.000 r.p.m. a 4°C. Il pellet di RNA è stato lavato con etanolo al 75%, centrifugato a 7500 r.p.m. per 5 minuti a 4°C ed infine risospeso in 30-50 μ l di acqua-DEPC (dietilpirocarbonato) allo 0.1%. Per verificare la qualità dell'RNA estratto 1 μ l è stato caricato su gel di agarosio all'1% in presenza di bromuro di etidio e visualizzato agli UV per la presenza delle bande

corrispondenti alle tre isoforme 28S, 18S e 5S dell'RNA ribosomiale. La quantificazione dell'RNA è stata stabilita con spettrofotometro Nanodrop.

5.11.2 Quantificazione dell'RNA totale

La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto sono state valutate misurando la densità ottica (OD) a 260 e 280 nm mediante spettrofotometro Nanodrop (Nanodrop Technologies Inc, Wilmington, USA).

Nanodrop è uno spettrofotometro UV-VIS che permette di rilevare l'intero spettro tra 220 e 750 nm. Il sistema consente di leggere il campione senza l'uso di cuvette, sfruttando la tensione superficiale dei liquidi che mantiene il campione sotto forma di goccia in sede di lettura. La lettura viene effettuata come segue: si deposita il campione al termine di una fibra ottica (fibra ricevente), una seconda fibra ottica (fibra sorgente) viene messa in contatto con il campione in modo che il liquido riempi lo spazio tra le due fibre ottiche. La distanza tra le due fibre ottiche è di 1 mm e costituisce il cammino ottico. La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo Xenon ed una camera CCD rileva la luce dopo il passaggio attraverso il campione.

La concentrazione dell'RNA viene calcolata utilizzando la legge di Lambert-Beer:

$$A = C \times l \times a$$

dove (A) è l'assorbanza della luce, (a) il coefficiente di estinzione molare che dipende dal mezzo, (l) il cammino ottico percorso dalla luce nel mezzo e (C) la concentrazione della sostanza analizzata. Per l'RNA 1 OD corrisponde ad una concentrazione di 40 mg/mL di acido nucleico.

Il Nanodrop presenta alcuni vantaggi nella lettura degli acidi nucleici rispetto agli spettrofotometri più comuni. È possibile infatti leggere dei campioni non diluiti, poiché il range dinamico di lettura è più esteso (XX), consentendo così di ridurre gli errori che vengono commessi concentrazione operando le diluizioni dei campioni. Inoltre è possibile visualizzare uno spettro di assorbimento completo corrispondente alla lettura, formando maggiori informazioni sulle caratteristiche di purezza del campione. Da ultimo, poiché il volume di campione necessario per la lettura è piuttosto esiguo, è possibile determinare la concentrazione anche di campioni presenti in quantità ridotta, senza perdita degli stessi.

5.11.3 Microarray

La tecnica microarray si basa sull'ibridazione inversa ad alta specificità ed affinità tra sequenze di DNA (probes/reporters/sonde) fissate su un supporto solido (chip) ad alta densità in una posizione ben definita (spot) e le molecole di cDNA (target) marcato con fluorocromi fluorescenti. Il campione in analisi viene così testato per la presenza di diverse molecole target.

Un aspetto applicativo di notevole rilievo è l'analisi del profilo di espressione genica attraverso cui si possono ottenere utili informazioni su un determinato stato fisiologico o patologico per identificare specifici gruppi di geni (cluster) che vengono alterati (attivati o repressi) nella progressione della cancerogenesi.

I microarray si dividono in due gruppi: a doppio e a singolo canale; nel nostro caso abbiamo utilizzato il secondo. Nei Microarray a singolo canale o di oligonucleotidi (single-channel microarrays o *one-color microarrays*), i probe sono progettati per riconoscere parti di sequenze di mRNA sia conosciute che predette.

L'mRNA estratto dalle cellule coltivate sane e patologiche è stato retrotrascritto a cDNA e marcato con una sostanza fluorescente (cianina 3). Ad ogni sonda ibrideranno le molecole di cDNA in numero proporzionale alla loro concentrazione relativa, i cui livelli di fluorescenza emessi sono rilevati con uno scanner a laser e convertiti in immagini. Queste indicano l'espressione relativa di uno stesso gene nei diversi campioni analizzati nell'esperimento eseguito nelle medesime condizioni mentre il confronto tra due differenti condizioni (sano versus patologico) per uno stesso gene, richiede due differenti ibridazioni utilizzando un numero doppio di matrici per il confronto. Il segnale rilevato dallo scanner viene poi "pulito" e convertito da appositi software in valori numerici.

Il cDNA estratto dai nostri campioni è stato ibridato sul chip Agilent Whole human genome oligo microarray (#G4112F, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Questo microarray è costituito da sonde di DNA di 60 nucleotidi sintetizzate in situ, le quali rappresentano 41,000 trascritti umani sviluppati utilizzando i dati forniti da RefSeq, Goldenpath, Ensembl, Unigene, Human Genome Build 33 etc... fornendo così un quadro completo del genoma umano sulla base delle conoscenze attualmente disponibili. Per l'esperimento sono stati utilizzati due vetrini contenenti ciascuno quattro microarray a singolo canale da 41.000 sonde ciascuno e stampati con la tecnologia SurePrint della Agilent per un totale di 1468 controlli positivi e 153 controlli negativi per vetrino. È stato utilizzato One-color gene expression seguendo il protocollo raccomandato. Brevemente, la frazione totale di RNA è stata ottenuta dai campioni

usando TRizol Reagent (Invitrogen). La qualità dell'RNA è stata saggiata mediante l'uso del Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies). Gli RNA di scarsa qualità (numero di integrità dell'RNA inferiore a 7) sono stati esclusi dalle analisi di microarray. Attraverso il kit "Low RNA Input Linear Amplification" (della Agilent) (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA), si è ottenuto il cDNA e la marcatura dello stesso con la cianina 3-CTP (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA) partendo da 500 ng totali di mRNA estratto dai campioni. Le ibridazioni sono state eseguite a 65°C per 17 ore in un termociclatore rotante. Le immagini con risoluzione di 5 µm sono state generate attraverso Agilent scanner e il Feature Extraction 10.5 software (Agilent Technologies) è stato usato per ottenere i dati grezzi del microarray. I dati grezzi del microarray sono stati analizzati dal programma GeneSpring GX 10 (Agilent Technologies) e pre-processati con il GeneSpring plug-in di Agilent Feature Extraction Software Results. I dati sono così normalizzati in base alla media del chip e del gene. È stato utilizzato un filtro sull'espressione genica per mantenere solo le sonde espresse in almeno un campione (contrassegnato come marginale o presente). Successivamente, i campioni sono stati analizzati, raggruppati e comparati. I geni differenzialmente espressi sono stati selezionati con una differenza di espressione di 2-fold e un valore statisticamente significativo p-value (<0.05) mediante ANOVA (analisi di varianza), seguita dall'applicazione della correzione di Benjamini e Hochberg per ridurre i falsi positivi. I geni differenzialmente espressi sono stati impiegati per l'analisi dei Cluster, usando la correlazione di Pearson come misura di similarità.

5.12-RT-PCR

Il processo di retrotrascrizione di una molecola di RNA prevede la sintesi in un filamento di DNA complementare (chiamato cDNA o DNA complementare) utilizzando un enzima denominato trascrittasi inversa (RT) e primers che possono essere sia brevi (6 basi) oligonucleotidi di sequenza nucleotidica casuale (random examers), sia oligonucleotidi di timine (poli-T); nel nostro caso sono stati utilizzati i primi.

La trascrittasi inversa è un enzima multifunzionale con tre distinte attività enzimatiche: di DNA polimerasi RNA dipendente, di Rnasi H e di DNA polimerasi DNA dipendente, le prime due sono utilizzate per produrre un singolo filamento di cDNA.

La RT prevede lo svolgimento di due fasi: la retrotrascrizione dell'RNA (Reazione First-strand) e l'amplificazione del cDNA ottenuto nella prima fase (Reazione Second-strand). La reazione First-strand prevede due fasi principali: l'*innesco* e l'*allungamento*.

La fase d'*innesco* è basata sull'appaiamento dei random examers come primers sulle molecole di RNA estratto da cellule, e la successiva estensione del filamento di cDNA da parte dell'enzima trascrittasi inversa. Per la reazione sono necessari precursori deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), il buffer di reazione adatto all'enzima e ioni bivalenti Mg²⁺. L'appaiamento dei primer sulle molecole di RNA avviene ad una temperatura di 70°C per 10 minuti.

Il primer fornisce un 3'-OH che la trascrittasi inversa usa per allungare la catena di cDNA usando come stampo il trascritto. Questa seconda fase, detta di *allungamento* avviene alla temperatura di 40-50 °C (l'optimum di temperatura varia a seconda dell'enzima; nel nostro caso avviene a 42°C) per 1 ora.

Il nostro protocollo prevede un *primo* step di digestione di tutto il DNA ad una temperatura di 37°C per 10 minuti. La mix di digestione comprende: 1 µg di RNA totale estratto, 1 µl di 10X DNAsi Buffer, 2 µl di DNAsi, H₂O-DEPC fino a 10 µl.

Il *secondo* step prevede l'aggiunta di 1 µl di EDTA (25 Mm) per fermare la reazione di digestione alla temperatura di 65°C per 10 minuti.

Nel *terzo* step avviene l'annealing dei random primers alla temperatura di 70°C per 10 minuti, in un volume di 10 µl, con 200 ng di RNA precedentemente trattato con la DNasi.

La fase effettiva di retrotrascrizione avviene nel *quarto* step. La mix di RT comprende i reagenti della ditta Promega: 4 µl di 5X buffer IMPROM, 4 µl di MgCl₂ (25mM), 1 µl di dNTPs (10mM), 1 µl di RT IMPROM, per un totale di 10 µl. Quest'ultimo step dura un'ora e presenta una temperatura di 42°, l'optimum per l'attività biosintetica della retrotrascrittasi inversa.

Un ultimo step, il *quinto*, induce l'inattivazione della retrotrascrittasi inversa grazie all'innalzamento della temperatura a 70°C per una durata di 15 minuti.

Il cDNA ottenuto viene conservato a -20°C fino all'utilizzo per gli esperimenti successivi.

5.13-PCR real-time

La PCR 'real-time', denominata anche PCR quantitativa (Q-PCR) o PCR quantitativa in tempo reale, è una tecnica che consente la quantificazione del DNA target o cDNA mentre l'amplificazione è in atto.

Tale tecnica, messa a punto da Higuchi e collaboratori (Higuchi *et al.*, 1992), rispetta gli stessi principi della PCR, ma è più avanzata, poiché consente la rilevazione del materiale amplificato ad ogni ciclo di reazione. Ciò che viene rilevato è un segnale di fluorescenza che è direttamente proporzionale alla quantità di amplificato che è presente durante ogni rilevamento, questo segnale viene rilevato con uno scanner ed un software apposito lo converte in valori numerici.

Il segnale di fluorescenza viene emesso da particolari molecole che fungono da sonda. Le sonde della PCR real-time si dividono in intercalanti e sonde specifiche. Gli intercalanti si legano in maniera non specifica al DNA a doppia elica, mentre invece le sonde sono composte da oligonucleotidi marcati con un fluoroforo che riconoscono in modo specifico una determinata sequenza di interesse.

Nella PCR real-time il processo di amplificazione è identico alla metodica classica di PCR, di conseguenza le componenti di base sono simili: un cDNA che funge da template; due primers che devono avere una Temperatura di melting (T_m) adeguata; una DNA polimerasi che sia in grado di catalizzare la polimerizzazione del nuovo filamento; deossinucleosidi trifosfati (dNTPs), 4 molecole diverse, dATPs dGTPs dTTPs dCTPs in rapporto 1:1:1:1 che andranno a formare i nucleotidi della sequenza di nuova sintesi; il buffer, una soluzione tampone con un pH costante e ottimale per l'enzima; un catione divalente, Mg^{2+} , Magnesio, in soluzione come $MgCl_2$; ed infine acqua distillata.

5.13.1 Analisi dei dati

In ogni ciclo avviene l'organizzazione del DNA in doppia elica. La sonda si intercala tra le catene ed emette il segnale di fluorescenza che è rilevato dalla macchina.

Lo strumento della real time analizza il segnale lo converte in valore numerico e costruisce un grafico nel quale per ogni cDNA viene rappresentata la fluorescenza (asse y) misurata in ogni ciclo di reazione (asse x). Siccome sono necessari parecchi cicli affinché abbastanza prodotto

sia rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli mostra un andamento sigmoideo.

Inizialmente si nota che la fluorescenza rimane al di sotto di una certa soglia denominata linea base che lo strumento non è in grado di rilevare; man mano che i cicli proseguono, aumenta l'intensità del segnale, perchè aumenta progressivamente il numero di molecole di dsDNA; successivamente, nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi raggiungendo quindi, il livello di plateau.

La linea-soglia, parallela alla linea di base, deve tagliare le curve dei campioni nella loro fase di crescita esponenziale. La curva di amplificazione di ogni campione taglia la linea-soglia in un punto, chiamato ciclo soglia (Ct, Cycle threshold). Il Ct è definibile come il numero del ciclo (o frazione di questo numero) in cui la curva di amplificazione del campione in fase esponenziale taglia la linea-soglia. Il ciclo-soglia, al contrario di un valore misurato alla fine dell'amplificazione, è dunque un indicatore fedele della quantità iniziale di cDNA.

Lo strumento restituisce diverse curve per ciascun campione con i relativi valori di Ct, che saranno inversamente proporzionali alla quantità di template di partenza.

Più è concentrato il template, minore sarà il Ct, perchè prima si raggiungerà la soglia.

5.13.2 Quantificazione

La quantificazione può essere di tipo assoluto se si dispone di uno standard a quantità nota di template del gene di interesse, producendo una curva standard di calibrazione; in alternativa, come nel mio caso, si può effettuare una quantificazione relativa rapportando la quantità di cDNA del gene che si vuole studiare con quella di un gene di controllo denominato housekeeping. I geni housekeeping sono geni costitutivi, espressi attivamente ad un livello elevato in tutte le cellule dei diversi tessuti.

Durante la fase esponenziale, la quantità di DNA raddoppia ad ogni ciclo e può essere calcolata la quantità relativa di DNA. Ad esempio, per un campione il cui Ct di un gene preso in esame è di 2 cicli prima del Ct del gene housekeeping, la differenza di espressione è $2^2 = 4$, vuol dire che il gene sotto investigazione è quattro volte più rappresentato rispetto al gene di controllo, questo valore viene denominato ΔCt .

Quando si vogliono studiare differenze di espressione di uno stesso gene in popolazioni cellulari diverse, ad esempio come nel nostro caso campioni patologici (CIN) e campioni sani (NUC), viene utilizzato un gene housekeeping per la normalizzazione del dato.

Attraverso la normalizzazione si ottengono i ΔC_t delle due popolazioni cellulari differenti, a questo punto si sceglie quale delle due popolazioni deve fungere da calibratore: in questi studi di norma è il sano, al quale ΔC_t viene dato valore 1.

Nel nostro esperimento, dopo aver determinato la concentrazione e il grado di purezza di ciascun campione di RNA totale con lo spettrofotometro Nanodrop™1000 (Nanodrop Technologies Inc, Wilmington, USA), 200 ng di RNA totale è stato retrotrascritto in un totale di 20 μ l ottenendo una concentrazione di 10 ng/ μ l. L'amplificabilità dei campioni di RNA estratti è stata verificata tramite PCR standard con primer per il gene housekeeping gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH): GAPDH-F e GAPDH-R ad una concentrazione finale di 0,5 μ M.

È stata effettuata una PCR Real-Time sui campioni di cDNA estratto da cellule provenienti da tessuti patologici CIN e da tessuti normali NUC.

Come normalizzatore dei dati è stato utilizzato il gene GAPDH. Per il lavoro è stata utilizzata una sonda non specifica SYBR GREEN, all'interno della SYBR *Green* JumpStart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich) con 5 ng di cDNA e con 0,5 μ M di ciascun primer. Un controllo negativo, composto dalla stessa mix di reazione priva del cDNA stampo, è stato inserito in ciascun esperimento. Per ogni campione la reazione di PCR è stata svolta in triplicato. Le amplificazioni sono state effettuate utilizzando lo strumento ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems), con il seguente profilo termico: 95°C per 2', successivi 40 cicli a 95°C per 30'' (denaturazione), 55°C per 45'' (annealing) e 72°C per 45'' (estensione). I primer gene-specifici sono stati disegnati utilizzando il software *Perl primer* o scelti dalla letteratura. *Perl Primer* è un' applicazione grafica libera, open source, scritta in linguaggio Perl che progetta primer per PCR, bisolfito-PCR, PCR real-time e sequenziamento. I primer per GAPDH, GAPDH-F (5'-GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3') e GAPDH-R (5'-GCTTCCCGTTCTCAGCCTTG-3') e i primer per APOBEC3F, APOBEC3F-FOR (5'-CCCATCCTTTCTCGTC-3') e APOBEC3F-REV (5'-AGCACATTTCTG CGT-3') sono stati disegnati con *Perl Primer*. I primer relativi agli altri geni sono stati scelti dalla letteratura Per APOBEC3B il senso (5'-CCCAATGTCACCCTGACCAT-3') e l'antisenso (5'-GCGCCCTTCGGTAATCTCTT-3') sono stati selezionati da un lavoro di Yao e colleghi (Yao *et al.*, 2008); per HOXA4, HOXA4for (5'-GCTCTGTTT GTCTGAGCGCC-3') e HOXA4 rev (5'-AATTGGAGGATCGCATCTTGG-3') da un lavoro di Drabkin e colleghi (Drabkin *et al.*,

2002) e per Wnt4, Wnt4 for (5'-CCAGCAGAGCCCTCATGAAC-3') e Wnt4 rev (5'-TCCACCTCAGTGGCACCATC-3') da un lavoro di Nagira e colleghi (Nagira et al., 2007). Gli amplificati sono stati controllati su gel di agarosio all'1,5% per confermare la specificità della PCR (Tabella 2).

| GENE | PRIMER FORWARD (5'→3') | PRIMER REVERSE (5'→3') | AMPLIFICATO |
|-----------------|------------------------|------------------------|-------------|
| GAPDH | GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT | GCTTCCCGTTCTCAGCCTTG | 195 bp |
| HOXA4 | GCTCTGTTTGTCTGAGCGCC | AATTGGAGGATCGCATCTTGG | 104 bp |
| Wnt4 | CCAGCAGAGCCCTCATGAAC | TCCACCTCAGTGGCACCATC | 193 bp |
| APOBEC3B | CCCAATGTCACCCTGACCAT | GCGCCCTTCGGTAATCTCTT | 70 bp |
| APOBEC3F | CCCATCCTTTCTCGTC | AGCACATTTCTGCGT | 135 bp |

Tabella 2. Lunghezza dei frammenti amplificati con PCR real-time.

L'analisi dei risultati è stata eseguita con una quantificazione relativa, sfruttando il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ è usato per calcolare cambiamenti relativi nell'espressione genica determinati negli esperimenti di PCR real-time quantitativa.

Per ciascun campione, sia normale che patologico, il Ct del GAPDH, gene di riferimento per la normalizzazione, è stato sottratto al Ct del gene di interesse in tutti i campioni, ottenendo così il ΔCt :

$$\Delta Ct \text{ campione} = Ct \text{ gene} - Ct \text{ GAPDH}$$

A questo punto è stato calcolato il $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ patologici} - \Delta Ct \text{ normali}$$

L'espressione relativa (ER) del gene in ogni campione viene espressa come:

$$(ER) = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

che indica quante volte il gene di interesse nel campione patologico è espresso in più o in meno rispetto al campione normale (calibratore), facendo la comparazione con un gene housekeeping di riferimento.

Capitolo 6

RISULTATI

6.1-Analisi con PCR e tipizzazione degli HPV nei tessuti CIN e NUC

I campioni tissutali CIN e NUC sono stati preliminarmente esaminati mediante PCR per le sequenze di HPV. I 9 campioni CIN hanno evidenziato positività per i tipi di HPV ad alto rischio: 16, 18, 31 e 33 (Figura 6A, corsie 1-9) mentre i corrispondenti 9 campioni NUC sono risultati tutti negativi (Figura 6A, corsie 1-9). La genotipizzazione degli HPV con l'enzima di restrizione RsaI ha evidenziato che i 3 campioni CIN1 contenevano rispettivamente sequenze dell'HPV-33, -31 e -16 (Figura 6B, corsie 1-3); i campioni CIN2 sequenze dell'HPV-16 (Figura 6B, corsie 4 e 6) e dell'HPV -18 (Figura 6B, corsia 5); i campioni CIN3 sequenze dell'HPV-16 (Figura 6B, corsia 7). La tabella 3 indica la lunghezza dei frammenti ottenuti dopo digestione con RsaI dei prodotti di PCR di HPV.

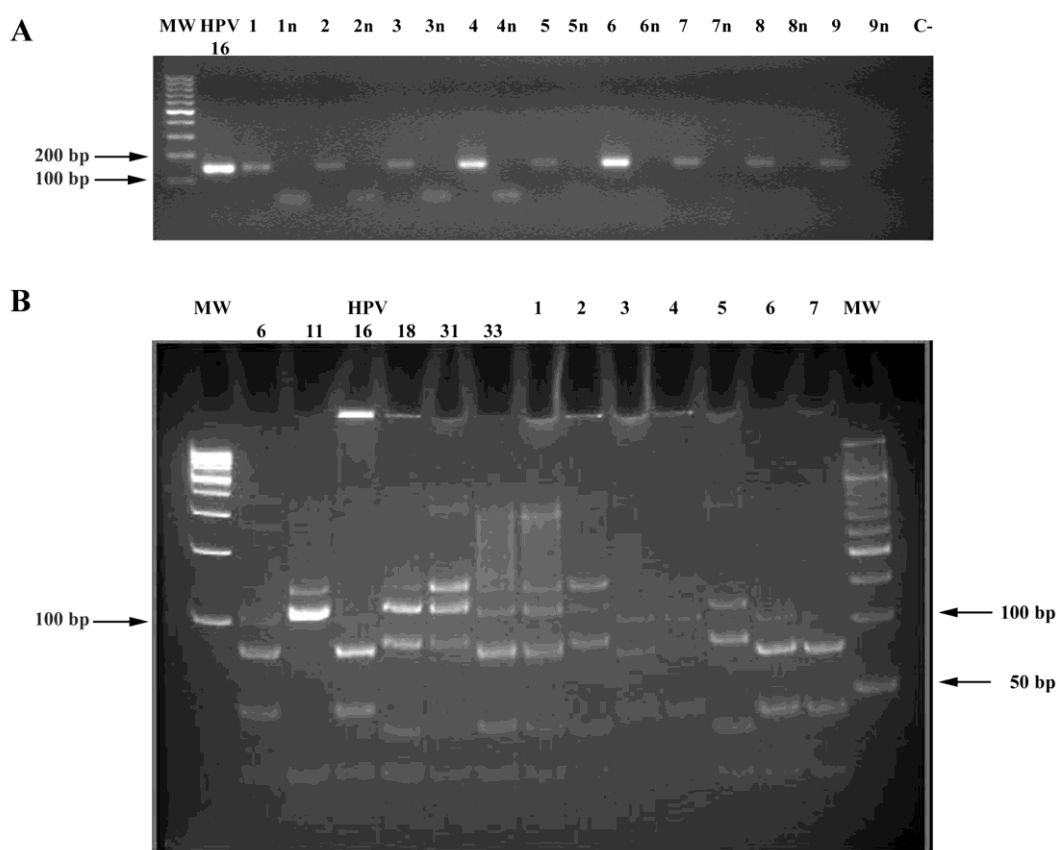


Figura 6. PCR di campioni positivi e negativi per HPV (A) e genotipizzazione del virus (B).

Pannello A: il gel d'agarosio mostra i risultati delle PCR di HPV ottenute dai campioni di DNA estratto da CIN (colonne 1-9) e da NUC (colonne da 1n a 9n). I prodotti di PCR per HPV sono visibili solamente nei campioni di DNA estratti dalle CIN. MW: marcatore molecolare di lunghezza 100 bp (sinistra). HPV-16: controllo positivo. C-: controllo negativo della reazione di PCR senza il DNA templato.

Pannello B: il gel di poliaccrilamide mostra i genotipi di HPV dei prodotti di PCR provenienti da 7 campioni rappresentativi di CIN. I campioni CIN1 (colonne 1-3) sono positivi, rispettivamente, per HPV-33, HPV-31 e HPV-16. I campioni CIN2 (colonne 4-6) sono positivi per HPV-16 (colonne 4 e 6) e per HPV-18 (colonna 5). Il campione CIN3 (colonna 7) è positivo per HPV-16.

Nelle colonne da 1 a 6 i DNA non sono completamente digeriti e sono dunque visibili bande ad un maggiore peso molecolare. La lunghezza dei frammenti sono riportati nella Tabella 3. MW: marcatore molecolare di lunghezza 100 pb (sinistra) e 50 pb (destra). HPV-6b, -11, -16, -18, -31 e -33 sono i controlli positivi per HPV.

| TIPO DI HPV | Lunghezza totale della banda | Lunghezza dei frammenti ottenuti dalla digestione con Rsa I |
|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| HPV-6b | 139 | 30 42 67 |
| HPV-11 | 139 | 30 109 |
| HPV-16 | 142 | 30 42 70 |
| HPV-18 | 145 | 30 38 77 |
| HPV-31 | 142 | 30 112 |
| HPV-33 | 139 | 30 39 70 |

Tabella 3. Lunghezze dei frammenti di DNA di alcuni genotipi HPV misurate con un set di primers GP5/GP6 e generate mediante digestione con l'enzima di restrizione RsaI.

6.2-Comportamento di crescita delle colture primarie di CIN e NUC

Le cellule isolate da frammenti di tessuto CIN e NUC variavano approssimativamente da 2×10^4 a 1×10^5 . Il 50% delle cellule della prima semina aveva aderito alla fiasca T1 e il 40% delle cellule della seconda semina nella fiasca T2. La densità delle cellule adese variava da 180 a 2400 cellule/cm².

Le colture di CIN e NUC, monitorate quotidianamente al microscopio a contrasto di fase, sono rimaste quiescenti per un periodo di 3-5 giorni. Durante questo periodo, le cellule apparivano piccole e uniformi per dimensione e morfologia (Figura 7, A).

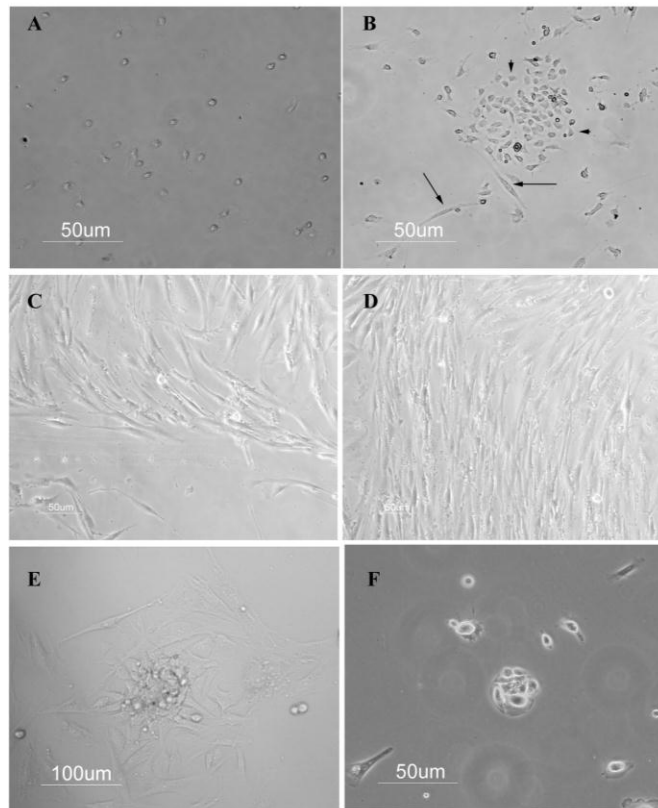


Figura 7. *Fibroblasti e cheratinociti cervicali da CIN coltivati in terreno DMEM-F12 10% FBS.*

Pannello A: una coltura al giorno 3. I fibroblasti ed i cheratinociti appaiono piccoli con morfologia e dimensioni uniformi.

Pannello B: una coltura al giorno 5. I fibroblasti (frecce) ed i cheratinociti (testa delle frecce) sono ben distinguibili.

Pannelli C e D: una coltura al giorno 8. Si notano gruppi disordinati (C) o fasci paralleli (D) di fibroblasti.

Pannello E: clone di cheratinociti CIN2 circondato da fibroblasti al giorno 8.

Pannello F: clone di cheratinociti CIN1 in assenza di fibroblasti al giorno 15.

I fibroblasti, verso il 4°-5° giorno iniziavano ad identificarsi con una forma fusiforme (Figura 7, B), mentre i cheratinociti erano ben distinguibili per la loro morfologia arrotondata o poligonale (Figura 7, B). Coerentemente, quando i due tipi di cellule hanno cominciato a proliferare, hanno mantenuto le loro caratteristiche morfologiche. La diversa forma dei due tipi di cellule in coltura ci ha permesso di verificare che i fibroblasti crescevano isolati o in gruppi disordinati o in fasci paralleli (Figura 7, C e D), mentre i cheratinociti crescevano formando cloni (Figura 7, E ed F). Gruppi di fibroblasti erano visibili al 7°-8° giorno di coltura (Figura 7, C e D) e hanno continuato ad espandersi fino alla 5° settimana di coltura.

I cheratinociti delle CIN iniziavano a proliferare in tempi differenti nelle diverse colture primarie. Cloni precoci di cheratinociti apparivano al 6°-8° giorno nelle colture di CIN2 e CIN3 (Figura 7, E), e al 10°-12° giorno nelle colture di CIN1 (Figura 7, F). Nello stesso periodo, piccoli cloni epiteliali iniziavano a svilupparsi anche nelle colture di NUC. Le colture primarie di CIN e NUC sono state coltivate fino alla confluenza, raggiunta in 5 settimane. In seguito, i singoli cloni primari di cheratinociti di CIN e NUC delle fiasche T1 e T2 sono stati visualizzati al microscopio a contrasto di fase per la loro classificazione. Le colture di CIN e NUC hanno sviluppato una varietà di cloni morfologicamente simili che sono stati classificati, sulla base della morfologia ed il contenuto dei cheratinociti, in tre tipi diversi: I, II e III (Figura 8, A, B, D, E) (Barrandon *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 2004; Tudor *et al.*, 2007).

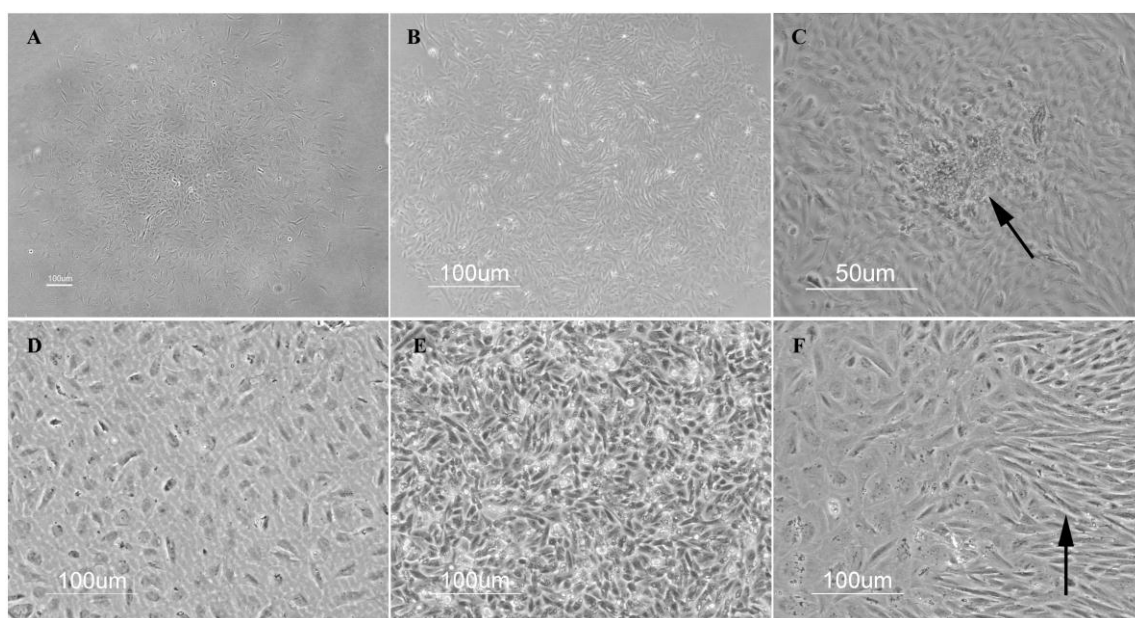


Figura 8. Cloni primari di cheratinociti da colture di CIN.

Pannelli A e D: un tipico clone di tipo I (A) ed una visione ingrandita della sua regione centrale (D).

Pannelli B ed E: un tipico clone di tipo II (B) ed un ingrandimento della sua regione centrale (E).

Pannello C: un clone di tipo III, la freccia indica cellule cresciute in verticale nella zona centrale del clone.

Pannello F: clone di tipo I (a sinistra) circondato da fibroblasti (freccia a destra).

I cloni di tipo I erano formati da cellule epiteliali di forma irregolare, appiattite e leggermente distanziate tra loro ed evidenziavano un basso rapporto nucleo-citoplasma (Figura 8, A e D). I cloni di tipo II erano costituiti da cellule più piccole, più compatte e di dimensioni più uniformi, e da un maggiore rapporto nucleo-citoplasma rispetto alle cellule dei cloni di tipo I (Figura 8, B ed E). I cloni di tipo III erano presenti solo nelle colture primarie di CIN3 e

contenevano cellule di struttura simile ai cloni di tipo II ma con una zona centrale aggiuntiva di cellule più piccole e saldamente aggregate, organizzate in strati verticali (Figura 8, C). I cloni di cheratinociti erano cresciuti sia circondati da fibroblasti (Figura 8, F) che isolati (Figura 8, A e B). Successivamente, i cloni di tipo I, II e III cresciuti nelle fiasche T1 e T2 delle colture CIN e NUC sono stati contati per calcolare l'efficienza di clonaggio (EC) dei cheratinociti (Figura 9). La EC totale delle colture CIN3, CIN2 e CIN1 era rispettivamente $1,1\% \pm 0,3\%$, $0,54\% \pm 0,05\%$ e $0,22\% \pm 0,03\%$, ($P < 0,05$: CIN3 vs CIN2; $P < 0,01$: CIN3 vs CIN1) (Figura 9). La EC dei cloni di tipo I dei CIN3, CIN2 e CIN1 era rispettivamente dello $0,4\% \pm 0,2\%$, $0,24 \pm 0,03$ e $0,17\% \pm 0,02\%$ (Figura 9). La EC dei cloni di tipo II per le colture CIN3, CIN2 e CIN1 era dello $0,6\% \pm 0,1\%$, $0,3 \pm 0,07\%$ e $0,05\% \pm 0,02\%$, ($P < 0,01$: EC cloni tipo II delle CIN3 vs CE cloni tipo II delle CIN2 e vs EC cloni tipo II delle CIN1) (Figura 9).

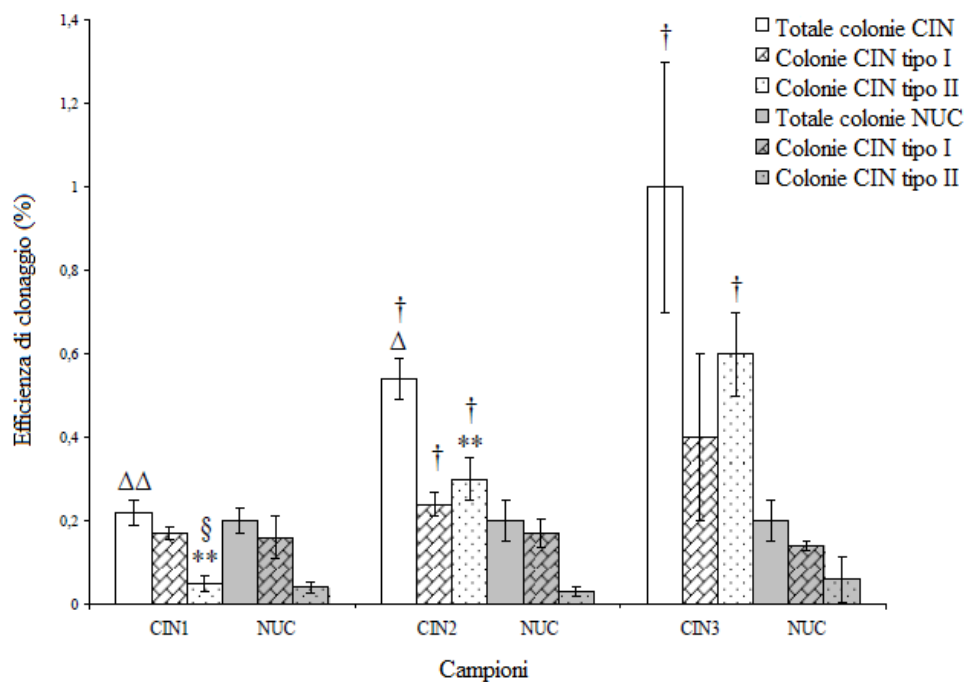


Figura 9: Efficienza di clonaggio dei cheratinociti CIN e NUC.

Il grafico mostra ciascun isotipo CIN ed il corrispondente NUC. I valori sono la media \pm DS. Δ indica la significatività statistica dell'efficienza di espansione totale dei cloni CIN1 contro l'efficienza di espansione totale dei cloni CIN3 ($\Delta\Delta$: $p \leq 0,01$) e la significatività statistica dell'efficienza di espansione totale dei cloni CIN2 contro l'efficienza di espansione totale dei cloni CIN3 (Δ : $p \leq 0,05$); **indica la significatività statistica dell'efficienza di espansione totale del clone CIN1 di tipo I e di tipo II contro l'efficienza di espansione totale del clone CIN3 di tipo II (**: $p \leq 0,01$); § indica la significatività statistica dell'efficienza di espansione totale del clone CIN1 di tipo II contro l'efficienza di espansione totale del clone CIN2 di tipo II (§: $p \leq 0,05$); † indica la significatività statistica dell'efficienza di espansione totale dei cloni, l'efficienza di espansione dei cloni di tipo I e tipo II nel gruppo CIN e nei corrispondenti gruppi NUC (†: $p \leq 0,05$).

I 4 cloni di tipo III, ottenuti da 2 colture di CIN3, sono stati inclusi nella EC dei cloni di tipo II. La EC totale dei cloni NUC era simile in ciascun gruppo corrispondente delle CIN, $0,2\% \pm 0,05\%$ ($P < 0,05$: CIN2 e CIN3 vs i loro corrispondenti NUC) (Figura 9), che era paragonabile alla EC totale dei cloni nelle CIN1 ($0,022\% \pm 0,03\%$). Nelle colture NUC delle corrispondenti CIN2 le EC dei cloni di tipo I e di tipo II erano rispettivamente $0,2\% \pm 0,07\%$ e $0,03\% \pm 0,02$ ($P < 0,05$: EC cloni di tipo I dei NUC vs EC cloni tipo I delle CIN2; $P < 0,05$: EC cloni di tipo II dei NUC vs EC cloni di tipo II delle CIN2) (Figura 9). Nelle colture NUC corrispondenti alle CIN3 la EC dei cloni di tipo I e II era rispettivamente dello $0,14 \pm 0,01$ e $0,06\% \pm 0,03\%$ ($P < 0,05$: EC cloni di tipo II dei NUC vs EC cloni di tipo II delle CIN3) (Figura 9).

6.3-Saggio di colorazione dei cloni di cheratinociti con la rodamina-B

Due colture primarie di cellule cervicali, una di CIN2 e una di NUC corrispondente, sono state colorate con rodamina-B per verificare se le cellule che componevano i cloni erano cellule epiteliali. I cloni di cheratinociti sono risultati positivi alla colorazione con rodamina-B. Nello specifico, i cloni di tipo II risultavano più colorati di quelli di tipo I, in linea con il concetto che i cheratinociti più proliferativi e meno differenziati legano la rodamina-B con più efficienza rispetto a quelli meno proliferativi e più differenziati (Figura 10).



Figura 10. Colorazione con Rodamina B di una coltura primaria di CIN2 (a sinistra) e di una coltura primaria di NUC (a destra). I cloni di tipo II (freccia in alto nella fiasca di CIN2 e freccia in alto nella fiasca di NUC) sono colorati più intensamente rispetto ai cloni di tipo I (freccia in basso nella fiasca di CIN2 e freccia in basso nella fiasca di NUC).

6.4-Subcolture delle colture primarie di CIN e NUC

$1-2 \times 10^5$ cellule tripsinizzate dalle colture primarie di CIN e NUC sono state subcolturate in nuove fiasche T25 per verificare quanto a lungo avrebbero proliferato formando cloni.

Nelle subcolture è stata osservata una leggera differenza nel comportamento di crescita delle cellule rispetto a colture primarie. Sia le subcolture di CIN che di NUC crescevano più rapidamente rispetto alle colture primarie e raggiungevano la confluenza in 4 settimane. In particolare, grandi cluster di fibroblasti erano evidenti dopo 48 ore in tutte le subcolture mentre cloni precoci di cheratinociti erano evidenti dopo 48 ore nelle subcolture CIN2 e CIN3 e dopo 3-5 giorni in quelle CIN1 e NUC. Ad ogni passaggio, i cloni di CIN e NUC sono stati contati in ogni fiasca T1 e T2. L'efficienza di clonaggio totale delle subcolture di CIN e NUC era all'incirca simile in ogni passaggio a quella delle colture primarie (Figura 11). Tuttavia, il numero di cloni di tipo I aumentava progressivamente ad ogni passaggio, a scapito dei cloni

di tipo II, mentre i cloni di tipo III, nelle subcolture non sono mai stati identificati. Le cellule di CIN e NUC sono state tenute in passaggio finché il monostrato cellulare risultava costituito solo da cloni di tipo I e da fibroblasti.

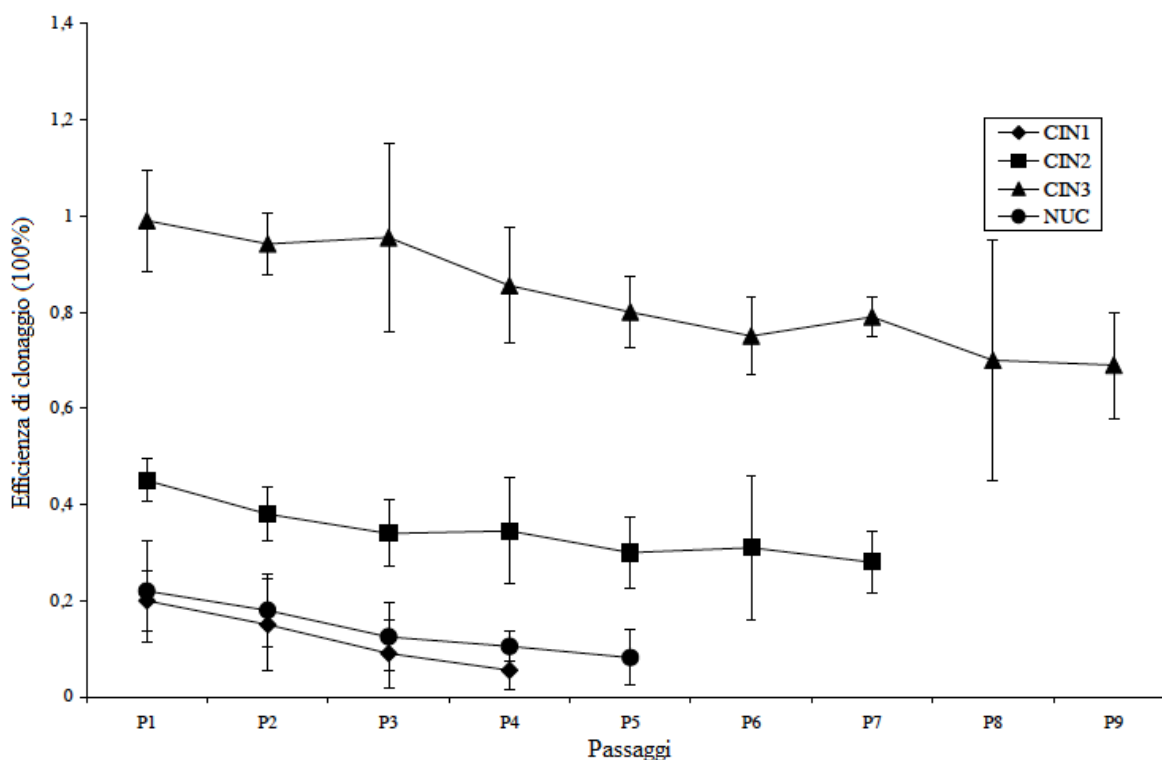


Figura 11. Il grafico indica l'efficienza di espansione delle sub-colture (asse Y) ottenuta ad ogni passaggio (asse X).

6.5-Isolamento ed espansione dei cloni epiteliali di CIN e NUC

Lo scopo di questi esperimenti era di verificare se i cloni CIN e NUC potessero essere espansi efficientemente senza differenziare. Un clone primario di tipo II derivato da una CIN3 ed uno dalla corrispondente coltura primaria di NUC sono stati isolati con cilindri di vetro e seminati in piastre di coltura da 6 pozzetti con terreno di crescita DMEM-F12 e il 10% SFB. Dopo 24 ore, il 90% delle cellule di CIN e NUC erano adese ai pozzetti ed il terreno di coltura è stato sostituito con una miscela di DMEM-F12 / dKSFM (rapporto 1:1) e il 5% SFB. Questa sostituzione è stata fatta perché, come evidenziato precedentemente, in studi preliminari avevamo verificato che i cheratinociti primari seminati in DMEM-F12 e il 10% SFB differenziavano rapidamente, sviluppando un monostrato di epiteliali alquanto eterogeneo,

formato da cellule piccole e grandi (Figura 12, A). Al contrario, l'uso del terreno selettivo dKSFM privo di siero non permetteva la crescita dei cheratinociti primari di CIN e NUC. In presenza del nuovo terreno di coltura, i cheratinociti assumevano una morfologia omogenea (arrotondata o poligonale) (Figura 12, B) e cominciavano a proliferare precocemente in modo attivo. I cheratinociti di CIN3 e NUC, raggiunta la confluenza rispettivamente in 4 e 7 giorni, sono stati espansi in fiasche T25. La confluenza è stata raggiunta in 7 giorni dai cheratinociti di CIN3 ed in 10 giorni da quelli di NUC. È interessante sottolineare che in questo periodo di espansione, i cheratinociti hanno mantenuto dimensioni piccole e morfologie uniformi e solo pochissime cellule mostravano segni di differenziamento (Figura 12, C). Il PDT (population doubling time) era di 26 ± 3 per i cheratinociti di CIN3 e 39 ± 5 per quelli di NUC. Usando questo protocollo, è stato possibile espandere 4 volte i cheratinociti di CIN3 e 2 volte quelli di NUC mantenendo capacità proliferative elevate ed una scarsa tendenza al differenziamento. Dopo questi passaggi, i cheratinociti iniziavano a differenziare e al contempo a diminuire l'attività proliferativa.

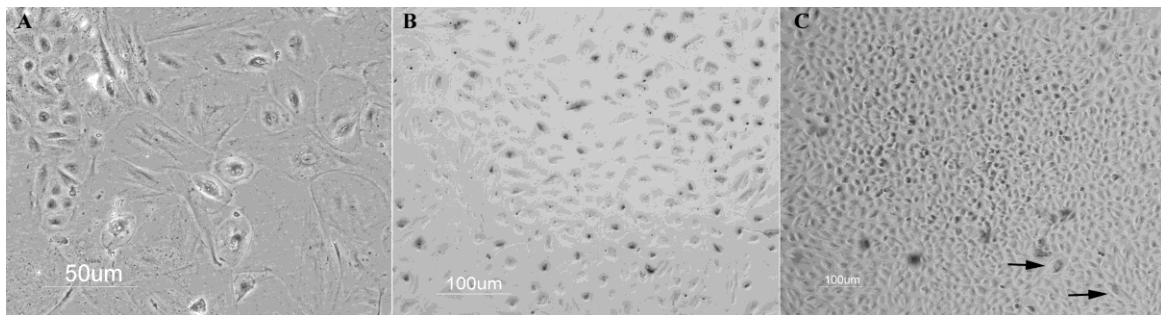


Figura 12: *Espansione dei cloni di CIN di tipo II.*

Pannello A: clone di tipo II proveniente dalla coltura CIN3 coltivato con terreno DMEMF12-10%FBS. I cheratinociti sono altamente eterogenei per dimensione e morfologia.

Pannello B: clone di tipo II proveniente dalla coltura CIN3 coltivato con terreno DMEM-F12 / dKSFM (rapporto 1:1) al terzo giorno di coltura. I cheratinociti mostrano dimensioni e morfologia uniformi.

Pannello C: gli stessi cheratinociti del pannello B portati a confluenza. Le cellule mantengono dimensioni piccole ed uniformi e presentano piccoli segni di differenziamento (freccie).

6.6-Caratterizzazione dei cloni primari di CIN e NUC

In un test preliminare, è stata saggiata la specificità di anticorpi contro varie citocheratine CK5, CK14, CK17 e CK19 su fibroblasti WI 38 utilizzati come controlli negativi (dati non

riportati). La caratterizzazione con immunofluorescenza è stata valutata nei cloni primari di tipo II delle CIN e NUC. 75 cloni su fiasche e 24 cloni tripsinizzati su fiasche e seminati su vetrini coprioggetto sono stati analizzati per valutare l'espressione delle diverse cheratine, markers di cellule epiteliali (Tabella 4). Un clone su fiasca ed un clone tripsinizzato su fiasca e seminato su vetrini coprioggetto da ogni coltura primaria CIN e NUC è stato analizzato per p63 (marcatore di proliferazione per cellule a fenotipo immaturo). La maggior parte dei cloni di CIN3 su fiasca e seminati su vetrino coprioggetto presentava una forte marcatura per CK14, CK17 e CK19 (Figura 13, A, B, C, Tabella 4) in tutte le cellule. In alcuni cloni, sia su fiasca che seminati, tutte le cellule mostravano un segnale di moderata e bassa intensità, rispettivamente per i marcatori CK14 e CK17. (Tabella 4). In altri cloni, l'intensità del segnale dei marcatori CK17 e CK19 variava tra il debole ed il moderato ed era presente nel 25%-75% delle cellule (Tabella 4). Il marcatore p63 presentava un segnale molto intenso in tutte le cellule del clone CIN3 seminato su vetrino coprioggetto (Figura 13, D, H, L). La maggior parte dei cloni delle CIN2, su fiasca e seminati su vetrino coprioggetto, erano fortemente positivi per CK14 (Figura 13, E; Tabella 4), per CK17 (Figura 13, F; Tabella 4) e per CK19 (Figura 13, G; Tabella 4), in tutte le cellule. In alcuni cloni CIN2, su fiasca e seminati su coprioggetto, la colorazione era moderata o debole rispettivamente per CK14 e CK19 e debole per CK17 (Tabella 4) in tutte le cellule. p63 non ha prodotto nessun segnale di positività. La maggior parte dei cloni CIN1, su fiasca e seminati su vetrino coprioggetto, sono risultati fortemente positivi per la CK14 (Figura 13, M; Tabella 4) e la CK19 (Figura 13, O; Tabella 4) e debolmente positivi per la CK17 (Figura 13, N; Tabella 4) in tutte le cellule. Alcuni cloni di CIN1 su fiasca e seminati su vetrino coprioggetto evidenziavano una moderata o debole positività per CK14 (Tabella 4) in tutte le cellule ed elevata positività per CK19 nel 50% delle cellule (Tabella 4). La colorazione di p63 era negativa (Figura 13, P; Tabella 4). Il pattern delle cheratine nei cloni NUC su fiasca e seminati su vetrino coprioggetto assomigliava a quello delle CIN1: molto intenso per CK14 (Figura 13, Q; Tabella 4) e per CK19 (Figura 13, S; Tabella 4) e debole per CK17 (Figura 13, R; Tabella 4) in tutte le cellule (Tabella 4). Alcuni cloni NUC su fiasca e seminati su vetrino mostravano una debole positività per la CK14 in tutte le cellule (Tabella 4) o un debole segnale per la CK19 nel 50% delle cellule (Tabella 4). p63 non ha prodotto nessun segnale di positività. I cloni CIN3 espansi con il nuovo terreno DMEM-F12/dKFSM (rapporto 1:1) e il 5% SFB mostravano un segnale molto intenso per le cheratine CK14, CK17, CK19 e per p63 (Figura 13, U - X), mentre i cloni NUC espansi con lo stesso terreno erano positivi per CK14 e CK19. Tutti i cloni su fiasca e seminati su vetrini coprioggetto erano negativi per la CK5.

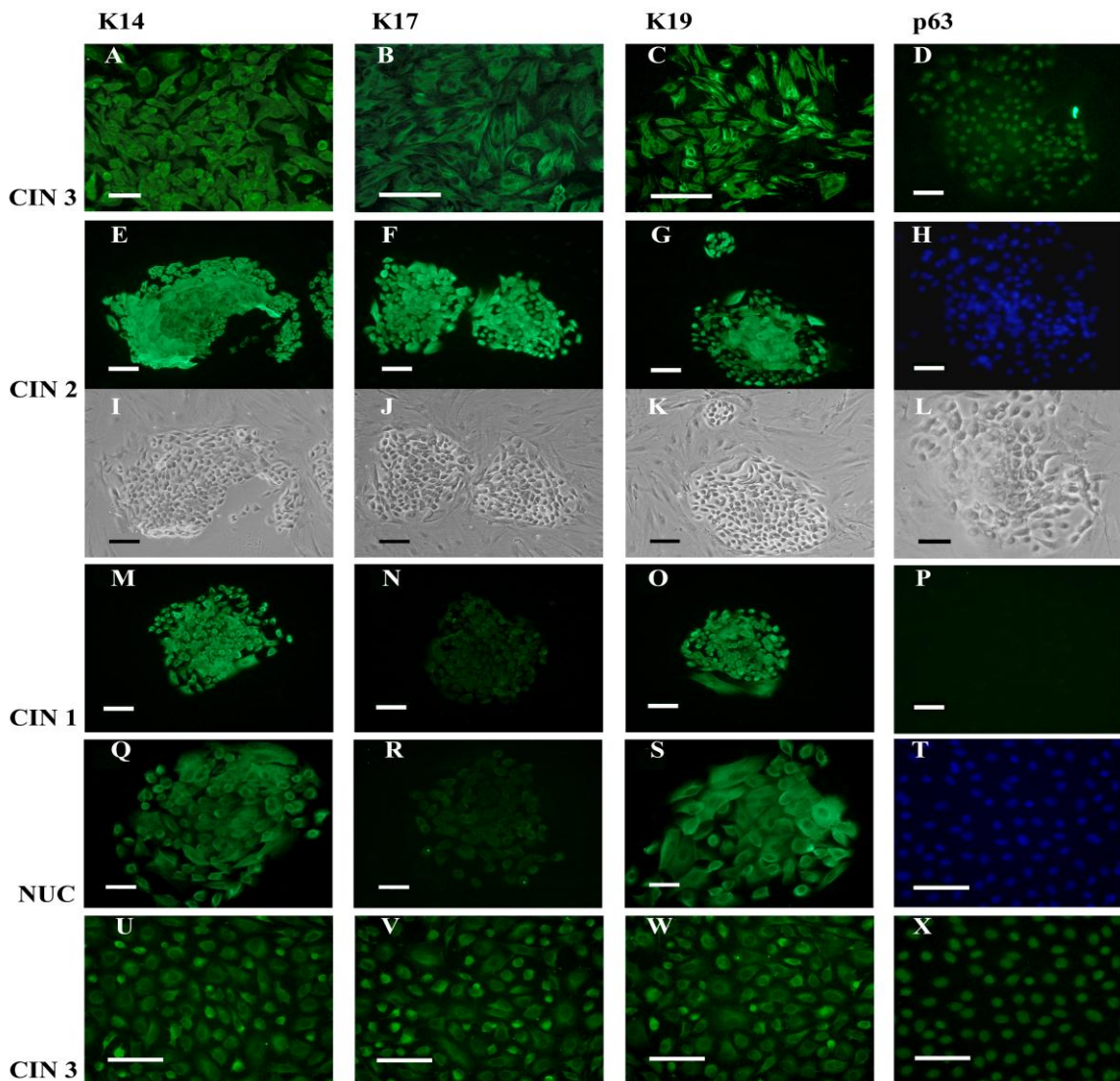


Figura 13. Caratterizzazione dei cloni CIN e NUC.

Pannelli A-D: colorazione con immunofluorescenza di un clone CIN3 seminato. Tutte le cellule sono fortemente positive per la CK14 (A), la CK17 (B), la CK19 (C); cellule in contrasto di fase (L) e colorate con DAPI (H), mostrano una positività nucleare per p63 (D).

Pannelli I-K ed E-G: immagini in contrasto di fase (I-K) e colorazione con immunofluorescenza (E-G) dei cloni CIN2. Tutte le cellule all'interno dei cloni CIN2 sono fortemente positive per la CK14 (E), la CK17 (F) e la CK19 (G).

Pannelli M-P: immunofluorescenza di un clone CIN1. Tutte le cellule all'interno dei cloni CIN1 reagiscono fortemente per la CK14 e la CK19 (M ed O) e debolmente per la CK17 (N); non si evidenzia nessun segnale per p63 (P).

Pannelli Q-S: immunofluorescenza di un clone NUC seminato. In tutte le cellule si evidenzia un segnale forte per la CK14 e per la CK19 (Q e S) e una debole colorazione per la CK17 (R).

Tutti i cheratinociti espansi da un clone CIN3 nel nuovo terreno di coltura mostrano alta espressione della CK14 (U), della CK17 (V), della CK19 (W); le cellule colorate con DAPI (T) mostrano una positività nucleare per p63 (X).

Barre: A, D, E-X = 100µm; B e C = 50µm.

| Istotipo di cloni | Cloni analizzati | Positività per CK14 | Intensità di segnale | % di cellule positive | Positività per CK17 | Intensità di segnale | % di cellule positive | Positività per CK19 | Intensità di segnale | % di cellule positive | |
|-------------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----|
| *CIN3 | 34 | 6/10 | +++ | 100 | 3/12 | +++ | 100 | 5/12 | +++ | 100 | |
| | | 4/10 | ++ | 100 | 2/12 | +++ | 50 | 2/12 | +++ | 75 | |
| | | | | | 2/12 | + | 100 | 4/12 | +++ | 25 | |
| | | | | | 1/12 | + | 45 | 1/12 | - | 0 | |
| | | | | | 4/12 | - | 0 | | | | |
| *CIN2 | 25 | 3/7 | +++ | 100 | 2/8 | +++ | 100 | 2/10 | +++ | 100 | |
| | | 3/7 | ++ | 100 | 3/8 | + | 100 | 5/10 | ++ | 100 | |
| | | 1/7 | + | 100 | 3/8 | - | 0 | 2/10 | + | 100 | |
| | | | | | | | | 1/10 | - | 0 | |
| *CIN1 | 16 | 3/4 | +++ | 100 | 3/6 | + | 100 | 4/6 | +++ | 50 | |
| | | 1/4 | + | 100 | 3/6 | - | 0 | 2/6 | - | 0 | |
| *NUC | 44 | 6/9 | +++ | 100 | 4/10 | + | 100 | 9/16 | +++ | 50 | |
| | | 3/9 | + | 100 | 6/10 | - | 0 | 4/16 | + | 100 | |
| | | | | | | | | 3/16 | - | 0 | |
| §CIN3 | 2 | 2/2 | +++ | 100 | 2/2 | +++ | 100 | 2/2 | +++ | 100 | |
| | | 1 | 1/1 | +++ | 100 | 1/1 | + | 100 | 1/1 | ++ | 50 |
| | | 6 | 6/6 | +++ | 100 | 6/6 | - | 0 | 6/6 | +++ | 100 |
| §CIN2 | 2 | 2/2 | ++ | 100 | 2/2 | + | 100 | 2/2 | ++ | 100 | |
| | | 5 | 5/5 | ++ | 100 | 5/5 | - | 0 | 5/5 | ++ | 100 |
| §CIN1 | 1 | 1/1 | +++ | 100 | 1/1 | + | 100 | 1/1 | + | 100 | |
| | | 1 | 1/1 | +++ | 100 | 1/1 | - | 0 | 1/1 | +++ | 50 |
| | | 1 | 1/1 | ++ | 100 | 1/1 | - | 0 | 1/1 | +++ | 50 |
| §NUC | 3 | 3/3 | +++ | 100 | 3/3 | - | 0 | 3/3 | ++ | 50 | |
| | | 1 | 1/1 | +++ | 100 | 1/1 | - | 0 | 1/1 | +++ | 100 |
| | | 1 | 1/1 | + | 100 | 1/1 | + | 100 | 1/1 | - | 0 |

* cloni analizzati su fiasche; § cloni analizzati su vetrini coprioggetto; +++, ++, + alta, moderata e bassa intensità di segnale, rispettivamente.

Tabella 4. Saggio di immunofluorescenza sui cloni di CIN e di NUC contenuti in fiasche o vetrini coprioggetto con anticorpi FITC coniugati contro le cheratine.

6.7-Analisi del profilo di espressione genica mediante microarray

6.7.1 Geni up- e down-regolati nelle CIN

Un clone rappresentativo di tipo II derivato da ogni coltura primaria CIN1, CIN3 e CIS, due cloni di tipo II derivati da due differenti CIN2, e tre cloni primari di tipo II da colture NUC corrispondenti a 2 CIN2 ed a 1 CIN3, sono stati utilizzati nell'indagine del profilo di espressione genica con la tecnica del microarray. I 5 cloni di CIN-CIS e i 3 cloni di NUC sono stati espansi con terreno DMEM F12:dKSFM (1:1) al 5% di siero fetale bovino ed in seguito utilizzati per l'estrazione dell'RNA totale.

L'analisi di microarray ha evidenziato una down-espressione di 2709 geni nei cloni di CIN2, di 3643 geni nel clone di CIN3 e 1523 geni nel clone di CIS, rispetto ai cloni di controllo NUC (Figura 14). In particolare, la down-regolazione di 985 geni era comune ai cloni di CIN2 e CIN3, di 257 geni era comune ai cloni CIN3 e CIS e di 137 geni era comune ai cloni CIN2 e CIS (Figura 14); 262 geni erano sottoespressi in tutti i cloni CIN2, CIN3 e CIS, rispetto ai campioni NUC (Figura 14). La up-regolazione era di 2748 geni nei cloni CIN2, di 3582 geni nel clone CIN3 e di 1689 geni nel clone CIS, rispetto ai cloni di controllo NUC (Figura 15). Nello specifico, la sovraespressione di 979 geni era comune nei cloni CIN2 e CIN3, di 160 geni era comune nei cloni CIN3 e CIS e di 196 geni era comune nei cloni CIS e CIN2 (Figura 15); la sovraespressione di 152 geni era comune a tutti i cloni, CIN2, CIN3 e CIS, rispetto ai cloni NUC (Figura 15).

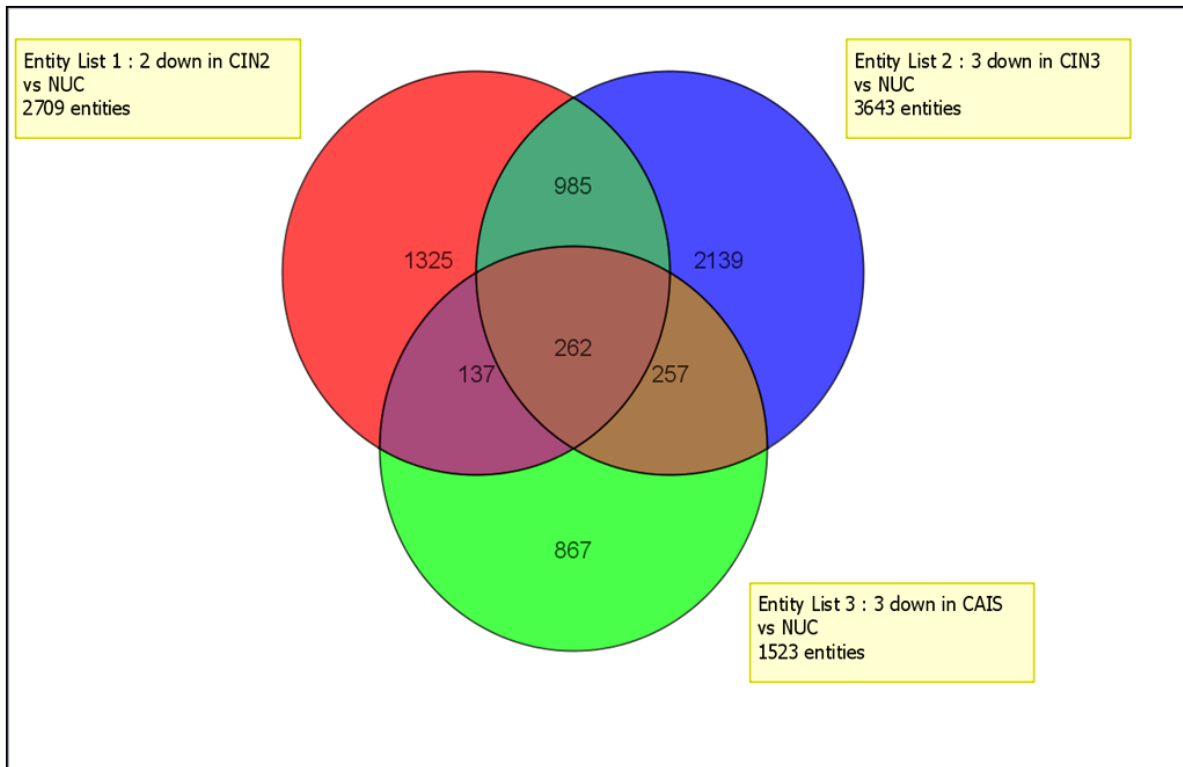


Figura 14. Rappresentazione grafica dei geni down-regolati nei CIN2, CIN3 e CIS rispetto ai controlli normali.

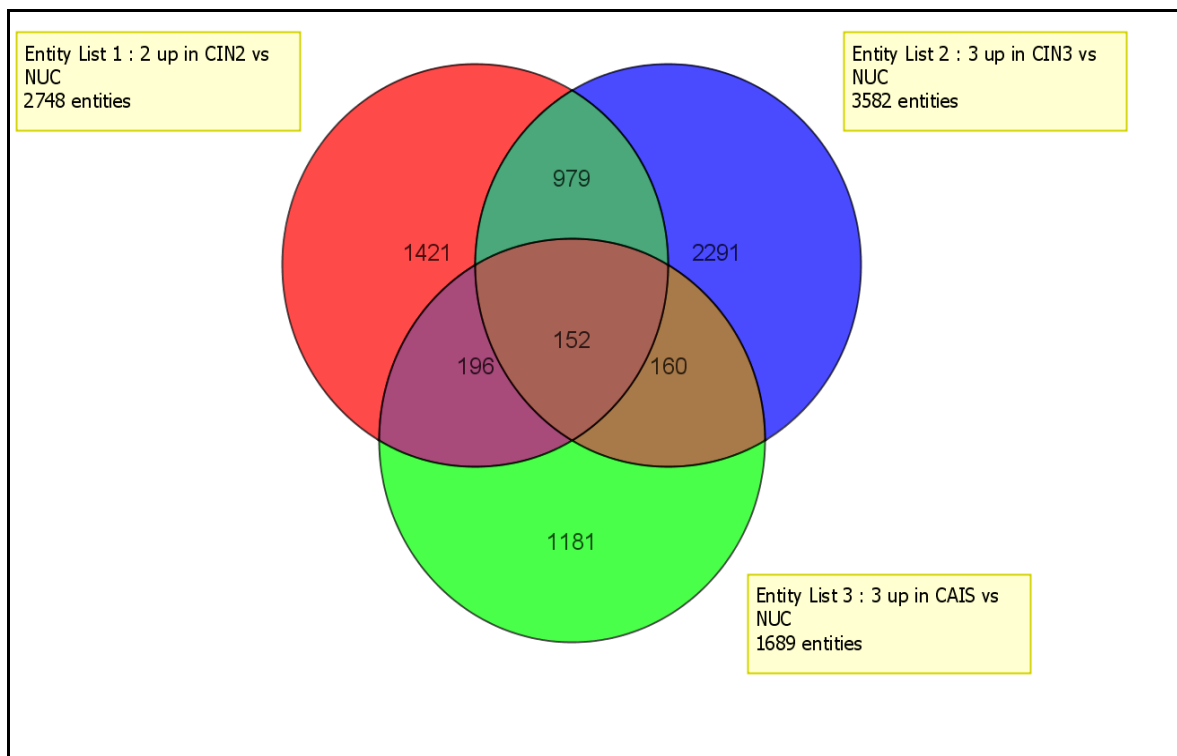


Figura 15. Rappresentazione grafica dei geni up-regolati nei CIN2, CIN3 e CIS rispetto ai controlli normali.

6.7.2 Geni differenzialmente espressi tra CIN e NUC

Lo studio del profilo di espressione genica ha identificato 598 geni differenzialmente espressi tra patologici CIN e normali NUC, 262 geni sottoespressi e i 152 geni sovraespressi con $p\text{-value} < 0.05$ e $\text{fold change} \geq 2$. Tra questi geni sono stati scelti 4 geni: 2 up-regolati, HOXA4 e WNT4 e 2 down-regolati, APOBEC3B e APOBEC3F, tra i possibili candidati della trasformazione neoplastica indotta da HPV e della progressione neoplastica delle lesioni CIN. I due geni sono stati sottoposti a PCR real-time quantitativa per la validazione del microarray. I dati sono risultati concordanti tra il risultato del microarray e il risultato della PCR-real time quantitativa (Figura 16).

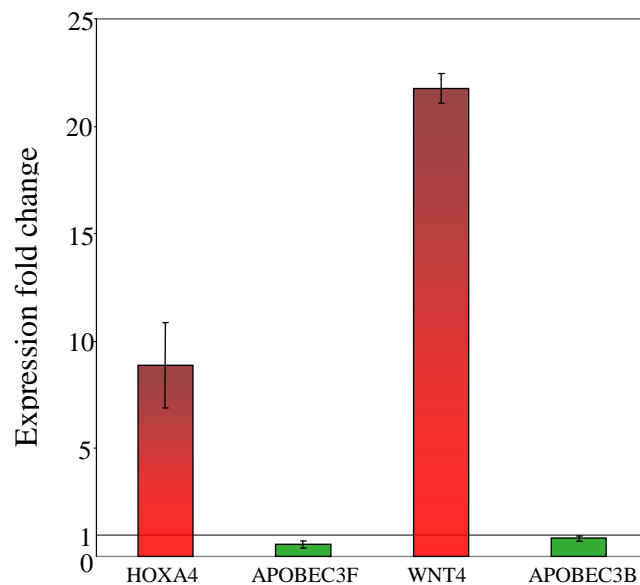


Figura 16. Quantificazione relativa dei geni HOXA4, WNT4, APOBEC3B ed APOBEC3F differenzialmente espressi tra CIN e NUC.

6.7.3 Geni up- e down-regolati nella progressione neoplastica

I 262 geni sottoespressi e i 152 geni sovraespressi comuni ai CIN sono stati raggruppati in cluster di progressione (Figura 17).

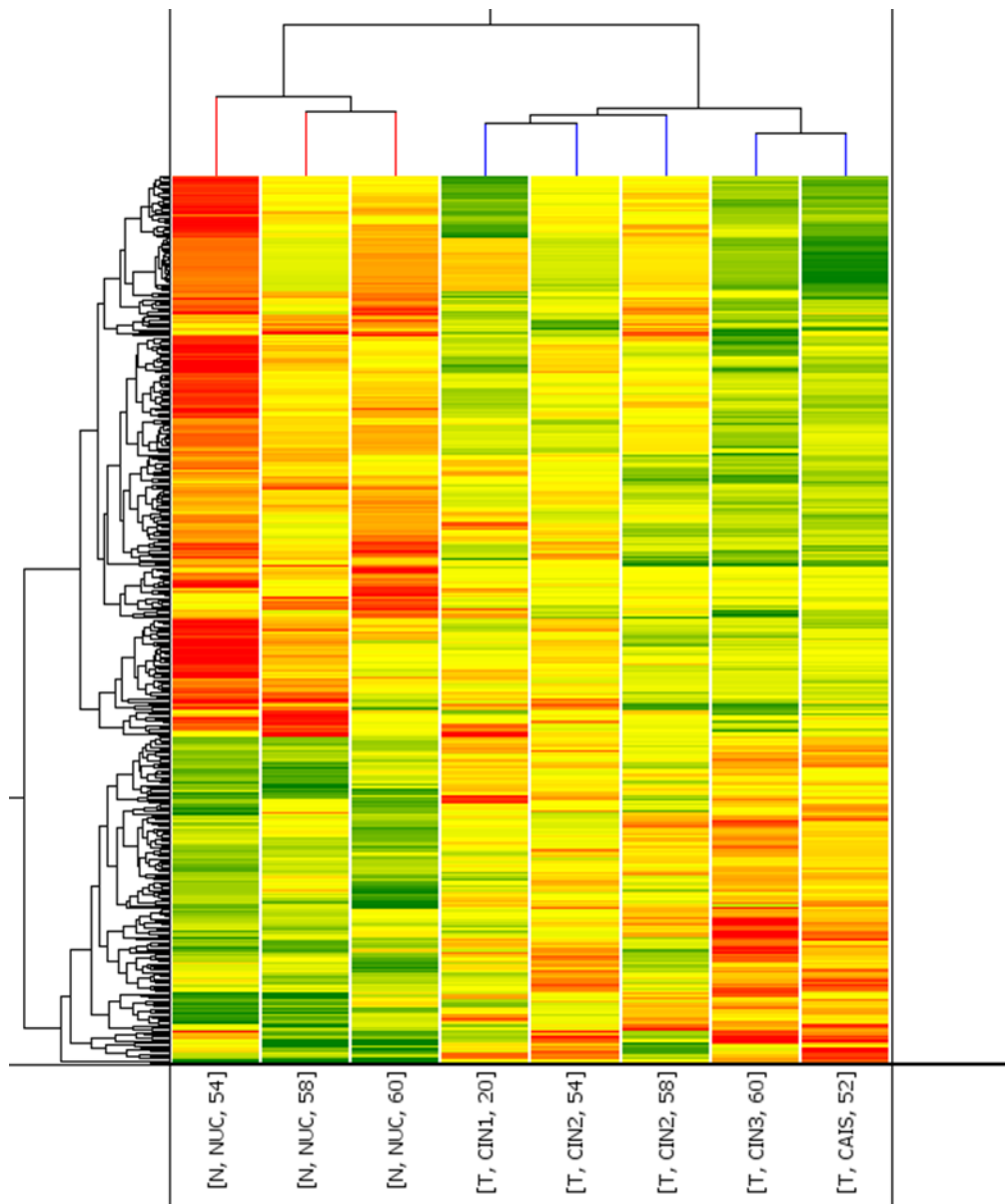


Figura 17. Rappresentazione grafica dei risultati del microarray.

Le righe rappresentano i geni analizzati mentre le colonne i campioni da cui sono stati estratti gli RNA.

I profili di espressione dei geni clusterati sono stati valutati singolarmente in ogni clone CIN in ordine di progressione, dal CIN1 al CIS, al fine di identificare progressive variazioni di espressione correlabili con il grado di malignità. 9 geni up-regolati, PFKFB3, FOXD2, HOXB3, HOXB4, HOXA3, HOXA4, HOXA5, EMX2, WNT4 e 6 geni down-regolati, APOBEC3B, APOBEC3F, PTPN3, CLDN11, S1PR5, IL1B sono stati selezionati come possibili candidati della progressione neoplastica delle CIN (Figura 18).

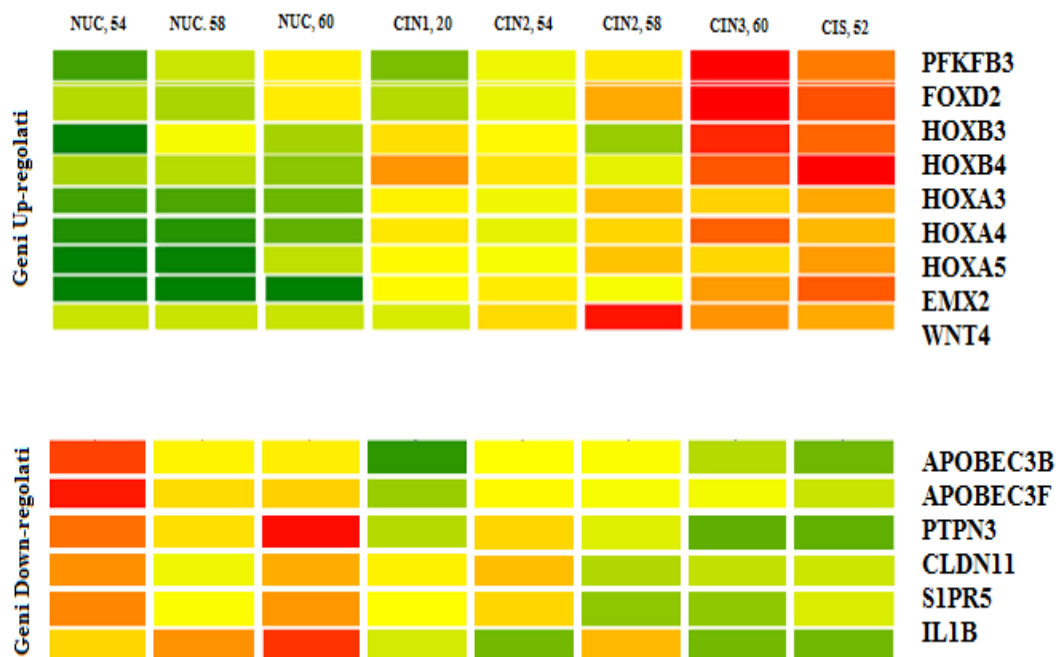


Figura 18. Selezione di geni sovra e sottoespressi probabilmente coinvolti nella progressione neoplastica delle CIN. Si noti la progressiva gradazione di colore con l'aumentare della gravità della lesione.

Capitolo 7

DISCUSSIONE

L'allestimento di colture di cheratinociti partendo da piccole quantità di tessuto è di fondamentale importanza per la ricerca ed in particolare per i tessuti del collo dell'utero. Nello specifico i tessuti CIN di solito sono molto piccoli e non consentono di ottenere sufficienti quantità di cheratinociti per l'allestimento di colture cellulari; mentre per ottenere colture di cellule epiteliali cervicali normali adeguate occorre usufruire di pezzi di cervice di partenza cospicui, ottenibili solo da isterectomie.

Ad oggi, la mancanza di sistemi di coltura di cheratinociti di CIN ha compromesso la possibilità di indagare con modelli cellulari *in vitro* il meccanismo trasformante degli HPV oncogeni, lo sviluppo/progressione delle lesioni CIN ed i marcatori della progressione neoplastica.

In questo studio, abbiamo dimostrato come cloni di cheratinociti di CIN possano essere coltivati da piccoli frammenti di cervice uterina displastica.

Tramite digestione completa dei tessuti di lesioni CIN, è stato possibile ottenere un numero adeguato di cheratinociti in grado di crescere in presenza di fibroblasti cervicali proliferanti e di terreno contenente calcio e siero. Nei protocolli descritti in letteratura, la presenza di fibroblasti proliferativi era considerata detrattiva per le colture di cheratinociti a causa della loro eccessiva capacità di crescita (che spesso sovrastava quella dei cheratinociti). Nel nostro protocollo questo problema è stato superato co-seminando le cellule cervicali ad una diluizione molto alta, in fiasche T25. In questo modo, i fibroblasti sono risultati molto radi e quindi incapaci di colonizzare la fiasca prima della formazione dei cloni di tessuto cervicale patologico, mentre i cheratinociti sono stati seminati ad una bassa densità, condizione necessaria per la proliferazione clonale (Locke *et al.*, 2005; Harper *et al.*, 2007).

Abbiamo verificato come la risemina delle cellule cervicali dalla prima serie di fiasche T1, alla nuova serie di fiasche T2, sia estremamente vantaggiosa in quanto permette la formazione di cloni anche ai cheratinociti dotati di basse capacità di ancoraggio, incrementando di conseguenza il numero totale di cloni cellulari che si possono formare.

Abbiamo dimostrato che i cheratinociti infettati naturalmente da HPV e coltivati in un terreno contenente calcio e siero, resistono alla differenziazione terminale e crescono formando cloni.

È interessante notare che l'efficienza di clonaggio delle cellule derivate da tessuti CIN varia a seconda del grado di severità della lesione da cui derivano: più alto è il grado di trasformazione neoplastica dei cheratinociti, maggiore è la capacità di queste cellule di formare cloni (CIN3>CIN2>CIN1) (Barrandon *et al.*, 1987; Woodworth *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2004; Locke *et al.*, 2005; Tudor *et al.*, 2007; Harper *et al.*, 2007).

Nelle colture di CIN sono stati identificati tre tipi di cloni: tipo I, II e III. Come riportato in precedenza, la dimensione e la morfologia dei cheratinociti che compongono i cloni sono i principali parametri utilizzati per definire il potenziale proliferativo delle cellule epiteliali (Barrandon *et al.*, 1987; Woodworth *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2004; Locke *et al.*, 2005; Tudor *et al.*, 2007; Harper *et al.*, 2007).

Pertanto, il loro potenziale proliferativo è maggiore nel clone di tipo III, rispetto al clone di tipo II, che a sua volta è maggiore del potenziale del clone di tipo I. Coerentemente, i cloni di tipo III sono stati rilevati solo nelle colture di CIN3. Inoltre, l'efficienza di clonaggio dei cloni di tipo II nelle CIN3 era superiore all'efficienza di clonaggio dei cloni di tipo II nelle CIN2, così come l'efficienza di clonaggio dei cloni di tipo II delle CIN2 era a sua volta superiore a quella delle CIN1.

Questo è anche il primo studio che dimostra come cloni di cheratinociti normali cervicali possano essere coltivati partendo da piccoli frammenti di tessuto cervicale sano HPV-negativo (NUC). Precedentemente in letteratura, i cloni di cheratinociti normali cervicali sono stati sempre derivati da pezzi interi di cervice, ottenuti da isterectomie (Stanley, 2002; Woodworth *et al.*, 1998; Narisawa-Saito *et al.*, 2008; Hougardy *et al.*, 2008).

Dalle colture di NUC abbiamo ottenuto cloni di cheratinociti di tipo II. Per spiegare questo fatto, abbiamo ipotizzato che i fibroblasti cervicali, co-coltivati con i cheratinociti normali, abbiano svolto un ruolo di supporto alla proliferazione di questi ultimi, come riporta la letteratura riguardo le co-colture di cellule epiteliali con fibroblasti inattivati umani o murini utilizzati come feeder layers. La possibilità di coltivare cheratinociti normali partendo da frammenti tissutali piccoli, recuperati dalle zone adiacenti le lesioni displastiche, è estremamente importante in quanto permetterà di studiare, con un unico prelievo, differenze cellulari e molecolari dei cheratinociti normali e patologici nella stessa paziente.

Le subcolture di CIN e NUC hanno mantenuto la capacità di formare cloni di tipo II per un numero variabile di passaggi. Tuttavia, ad ogni passaggio, i cloni di tipo II diminuivano in entrambe, a vantaggio dei cloni di tipo I e dei fibroblasti. Questi risultati indicano che i cheratinociti di CIN coltivati progressivamente differenziano, in accordo con l'ipotesi che le

displasie CIN non sono lesioni pienamente trasformate, ma preneoplastiche (Reid *et al.*, 1976; Mitchell *et al.*, 1996; Baak *et al.*, 2006; Woodman *et al.*, 2007).

I cloni di CIN e di NUC di tipo II sono stati espansi con successo per diversi passaggi mantenendosi indifferenziati ed altamente proliferativi nel nuovo terreno DMEM-F12: dKSFM, rapporto 1:1. Questo approccio tecnico è particolarmente utile per incrementare il numero di cheratinociti coltivati senza modificarne le caratteristiche originali e consente di disporre di elevate quantità di cheratinociti clonali che potranno essere impiegati in diversi studi di biologia cellulare e molecolare.

In accordo con la letteratura il modello cellulare è stato validato mediante immunofluorescenza. Il pattern d'espressione delle cheratine nei cheratinociti in campioni di tessuti patologici e normali fino ad oggi è stato studiato soprattutto *in vivo* e sono meno numerosi gli studi che utilizzano tecniche *in vitro* (Stanley, 2002; Woodworth *et al.*, 1988; Smedts *et al.*, 1990, 1992a, 1992b; Martens *et al.*, 2004). L'espressione della CK5 e della CK19 è stata precedentemente evidenziata in colture di cheratinociti normali cervicali dotati di elevata capacità proliferativa (Stanley, 2002), mentre l'espressione della CK14, della CK19 e della CK17 è stata associata rispettivamente agli strati basali, parabasali e basali nell'epitelio normale e preneoplastico *in vivo* (Smedts *et al.*, 1990; 1992a, 1992b; Martens *et al.*, 2004).

In questo studio, i cloni primari di CIN e NUC sono stati testati mediante immunofluorescenza per le citocheratine 5, 14, 17 e 19, come marcatori epiteliali e per p63, come marcatore cervicale. I cloni di tipo II risultano di maggiore interesse per il loro elevato potenziale proliferativo rispetto a quelli di tipo I, e per questo i test di immunofluorescenza sono stati eseguiti solo su questi cloni. Nella maggior parte dei cloni, su fiasca o su vetrini coprioggetto, la positività alle citocheratine era uniforme in tutte le cellule, supportando l'evidenza di clonalità dei cheratinociti coltivati. Tuttavia, in alcuni cloni la positività alle citocheratine era presente in una piccola percentuale di cellule. Nonostante le diverse intensità di segnale, la maggior parte dei cloni di CIN e NUC erano positivi alle CK14, indicando la loro comune appartenenza ai tessuti epiteliali (Smedts *et al.*, 1990; 1992a, 1992b; Martens *et al.*, 2004; Akgül *et al.*, 2007). I cloni di CIN1 e NUC mostravano un pattern di espressione simile, con positività prevalentemente per CK14 e CK19, indicative di cheratinociti dello strato parabasale o intermedio. I cloni di CIN2 e CIN3, oltre alla positività per le CK14 e CK19, evidenziavano una forte positività per la CK17, indicando la loro possibile derivazione dagli strati più basali dell'epitelio cervicale pluristratificato ed il loro maggiore potenziale proliferativo. I cheratinociti di CIN3 anche quando venivano espansi e coltivati con il nuovo

terreno di coltura risultavano fortemente positivi in tutte le cellule per CK14, CK17, CK19. Questo risultato indica che i cheratinociti di CIN espansi non cambiano le loro caratteristiche morfologiche e proliferative originali in seguito alla propagazione *in vitro*. Coerentemente, i cheratinociti di NUC espansi mantenevano la positività per CK14 e CK19, come evidenziato nei cloni primari di NUC.

I risultati negativi per CK5 possono essere dovuti al metodo di coltura dei cheratinociti usato in questo studio. È noto che l'espressione delle citocheratine nei cheratinociti varia in rapporto ai terreni di coltura utilizzati (Michellini et al., 2005; Roig *et al.*, 2010). Infatti, CK5 era stata rilevata in cheratinociti cervicali coltivati con terreno contenente siero, idrocortisone, tossina colerica ed EGF su fibroblasti murini inattivati (Stanley, 2002).

p63 è stata precedentemente identificata in cellule basali dell'epitelio esocervicale normale e in cellule basali, parabasali/intermedie e superficiali nelle lesioni di CIN1, CIN2 e CIN3 *in vivo* (Quade *et al.*, 2001; Martens *et al.*, 2004). Sulla base di questi risultati, p63 è considerata un possibile marcatore della progressione delle lesioni cervicali. In accordo, nel nostro studio, p63 è stata identificata solo nei cloni di CIN3 indicando una più probabile suscettibilità di queste cellule alla progressione neoplastica.

I cloni ottenuti grazie al modello delle co-culture, messo a punto nel nostro laboratorio, sono stati sottoposti alla tecnica del microarray, al fine di studiare il diverso profilo di espressione genica tra cloni patologici CIN e normali NUC. A tale scopo è stata eseguita un'analisi di microarray, seguita da validazione dei risultati ottenuti con PCR real time quantitativa.

Lo studio del profilo di espressione genica ha identificato 598 geni differenzialmente espressi tra patologici CIN e normali NUC, 262 geni sottoespressi e i 152 geni sovraespressi. Tra questi geni, sono risultati di particolare interesse 9 geni che hanno rivelato una sovraespressione progressiva (PFKFB3, FOXD2, HOXB3, HOXB4, HOXA3, HOXA4, HOXA5, EMX2 e WNT4) e 6 geni che evidenziavano una sottoespressione progressiva (APOBEC3B, APOBEC3F, PTPN3, CLDN11, S1PR5 ed IL1B). Tali geni potrebbero giocare un ruolo rilevante nella progressione delle neoplasie.

PFKFB3 e FOXD2 sono proteine coinvolte nel ciclo cellulare la cui sovraespressione è stata associata alla progressione di tumori del polmone, della prostata e del pancreas (Van *et al.*, 2009; Yalcin *et al.*, 2009). Anche nel nostro studio questi geni sono risultati up-regolati. In letteratura non vengono riportati studi sul coinvolgimento di questi geni nella patologia da noi studiata, ma ipotizziamo che possano giocare un ruolo anche nello sviluppo della progressione del carcinoma cervicale.

I geni homeobox sono un ampio gruppo di geni diversi tra loro, molti dei quali codificano per fattori di trascrizione che regolano la proliferazione e il differenziamento cellulare durante lo sviluppo embrionale. Sono stati descritti 300 loci di geni homeobox, con 235 probabili geni funzionali e 65 probabili pseudogeni; è stata usata una classificazione con 11 classi di geni homeobox, suddivise in 102 famiglie.

La sigla della classe ANTP deriva dal nome del gene *Antennapedia* (*Antp*), uno dei geni HOX all'interno del complesso omeotico ANT-C di *Drosophila melanogaster*. Il genoma umano contiene 39 geni HOX, divisi in 4 cluster conservati: A, B, C e D. Nel lavoro di Holland e colleghi i geni HOX sono stati divisi in 7 famiglie: Hox1, Hox2, Hox3, Hox4, Hox5, Hox6-8 and Hox9-13. I geni HOX non sono gli unici geni della classe ANTP; all'interno di questa classe sono state individuate un totale di 37 famiglie geniche. Le 37 famiglie sono state divise in 2 sottoclassi : HOXL e NKL. I geni HOX sono raggruppati in un'unica organizzazione all'interno di un network genomico costituito da 4 loci cromosomici (HOXA al 7p15.3, HOXB al 17q21.3, HOXC al 12q13.3 e HOXD al 2q31). Il network dei geni HOX oltre ad essere coinvolto nello sviluppo embrionale, è anche espresso negli organi umani adulti. I geni HOX regolano l'identità del fenotipo cellulare, il differenziamento cellulare e il controllo dei processi cellulari primari (Cillo *et al.*, 2001 Magli *et al.*, 1991; Cantile *et al.*, 2003). Il network HOX è coinvolto nell'ematopoiesi e nella leucemogenesi (Argiropoulos B & Humphries RK, 2007) e anche in alterazioni neoplastiche dei tessuti solidi umani e degli organi come il rene, il colon, il polmone, la pelle, la vescica, il fegato, il seno e la prostata (Cillo *et al.*, 1999). Alcuni geni HOX presentano la stessa espressione nei tessuti normali e nei tessuti maligni, altri hanno un'alterata espressione nelle lesioni cancerose, suggerendo un'associazione con la progressione tumorale. Infatti, è stato dimostrato che i geni HOXA sono altamente espressi in tumori umani del colon-retto, mentre alcuni geni HOXB, come HOXB2, HOXB4 e HOXB13, in carcinomi squamosi della cervice uterina (Sanz-Pamplona *et al.*, 2011; Shah N & Sukumar S, 2010). Nello studio di Hung e colleghi (Hung *et al.*, 2003) è stato dimostrato che 6 dei 39 geni Hox della classe 1, HOX1, B2, B4, C5, C10 e D13, erano espressi solo nelle linee cellulari di carcinoma cervicale e non nei tessuti cervicali normali. HOXA9, A11, A13, B5, C4, D3 e D9 erano espressi nei tessuti normali e nei tessuti patologici, mentre 13 dei 39 geni HOX erano silenti in tutti i materiali esaminati. Al contrario Alami e colleghi (Alami *et al.*, 1999) hanno riportato che la maggioranza dei geni HOX (34/39) erano espressi nei cheratinociti cervicali normali e solo HOXA2, A7, C5, C8 e D12 erano silenti. Essi hanno osservato che questo pattern era conservato nelle cellule di carcinoma cervicale SiHa eccetto per HOXC5 e C8, che potrebbero essere coinvolti nel

processo che porta alla trasformazione dei cheratinociti cervicali. Probabilmente il profilo di espressione genica dei geni HOX potrebbe cambiare nell'ambiente di coltura (Li *et al.*, 2002). Nel lavoro di Hung e colleghi è stato infine, suggerito che l'espressione di HOXB2, B4, C10 e D13 possa essere coinvolta nel processo che induce alla trasformazione delle cellule cervicali normali (Hung *et al.*, 2003). HOXA5 è stato visto che attiva la trascrizione dell'oncosoppressore p53 e la perdita di p53 è dovuta alla perdita di espressione di HOXA5 in molte linee cellulari di cancro al seno e in tumori mammari (Raman *et al.*, 2000).

Nel nostro studio abbiamo visto che HOXB3, HOXB4, HOXA3, HOXA4, HOXA5 risultavano up-regolati nelle lesioni CIN rispetto ai NUC.

HOXA4 è stato riconfermato up-regolato anche con PCR real-time quantitativa. L'up-regolazione di HOXB4, supporta l'ipotesi di Hung e colleghi che questo gene possa essere uno dei geni coinvolti nel processo che induce alla trasformazione delle cellule cervicali (Hung *et al.*, 2003). Questo risultato è confermato anche in studi più recenti, che hanno notato un'alta espressione di questo gene in carcinomi squamosi della cervice uterina (Sanz-Pamplona *et al.*, 2011; Shah N & Sukumar S, 2010). Anche gli altri geni HOX risultati da noi up-regolati, non noti in letteratura per il loro coinvolgimento nello sviluppo del carcinoma cervicale, potrebbero comunque svolgere una funzione chiave in questo tipo di tumore.

Il gene EMX2 (empty spiracles homeobox 2) codifica per un gene homeobox omologo al gene 'empty spiracles' in *Drosophila*. Nell'uomo il gene è espresso in tre tessuti: telencefalo dorsale, neuroepitelio olfattivo e sistema urogenitale. Durante lo sviluppo urogenitale è espresso nei tessuti epiteliali ed è regolato negativamente da HOXA10. Si è visto che in alcuni tumori solidi vi è una perdita di espressione di EMX2 (Kim *et al.*, 2011), tuttavia nel nostro studio è risultato up-regolato, forse poiché i tessuti da noi presi in esame sono comunque lesioni preneoplastiche e quindi non hanno ancora raggiunto un alto grado di malignità. Il risultato dovrà quindi essere indagato ulteriormente per confermare tale ipotesi.

I geni Wnt codificano per un'ampia famiglia di glicoproteine che sono importanti molecole del segnale. Le proteine Wnt controllano il destino specifico delle cellule, la migrazione e la polarità attraverso recettori della superficie cellulare e diversi pathway del segnale intracellulari per modulare la trascrizione di geni target specifici. Uno dei pathway controllato da questo gene è quello denominato Wnt/ β -catenina, noto come pathway canonico, che stabilizza la β -catenina e induce la traslocazione della β -catenina citoplasmatica al nucleo. La β -catenina traslocata nel nucleo forma complessi con i membri della famiglia del fattore enhancer linfoide/fattore cellule T (LEF/TCF) dei fattori di legame al DNA e controlla la trascrizione dei geni target. Gli altri pathway non canonici non richiedono la β -

catenina. Essi includono i pathway Wnt/Ca²⁺ mediati dalla protein chinasi C (PKC), dalla protein chinasi II calmodulina-dipendente (CamKII) e il pathway JNK. Il coinvolgimento delle Wnt e il loro segnale nella formazione del tumore sono stati suggeriti in base alle seguenti osservazioni: (a) Wnt-1 e Wnt-3 sono state inizialmente identificate come geni attivati dalle inserzioni MMTV nei tumori epiteliali mammari murini; (b) Wnt-1, 2, 3a, 5b, 7a e 7b sono state identificate nella trasformazione indotta delle cellule epiteliali mammarie di topo; (c) diverse componenti del pathway del segnale Wnt, incluse β -catenina e APC, sono frequentemente mutate nei tumori umani; (d) i geni Wnt sono espressi in modo aberrante in molti tipi di tumore.

Nel nostro studio di microarray abbiamo riscontrato un'up-regolazione del gene WNT4, riconfermata anche con PCR real-time, ricalcando quindi i risultati ottenuti anche da Memarian e colleghi che hanno dimostrato una significativa up-regolazione di Wnt-4 e altre proteine della stessa famiglia in pazienti affetti da CLL confrontati con soggetti normali. (Memarian *et al.*, 2009).

Tra i geni down-regolati vi sono APOBEC3B (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B) e APOBEC3F (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F). Questi geni sono membri della famiglia di geni citidina deaminasi. Entrambi sono tra i sette geni o pseudogeni di un cluster, che si pensa derivi da una duplicazione genica, sul cromosoma 22. I membri di questo cluster codificano per proteine che dal punto di vista strutturale e funzionale sono correlate alla citidina deaminasi APOBEC1 nell'editing dell'RNA da C ad U. Si ritiene che queste proteine possano essere enzimi coinvolti nell'editing dell'RNA ed abbiano un ruolo nella crescita e nel controllo del ciclo cellulare. APOBEC3B è stato definito un potente inibitore dell'infezione virale. La down-espressione di APOBEC3B consente la cronicizzazione di infezioni virali sia di virus a DNA che ad RNA (Abe *et al.*, 2009; Pak *et al.*, 2011).

APOBEC3F, insieme a APOBEC3G, è conosciuto per gli effetti antivirali dovuti all'attività di deaminazione delle citidine, nell'editing dei cDNA virali. Bishop e colleghi hanno riportato che le proteine A3G sono in grado di svolgere i loro effetti antivirali in assenza di attività di deaminazione e senza editing del cDNA (Bishop *et al.*, 2006). Essi hanno dimostrato che sebbene una mutazione di residui di Cys, His o Glu conservati nella porzione C-terminale di A3F e A3G provochi la perdita di attività di citidina deaminasi, queste mutazioni influiscono lievemente sulla proprietà antivirale contro HIV. L'espressione di APOBEC3B e APOBEC3F fa diminuire la retrotrasposizione di L1, a differenza di APOBEC3D e APOBEC3G che hanno un effetto più lieve. È noto che L1 e i transposoni correlati, come gli elementi Alu,

provocano malattie. Il meccanismo di inibizione di L1 non correla con la distribuzione proteica all'interno della cellula ed è stato visto che le proteine APOBEC3 usano un meccanismo indipendente dalla deaminazione per inibire L1 (Stenglein *et al.*, 2006).

APOBEC3B e APOBEC3F, risultati down-regolati nel profilo di espressione genica ottenuto in questo studio, sono stati riconfermati down-regolati anche con PCR real-time quantitativa. La down-espressione di questi geni, conosciuti per i loro effetti antivirali, potrebbe favorire anche l'infezione ad opera di HPV, consentendo lo sviluppo dei processi coinvolti nella progressione neoplastica cervicale.

La proteina PTPN3, anche chiamata PTPH1, appartiene alla sottofamiglia dei non recettori PTPs. La fosforilazione dei residui di tirosina controllati dalle protein tirosin-chinasi (PTKs) e fosfatasi (PTPs) è centrale in molti pathway del segnale cellulari, inclusi la crescita, il differenziamento, la regolazione del ciclo cellulare e l'apoptosi. Sebbene molti geni PTK siano coinvolti direttamente nella tumorigenesi dovuta a mutazioni somatiche, solo pochi geni PTP sono implicati nel cancro. All'interno della superfamiglia di geni PTP sono state identificate mutazioni somatiche in 6 geni PTP nel 26% dei tumori colon-rettali e occasionalmente in altri tipi di cancro (Töpferr *et al.*, 2007). Studi recenti hanno inoltre evidenziato che la proteina PTPN3 è un target delle oncoproteine E6 dei virus HPV (Töpferr *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2007). Töpferr e colleghi hanno dimostrato che la degradazione di PTPH1 *in vivo* e *in vitro* richiede il legame di E6 con l'ubiquitina ligasi E6-AP. E' stata confermata così l'osservazione di Jing *et al* 2007 che hanno identificato PTPH1/PTPN3 come target del complesso 16E6-E6-AP. Töpferr *et al.* hanno dimostrato che i livelli di PTPH1 endogeno erano particolarmente bassi nelle linee cellulari derivate da cancro cervicale HPV-positive esprimevano E6. L'overespressione della proteina E2, un repressore della espressione di E6, porta all'aumento della concentrazione di PTPH1 nelle cellule SiHa HPV16-positive, supportando l' ipotesi che 16E6 degradi PTPH1 endogeno in queste cellule.

In linea con la letteratura, il nostro profilo di espressione genica ha fatto emergere una down-regolazione del gene PTPN3 che sembra funzionare come un gene oncosoppressore. Inoltre la sua inattivazione, dovuta alla presenza della proteina E6 di HPV, potrebbe pertanto aumentare la capacità proliferativa della cellula e la sua eventuale progressione maligna.

CLDN11 appartiene alla famiglia delle proteine claudine che rivestono un ruolo importante nella funzionalità e formazione delle giunzioni strette tra le cellule. Membri della famiglia delle claudine sembrano avere espressioni aberranti in molti tipi di tumori, come ad esempio quello gastrico, dove l'espressione di CLDN11 risulta down-regolata (Agarwal *et al.*, 2009).

Infatti, anche nel nostro studio abbiamo visto che CLDN11 risulta essere down-regolata, come nel lavoro di Agarwal e colleghi, dimostrando che questa proteina presenta un ruolo chiave nel processo di tumorigenesi.

Il lisosfingolipide sfingosina 1-fosfato (S1P) regola la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la motilità. Le sue attività sono sia intracellulari, come secondo messaggero, sia extracellulari, come recettore. Una down-regolazione di S1PR5 è stata correlata con carcinomi delle ghiandole salivari (Bell *et al.*, 2011). Anche nel nostro studio S1PR5 risulta down-regolata, confermando il risultato di Bell e colleghi.

La proteina codificata dal gene IL1B è un membro della famiglia di citochine interleuchina 1. Questa citochina è un importante mediatore della risposta infiammatoria ed è coinvolta in diverse attività cellulari, come la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi. Poiché nel nostro studio tale gene è risultato down-regolato, ipotizziamo che questa condizione possa favorire l'infezione di HPV, dal momento che la proteina IL-1 interviene attivando processi pro-infiammatori che possono essere scatenati da infezioni virali.

In conclusione, in questo studio abbiamo settato un protocollo rapido e facile per ottenere cloni di cheratinociti di CIN e NUC partendo da piccoli frammenti di tessuto cervicale patologico e sano. Questo obiettivo è stato raggiunto co-coltivando fibroblasti e cheratinociti cervicali in ampie superfici di coltura ed utilizzando un terreno contenente calcio e siero. Inoltre, abbiamo formulato un nuovo terreno di coltura che permette l'espansione dei cheratinociti clonali di CIN e NUC senza alterarne le caratteristiche morfologiche e proliferative.

Infine, utilizzando la tecnica del microarray, abbiamo identificato probabili geni up- e down-regolati che putativamente sono coinvolti nella trasformazione e progressione neoplastica delle cellule derivate delle lesioni CIN. Con la PCR real-time è stato confermato il profilo di espressione genica del microarray di quattro di questi geni individuati. L'analisi dei geni up e down-regolati emersi in questo studio dovrà comunque essere estesa ad altri campioni CIN a diverso grado di malignità per confermare ulteriormente questi risultati. Il nostro studio ci ha permesso di identificare geni che potrebbero giocare un ruolo importante nella tumorigenesi cervicale e potrebbero offrire la possibilità di sviluppare nuovi marker diagnostici e nuovi target terapeutici.

Data la semplicità delle metodiche proposte, ci auspichiamo che questi protocolli possano incontrare l'interesse degli esperti nel settore e contribuiscano ad incentivare studi *in vitro* sui meccanismi che regolano la proliferazione ed il differenziamento nelle cellule cervicali normali e la progressione delle lesioni CIN a tumore invasivo.

BIBLIOGRAFIA

Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hatakeyama T, Tsuge M, Kitamura S, Kimura T, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Fujimoto Y, Takahashi S, Nakamura Y, Kumada H, Chayama K. Effects of structural variations of APOBEC3A and APOBEC3B genes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res.* 2009; **39**:1159-68.

ACOG Committee Opinion. *New pap test screening techniques.* 2004; 206.

Agarwal R, Mori Y, Cheng Y, Jin Z, Olaru AV, Hamilton JP, David S, Selaru FM, Yang J, Abraham JM, Montgomery E, Morin PJ, Meltzer SJ. Silencing of claudin-11 is associated with increased invasiveness of gastric cancer cells. *PLoS One.* 2009; **4**.

Alameda F, Espinet B, Corzo C, Muñoz R, Bellosillo B, Lloveras B, Pijuan L, Gimeno J, Salido M, Solè F, Carreras R, Serrano S. 3q26 (hTERC) gain studied by fluorescent in situ hybridization as a persistence-progression indicator in low-grade squamous intraepithelial lesion cases. *Hum Pathol.* 2009; **40**:1474-8.

Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clause N. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; **257**: 738–45.

Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, Freeman T, Stanley MA, Coleman N. Changes in Cervical Keratinocyte Gene Expression Associated with Integration of Human Papillomavirus 16. *Cancer Research.* 2002; **62**: 6959–6965.

Alfandari J, Shnitman Magal S, Jackman A, Schlegel R, Gonen P, Sherman L. HPV16 E6 oncoprotein inhibits apoptosis induced during serum-calcium differentiation of foreskin human keratinocytes. *Virology.* 1999; **257**: 383-396.

Akerman GS, Tolleson WH, Brown KL, Zyzak LL, Mourateva E, Engin TS, Basaraba A, Coker AL, Creek KE, Pirisi L. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to

increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signalling shortens the life span of normal human keratinocytes. *Cancer Res.* 2001; **61**: 3837–43.

Akgül B, Ghali L, Davies D, Pfister H, Leigh IM, Storey A. HPV8 early genes modulate differentiation and cell cycle of primary human adult keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2007; **16**: 590-599.

Arbyn, M., Castellsague, X., de Sanjose, S., et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann. Oncol.* 2011; **22**: 2675-2686.

Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene.* 2007; **26**:6766–76.

Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P. Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 6537-6546.

Arvantis DA and Spandidos DA. Deregulation of the G1/S phase transition in cancer and squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: A case control study. *Oncology Reports.* 2008; **20**: 751-760.

Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer.* 2005; **113**: 276-83.

Baak JP, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen EA, van Diermen B, Skaland I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol.* 2006; **59**:1017-1028.

Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; **84**:2302-2306.

Bell A, Bell D, Weber RS, El-Naggar AK. CpG island methylation profiling in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer.* 2011; **117**: 2898-909.

Benevolo M, Terrenato I, Mottolese M, Marandino F, Carosi M, Rollo F, Ronchetti L, Muti P, Mariani L, Sindico S, Vocaturo G, Vocaturo A. Diagnostic and prognostic validity of the human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples of HC2-positive patients. *Cancer Causes Control*. 2011; **22**: 869–875.

Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. Conjunctive p16INK4a Testing Significantly Increases Accuracy in Diagnosing High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *American Journal of Clinical Pathology*. 2008; **133**: 395-406.

Bertelsen BI, Steine SJ, Sandvei R, Molven A, Laerum OD. Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *Int J Cancer*. 2006; **118**: 1877-1883.

Bishop K.N., Holmes R.K. and Malim M.H. Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J. Virol*. 2006; **80**: 8450-8458.

Borger DR, Mi Y, Geslani G, Zyzak LL, Batova A, Engin TS, Pirisi L, Creek KE. Retinoic acid resistance at late stages of human papillomavirus type 16-mediated transformation of human keratinocytes arises despite intact retinoid signaling and is due to a loss of sensitivity to transforming growth factor- β . *Virology*. 2000; **270**: 397–407.

Boselli F, Petrella E. Attualità in tema di diagnosi precoce della neoplasia cervicale: il FISH TEST (Fluorescent in situ hybridization). *Patologia Genitale Infettiva e Neoplastica*; 2010; **3**: 3-8.

Bossis I., Roden R. B., Gambhira R. et al. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J. Virol*. 2005; **79**, 6723–6731.

Bravo IG, Alonso A. Phylogeny and evolution of papillomaviruses based on the E1 and E2 proteins. *Virus Genes*. 2007; **34**: 249-262.

Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides, T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J*. 1999; **18**: 2449-2458.

Broccolo F., 2008, *Carcinoma della cervice uterina- Eziopatogenesi e Profilassi*. Ed. Milano: Springer-Verlag Italia.

Calleja-Macias IE, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, Chung LP, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Ortiz-Lopez R, Barrera-Saldaña HA, Cubie HA, Cuschieri K, Villa LL, Bernard HU. Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and -b. *Journal of Virology*. 2005; **79**: 6565-6569.

Cantile M, Procino A, D'Armiento M, Cindolo L, Cillo C. HOX gene network is involved in the transcriptional regulation of in vivo human adipogenesis. *J Cell Physiol* 2003; **194**: 225–36.

Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingoes B, Kleebkaow P, Chumworathayee B, Patarapadungkit N, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M. The role of chromosomal integration to induce the transformant type of HPV gene expression in cervical lesions. Atti di *EUROGIN 2011 - HPV associated diseases and cancer*.

Chan RWS, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod*. 2004; **70**:1738-1750.

Chang YE, Laimins LA. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2000; **74**:4174–82.

Chao A, Wang TH, Lee YS, Hsueh S, Chao AS, Chang TC, Kung WH, Huang SL, Chao FY, Wei ML, Lai CH. Molecular characterization of adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix using microarray analysis of gene expression. *Int J Cancer*. 2006; **119**:91–8.

Chen Y, Miller C, Mosher R, Zhao X, Deeds J, Morrissey M, Bryant B, Yang D, Meyer R, Cronin F, Gostout BS, Smith-McCune K, Schlegel R. Identification of Cervical Cancer Markers by cDNA and Tissue Microarrays. *Cancer research*. 2003; **63**: 1927–1935.

Cheng Q, Lau WM, Tay SK, Chew SH, Ho TH, Hui KM. Identification and characterization of genes involved in the carcinogenesis of human squamous cell cervical carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2002; **98**, 419–426.

Chung C. S., Hsiao J. C., Chang Y. S. and Chang W. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 1998; **72**: 1577–1585.

Ciaran B. J. Woodman, Stuart I. Collins & Lawrence S. Young. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer.* 2007; **7**: 11-22.

Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. Homeobox genes and cancer. *Exp Cell Res.* 1999; **248**:1–9.

Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol.* 2001; **188**:161–169.

Coleman N, Greenfield IM, Hare J, Kruger-Gray H, Chain BM, Stanley MA. Characterization and functional analysis of the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human papillomavirus-related disease of cervical keratinocytes. *Am J Pathol.* 1993; **143**:355-367.

Creek KE, Geslani G, Batova A, Pirisi L. Progressive loss of sensitivity to growth control by retinoic acid and transforming growth factor- β at late stages of human papillomavirus type 16-initiated transformation of human keratinocytes. *Adv Exp Med Biol.* 1995; **375**: 117–35.

Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp Cell Res.* 1998; **241**: 76-83.

Culp, T. D. and Christensen, N. D. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 2004; **319**: 152–161.

Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1993; **67**: 2521-2528.

Day P. M., Lowy D. R. and Schiller J. T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology.* 2003; **307**: 1–11.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; **324**:17-27.

Di Domenico F, Foppoli C, Blarzino C, Pierluigi M, Paolini F, Morici S, Coccia R, Cini C, De Marco F. Expression of human papilloma virus type 16 E5 protein in amelanotic melanoma cells regulates endo-cellular pH and restores tyrosinase activity. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2009; **28**: 4.

Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L, Zeng C, Baron A, Hunger SP, Varella-Garcia M, Gemmill R, Brizard F, Brizard A, Roche. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia.* 2002; **16**:186-95.

Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom, S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; **97**:10002-10007.

Duensing S, Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Prog. Cell Cycle Res.* 2003; **5**:383-391.

Duffy CL, Phillips SL, Klingelhutz AJ. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology.* 2003; **314**:196–205.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989; **243**:934-937.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Mei Qi Y, Hengst K and McMillan NAJ. Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* 1997; **71**: 2449–2456.

Fan YB, Wu X, Fu ZM, Wu GP. Amplification of the human telomerase gene in liquid-based preparations is associated with cervical dysplasia and carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2010; **29**:157-64.

Felsani A, Mileo AM, Paggi MG. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene.* 2006; **25**: 5277-5285. Review.

Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology.* 2004; **4**:46-55.

Freshney RI, Freshney MG. 2002. *Culture of epithelial cells. Second edition.* Ed Glasgow: Wiley-Liss Inc.

Fu, Regan. 1989. *Pathology of the uterine cervix, vagina, and vulva. Major problems in pathology vol.21.* WB Saunders Company.

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997; **11**: 2090-2100.

Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16, E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 1915-26.

Gardiol D, Kuhne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 1999; **18**:5487-5496.

Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L, Javier R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene.* 2000; **19**:5270-5280.

Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16, E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 2004; **18**: 2269-2282.

Gius D, Funk MC, Chuang EY et al. Profiling Microdissected Epithelium and Stroma to Model Genomic Signatures for Cervical Carcinogenesis Accommodating for Covariates. *Cancer Res.* 2007; **67**: 7113-7123.

Goodwin EC, Naeger LK, Breiding DE, Androphy EJ, DiMaio D. Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 1998; **72**:3925-3934.

Gravitt P. Molecular diagnostic methods and prognostic markers utility. Atti di *EUROGIN 2011* - HPV associated diseases and cancer.

Hall AH, Alexander KA. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. *J. Virol.* 2003; **77**: 6066-6069.

Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2007; **36**:594-603.

Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM, Chaudhri N, Morrison LE, Palanisamy N, Wang ZY, Auer G, Steinberg W, Ried T. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer. *American Journal of Pathology.* 2005; **166**: 1229-1238.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technology.* 1992; **10**: 413-417.

Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol.* 1991; **29**:1765-1772.

Hougardy BM, Reesink-Peters N, van den Heuvel FA, ten Hoor KA, Hollema H, de Vries EG, Jong S, van der Zee AG. A robust ex vivo model for evaluation of induction of apoptosis by rhTRAIL in combination with proteasome inhibitor MG132 in human premalignant cervical explants. *Int J Cancer*. 2008; **123**:1457-1465.

Hubert P, van den Brüle F, Giannini SL, Franzen-Detrooz E, Boniver J, Delvenne P. Colonization of in Vitro-Formed Cervical Human Papillomavirus-Associated (Pre) Neoplastic Lesions with Dendritic Cells. Role of Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Am J Pathol*. 1999; **154**: 775-783.

Hung Y, Ueda M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, Yamaguchi H, Akise D, Ueki M. Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2003; **94**: 437-441.

Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A. Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res*. 2002; **62**: 4860-4866.

Ishikawa M, Fujii T, Saito M. Overexpression of p16 INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 2006; **16**: 347-353.

Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene E6 and E7 expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells using small interfering RNAs. *Methods Mol. Biol*. 2005; **292**: 401-420.

Jing M, Bohl J, Brimer N, Kinter M, Scott BVP. Degradation of Tyrosine Phosphatase PTPN3 (PTPH1) by Association with Oncogenic Human Papillomavirus E6 Proteins. *Journal of Virology*. 2007; **81**: 2231–2239.

Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J*. 1994; **13**:1549-1556.

Joyce J. G., Tung J. S., Przysiecki C. T. et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**, 5810–5822.

Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol.* 1998; **17**: 146-153.

Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 2001; **10**: 46-54.

Katzenellenbogen RA, Egelkroun EM, Vliet-Gregg P, Gewin LC, Gafken PR, Galloway DA. NFX1-123 and Poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16E6 expressing cells. *J Virol* 2007; **81**: 3786-3796.

Kim MS, An CH, Yoo NJ, Lee SH. Rare somatic mutation and loss of expression of EMX2 gene in common solid cancers. *APMIS.* 2011; **119**:733-4.

Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999; **59**:6132-6136.

Kravchenko-Balasha N, Mizrachy-Schwartz S, Klein S, Levitzki A. Shift from Apoptotic to Necrotic Cell Death during Human Papillomavirus-induced Transformation of Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 2009; **284**: 17717-17727.

Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L, Javier RT. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* 2000; **74**:9680-9693.

Li H, Huang CJ, Choo KB. Expression of homeobox genes in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2002; **84**: 216–21.

Liu, J. P. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 1999; **13**: 2091–2104.

Locke M, Heywood M, Fawell S, Mackenzie IC. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 2005; **65**:8944-8950.

Maestri I. *Il test HPV: aspetti clinici.* Convegno tenutosi a Ferrara il 13/10/2006.

Magli MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; **88**: 6348–52.

Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cells, the cervical stem cells. *Anticancer Res.* 2004; **24**: 771-774.

Martini F, Iaccheri L, Martinelli M, Martinello R, Grandi E, Mollica G, Tognon M. Papilloma and Polyoma DNA tumor virus sequences in female genital tumors. *Cancer Invest.* 2004; **22**: 697-705.

Massimi P, Gammoh N, Thomas M, Banks L. HPVE6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene.* 2004. **23**: 8033-8039.

Mariuzzi GM. 2006. *Anatomia patologica con correlazioni anatomo-cliniche.* Piccin Nuova Libreria.

Memarian A, Hojjat-Farsangi M, Asgarian-Omran H, Younesi V, Jeddi-Tehrani M, Sharifian RA, Khoshnoodi J, Razavi SM, Rabbani H, Shokri F. Variation in WNT genes expression in different subtypes of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009; **50**: 2061-70.

Mi Y, Borger DR, Fernandes PR, Pirisi L, Creek KE. Loss of transforming growth factor- β (TGF- β) receptor type I mediates TGF- β resistance in human papillomavirus type 16-

transformed human keratinocytes at late stages of in vitro progression. *Virology*. 2000; **270**: 408–16.

Michelini M, Rosellini A, Mandys V, Simoncini T, Revoltella RP. Cytoarchitecture modifications of the human uterine endocervical mucosa in long-term three-dimensional organotypic culture. *Pathol Res Pract*. 2005; **201**:679-689.

Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Wright T, Sarkar A, Richards-Kortum R, Hong WK, Schottenfeld D. Cervical human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1996; **21**:17-25.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986; **51**: 263-273.

Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel, R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol*. 1989; **63**:4417-4421.

Muñoz N, Bosch FX, Silvia S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders JFP, Chris JLM. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New Engl J Med*. 2003; **348**: 518-527.

Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006; **24**:1-10.

Nagira T, Nagahata-Ishiguro M, Tsuchiya T. Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notchgene expression. *Biomaterials*. 2007; **28**: 844-50.

Nakagawa S, Huibregtse JM. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin protein ligase. *Mol. Cell Biol*. 2000; **20**:8244-8253.

Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007; **98**:1505-1511.

Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Ohno S, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Hirohashi S, Kiyono T. An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Res.* 2008; **68**: 5699-5705.

Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation associated and NF- κ B-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001;**75**: 4283–96.

Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase Activation by Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein: Induction of Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression through Myc and GC-Rich Sp1 Binding Sites. *Journal of virology.* 2001; **75**: 5559–5566.

Okigaki T, Kessous A, Simard R. Growth of Human Cervical Epithelial Cells in vitro. *Proc Japan Acad.* 1980; **56**:206-210.

Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993;**12**:186-92.

Pak V, Heidecker G, Pathak VK, Derse D. The role of amino-terminal sequences in cellular localization and antiviral activity of APOBEC3B. *J Virol.* 2011; **85**:8538-47.

Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein: implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 6764-6769.

Patterson N. A., Smith J. L. and Ozbun M. A. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J. Virol.* 2005; **79**: 6838–6847.

Pei XF, Sherman L, Sun YH, Schlegel R. HPV-16 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium. *Carcinogenesis*. 1998; **19**:1481-1486.

Pett MR, Trent Herdman M, Palmer RD, Yeo GSH, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *PNAS*. 2006; **103**: 3822-3827.

Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*. 1988; **53**: 539-547.

Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol*. 1987; **61**: 1061-6.

Pirisi L, Creek KE, Doniger J, DiPaolo JA. Continuous cell lines with altered growth and differentiation properties originate after transfection of human keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *Carcinogenesis*. 1988; **9**: 1573-9.

Quade BJ, Yang A, Wang Y, Sun D, Park J, Sheets EE, Cviko A, Federschneider JM, Peters R, McKeon FD, Crum CP. Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2001; **80**:24-29.

Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, Marks J, Sukumar S. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumors. *Nature* 2000; **405**: 974-8.

Rajcumar T, Sabitha K, Vijayalakshmi N, Shirley S, Bose MV, gopal G, Selvaluxmy G. Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis. *BMC Cancer*. 2011; **11**: 80.

Reid B, Coppleson M. Natural history and diagnosis of malignant and premalignant cervical disease. In: Jordan JA, Singer A, editors. *The cervix*. Philadelphia:Saunders. 1976; 317-330.

Reuschenbach M, Seiz M, von Knebel Doeberitz C, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, Sartor H, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Combined expression of p16^{INK4A} and Ki-67 in cervical epithelial cells indicates high grade intraepithelial neoplasia and cancer. *Atti di EUROGIN 2011 - HPV associated diseases and cancer.*

Reza Jalali G. Amplification of the chromosome 3q26 region shows high negative predictive value for nonmalignant transformation of LSIL cytologic finding. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2010; **202.**

Roig AI, Eskiocak U, Hight SK, Kim SB, Delgado O, Souza RF, Spechler SJ, Wright WE, Shay JW. Immortalized epithelial cells derived from human colon biopsies express stem cell markers and differentiate in vitro. *Gastroenterology.* 2010; **138**:1012-1021.

Rosty C, Sheffer M, Tsafrir D, Stransky N, Tsafrir I, Peter M, de Crémoux P, de La Rochefordière A, Salmon R, Dorval T, Thiery JP, Couturier J, et al. Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene.* 2005; **24**: 7094–104.

Ruutu M, Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Transcriptional profiling of a human papillomavirus 33-positive squamous epithelial cell line which acquired a selective growth advantage after viral integration. *Int J Cancer.* 2002; **100**: 318–26.

Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cané S, Bellone S, Palmieri M, Anfossi S, Thomas M, Burnett A, Kay HH, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy Jr. J, Pecorelli S. Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology.* 2005; **331**: 269-291.

Sanz-Pamplona R, Cordero D, Berenguer A, Lejbkowicz F, Rennert HS, Salazar R, Biondo S, Sanjuan X, Pujana MA, Rozek L, Giordano TJ, Ben-Izhak O, Cohen HI, Trougouboff P, Bejhar J, Sova Y, Rennert G, Gruber SB, Moreno V. Gene Expression Differences Between Colon and Rectum Tumors. *Clin Cancer Res.* 2011; **17**: 7303-12.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990; **21**:1129-1136.

Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010;**10**: 361-71. Review.

Sherman L, Schlegel R. Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes mediated inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J Viro*. 1996; **70**:3269-3279.

Sherman L, Itzhaki H, Jackman A, Chen JJ, Koval D, Schlegel R. Inhibition of serum- and calcium-induced terminal differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6: study of the association with p53 degradation, inhibition of p53 transactivation, and binding to E6BP. *Virology*. 2002; **292**:309-320.

Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*. 2010; **118**:12-17.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985; **314**: 111-114.

Smedts F, Ramaekers F, Robben H, Pruszczynski M, van Muijen G, Lane B, Leigh I, Vooijs P. Changing patterns of keratin expression during progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*. 1990; **136**: 657-668.

Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Robben H, Lane B, Leigh I, Plantema F, Vooijs P. Keratin expression in cervical cancer. *Am J Pathol*. 1992; **141**: 497-511.

Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Robben H, Lane B, Leigh I, Plantema F, Vooijs P. Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*. 1992; **140**:601-612.

Song JY, Lee JK, Lee NW, Jung HH, Kim SH, Lee KW. Microarray analysis of normal cervix, carcinoma *in situ*, and invasive cervical cancer: identification of candidate genes in pathogenesis of invasion in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2008; **18**: 1051-1059.

Stanescu AD, Bleotu C, Ples L, Poenaru M, Ghinda E, Ionescu M, Anton G. Role of p16^{Ink4A}, and hTERT in early detection of cervix cancer. Atti di *EUROGIN 2011 - HPV associated diseases and cancer*.

Stanley MA, Browne H. M, Appleby M, and Minson AC. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int. J. Cancer*. 1989; **43**: 672–676.

Stanley MA. Culture of Human Cervical Epithelial Cells. In: Freshney RI, Freshney MG, editors. *Culture of Epithelial Cells*. 2nd ed. New York:Wiley-Liss. 2002; 137-169.

Stenglein Mark D. and Harris Reuben S. APOBEC3B and APOBEC3F Inhibit Retrotransposition by a DNA Deamination-independent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; **281**: 16837-16841.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998; **393**:229-234.

Summerford C., Bartlett J. S. and Samulski R. J. $\alpha V\beta 5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med*. 1999; **5**: 78–82.

Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. 1999; **18**: 7690-7700. Review.

Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J General Virol*. 1999; **80**: 1513-1517.

Töpferr S, Müller-Schiffman A, Matentzoglou K, Scheffner M, Steger G. Protein tyrosine phosphatase H1 is a target of the E6 oncoprotein of high-risk genital human papillomaviruses. *Journal of General Virology*. 2007; **88**: 2956-2965.

Tudor D, Chaudry F, Harper L, Mackenzie CI. The in vitro behavior and patterns of colony formation of murine epithelial stem cells. *Cell Prolif*. 2007; **40**:706-720.

Van der Heul-Nieuwenhuijzen L, Dits NF, Jenster G. Gene expression of forkhead transcription factors in the normal and diseased human prostate. *J Biol Chem*. 2009; **103**:1574-80.

Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol*. 1992; **73**: 2653-2660.

Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*. 2001; **75**: 4467-72.

Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; **100**: 8211-8216.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000; **408**:307-310.

Vousden KH, Jat PS. Functional similarity between HPV16E7, SV40 large T and adenovirus E1a proteins. *Oncogene*. 1989; **4**: 153-158.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990; **248**:76-79.

WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer, *Human Papillomavirus and related cancers, 3rd edition*. 2010 [<http://www.who.int/hpvcentre/statistics/en/>].

WHO– Integrating Health Care for Sexual and Reproductive Health and Chronic Diseases. *Comprehensive cervical cancer control – a guide to essential practice, chapter 2*. 2006.

WHO - Immunization, vaccines and biologicals. *Human papillomavirus laboratory manual. 1st edition*. 2009.

Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 2002; 24 (3): 275-90. Review.

Wong YF, Selvanayagam ZE, Wei N, Porter J, Vittal R, Hu R, Lin Y, Liao J, Shih JW, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Yip SK, Ngong DT, Siu N, Chan LKY, Chan CS, Kong T, Kutlina E, McKinnon RD, Denhardt DT, Chin K-V, TKH Chung. Expression Genomics of Cervical Cancer: Molecular Classification and Prediction of Radiotherapy Response by DNA Microarray. *Clinical Cancer Research*. 2003; 9: 5486–5492.

Wong YF, Cheung TH, Tsao GS, Lo KW, Yim SF, Wang VW, Heung MM, Chan SC, Chan LK, Ho TW, Wong KW, Li C, et al. Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer*. 2006; 118: 2461–9.

Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:11-22.

Woodworth CD, Bowden PE, Doniger J, Pirisi L, Barnes W, Lancaster WD, DiPaolo JA. Characterization of normal human exocervical epithelial cells immortalized in vitro by papillomavirus types 16 and 18 DNA. *Cancer Res*. 1998; 48:4620-4628.

Yao Y, Schröder J, Karlsson H. Verification of proposed peripheral biomarkers in mononuclear cells of individuals with schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2008; 42: 639-43.

Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane A, Nelson K, Clem AL, Brock E, Siow D, Wattenberg B, Telang S, Chesney J. Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*. 2009; 284:24223-32.

Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 668-673.

Zanoio L. *Ginecologia e ostetricia.* 2007; 25, 389.

Zhang A, Maner S, Betz R. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2002; 101: 427-433.

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-350.

Zyzak LL, MacDonald LM, Batova A, Forand R, Creek KE, Pirisi L. Increased levels and constitutive tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor contribute to autonomous growth of human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes. *Cell Growth Differ.* 1994;5: 537-47.