

Florian Oßwald
Dr. med. dent.

Genomweite DNA-Methylierungsanalyse von Lang- und Kurzzeitüberlebenden mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich

Promotionsfach: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Christel Herold-Mende

Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich („head and neck squamous cell carcinoma“, HNSCC) bei nur wenig über 50%. Innerhalb eines Tumorstadiums zeigen sich jedoch hinsichtlich der Gesamtüberlebensrate große Schwankungen von wenigen Monaten bis zu 15 Jahren. Neuere Arbeiten implizieren, dass eine veränderte Genexpression zu diesem Überlebensvorteil beiträgt. Ursache hierfür können epigenetische Veränderungen wie z.B. Methylierung sein. Bis auf wenige Gene steht eine genauere Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Methylierung und dem Überleben der Patienten jedoch noch aus. Das Ziel der Arbeit war es, mithilfe einer genomweiten Analyse differenziell methylierte Gene in Kurzzeit- und Langzeit-Überlebenden mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zu identifizieren.

Hierfür wurde aus kryokonserviertem Tumorgewebe von 10 Langzeitüberlebenden (LZÜ) und 10 Kurzzeitüberlebenden (KZÜ) genomische DNA extrahiert. Da in zahlreichen Publikationen gezeigt werden konnte, dass HPV-positive Tumore ein eigenständiges und von den HPV-negativen Tumoren abweichendes Methylierungs- und Expressionsmuster aufweisen, wurden diese im Vorfeld durch eine HPV-Genotypisierung und eine p16-Färbung identifiziert und von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Anschließend wurde die Methyl-CpG-Immunopräzipitation (MCIp) zur Anreicherung von methylierten CpG-Regionen innerhalb des Genoms erfolgreich für HNSCC-Tumore etabliert. Die Identifizierung der methylierten Gene erfolgte schließlich mittels CGI-Microarray (Human CpG Island Microarray).

Es konnte gezeigt werden, dass das lokale Methylierungslevel einzelner Genabschnitte sowohl bezüglich der differenziellen Methylierung zwischen KZÜ- und LZÜ-Tumoren als auch für die absolute Methylierung der am höchsten methylierten Gene beider Gruppen in den Tumoren der KZÜ deutlich erhöht ist. Des Weiteren konnte ein Methylierungsmuster identifiziert werden, welches aus insgesamt 66 Genen (repräsentiert durch 288 Sonden auf dem CGI-Microarray) besteht und eine zuverlässige Zuordnung der Proben zu den Kurz- und Langzeitüberlebenden ermöglichte. Bis auf wenige Ausnahmen handelte es sich hierbei um Genabschnitte, welche in den KZÜ- im Vergleich zu den LZÜ-Tumoren hypermethyliert waren.

Die anschließende Validierung der Methylierungsdaten für die am stärksten differenziell methylierten Gene (n=15) erfolgte mit Hilfe der MassARRAY®-Technologie. Für 10 der 15 in die Validierungsanalyse mit aufgenommenen Kandidatengene konnten die signifikanten Methylierungsdifferenzen ($p < 0,05$) zwischen KZÜ- und LZÜ-Tumoren bestätigt werden. Zudem konnte für die verbleibenden 5 Gene ein eindeutiger Trend zur Hypermethylierung in den Tumoren der KZÜ gezeigt werden. Bei den untersuchten Genen handelte es sich sowohl um bekannte Vertreter, die bereits des Öfteren im Zusammenhang mit der Entstehung und

Progression verschiedener Tumoren erwähnt wurden (FRZB, FIH-1, TP73) als auch um bisher kaum in der Literatur beschriebene Gene.

Um die Kandidatengene hinsichtlich der differentiellen Methylierung als potentielle Biomarker etablieren zu können, müssen sich an die hier durchgeführten Untersuchungen weitere Analysen anschließen, welche die Methylierungsdaten an unabhängigen Patientenkollektiven auf ihre Zuverlässigkeit und Gültigkeit prüfen. Ob die ausgewählten Gene auch funktionelle Bedeutung in der Karzinogenese von HNSCC haben, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beurteilt werden. Zweifellos hat die hier durchgeführte genomweite Methylierungsanalyse das Potential epigenetischer Biomarker für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich veranschaulicht und gezeigt, dass diese möglicherweise zu einem besseren Verständnis dieser komplexen Tumorerkrankung und einer Vorhersage des klinischen Verlaufs beitragen können.