

Nicolas Wentzensen
Dr. med.

Charakterisierung viral-zellulärer Fusionstranskripte aus Papillomvirus-positiven anogenitalen Läsionen

Geboren am 06.03.1973 in Biberach / Riß
Reifeprüfung am 27.05.1992 in Mannheim
Studiengang der Fachrichtung Medizin von WS 93/94 bis WS 1999/2000
Physikum am 27.09.1995 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg / Mannheim
Praktisches Jahr in Houston (USA), Durham (USA), Mannheim
Staatsexamen am 29.05.2000 an der Universität Heidelberg / Mannheim

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Magnus von Knebel Doeberitz

Zusammenfassung:

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Integration von humanen Papillomviren bei der malignen Transformation von Wirtszellen an einer größeren Anzahl klinischer Proben zu untersuchen. Die folgenden Fragen standen im Mittelpunkt:

Ist die Integration von Papillomviren ein gerichteter Vorgang, sind bestimmte Bereiche des Genoms häufiger von Integration betroffen? Wie weit ist die Unterbrechung der zellulären Integrationsregion an der malignen Transformation beteiligt? Kommt es regelhaft zur Insertionsmutagenese durch die virale Integration, so wie es bei bestimmten Retroviren der Fall ist, und wie es in einem Fall für HPV gezeigt werden konnte?

Die Analyse der klinischen Proben erfolgte mit einem RT-PCR Protokoll, bei dem Fusionstranskripte aus viralen und zellulären Sequenzen vermehrt werden. Die Fusionstranskripte wurden kloniert, sequenziert und die zellulären Flanken mit öffentlichen Sequenzdatenbanken verglichen.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal umfassend die HPV-Integration in klinischen Proben untersucht. Insgesamt wurden 69 Fusionstranskripte aus fünf Zelllinien und 64 klinischen Proben identifiziert. Die Transkripte stammten zum größten Teil aus

HPV16-positiven Zervixkarzinomen, aber auch aus dysplastischen Vorstufen und HPV18-positiven Proben. Die Übereinstimmungen der Fusionstranskripte aus den Zelllinien mit publizierten Daten zeigten, dass der verwendete Integrationsnachweis valide Ergebnisse lieferte. Die strukturelle Analyse der Transkripte zeigte in den meisten Fällen das identische Spleißmuster von der viralen E1 Spleißdonorsequenz zu einer zellulären Spleißakzeptorstelle. Nur in einem der acht Transkripte, in denen der Übergang von viraler zu zellulärer Sequenz direkt sequenziert wurde, gab es Überlappungen zwischen viraler und zellulärer Sequenz, ansonsten fanden sich keine Anhaltspunkte für eine homologe Rekombination als Grundlage des Integrationsvorganges.

Die Datenbankanalyse der Fusionstranskripte zeigte eine Identität der zellulären Flanken zu bekannten Genen in 14 Fällen und zu ESTs in 12 Fällen, 17 Flanken hatten Ähnlichkeit mit repetitiven Sequenzen. Das Spektrum der von Integration betroffenen Gene war heterogen, auffällig waren aber viele tumorassoziierte Gene, wie TP63, CEACAM, MYC, FANCC, PTPN13. Es wurden keine identischen Gene in unterschiedlichen Proben identifiziert.

Die Analyse der Integrationsorte zeigte eine Verteilung der integrierten HPV-Genome über das gesamte Genom, zwar gab es größere Regionen, in denen häufiger Integrationen auftraten, allerdings wurde der identische Ort nicht zweimal in unabhängigen Proben getroffen. Die Integrationsorte korrelierten mit induzierbaren fragilen Bereichen des Genoms, sogenannten „fragile sites“. 40 von 57 identifizierten Integrationsregionen enthielten fragile sites. Expressionsanalysen der jeweiligen zellulären Flanken in Zervixkarzinomzelllinien zeigten, dass die von HPV-Integration betroffenen genomischen Bereiche sehr unterschiedlich exprimiert wurden.

Bei einigen Patientinnen konnten mehrfach Fusionstranskripte im zeitlichen Verlauf ihrer Erkrankung amplifiziert werden. Dabei wurden in Primärtumoren, Metastasen und Tumorrezidiven jeweils das identische Fusionstranskript isoliert.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Integration von HPV anfangs ein ungerichteter Prozess ist, bevorzugt werden instabile chromosomale Regionen (fragile sites) und Regionen mit lockerer Chromatinstruktur, in denen Genexpression abläuft, von HPV-Integration getroffen. Ein spezifisches Muster der Onkogenaktivierung oder Tumorsuppressorgeninaktivierung wurde nicht beobachtet. Im Verlaufe der Entwicklung von malignen Läsionen kommt es zur Selektion von Klonen mit Wachstumsvorteilen. Diese Wachstumsvorteile werden hauptsächlich

durch die Stabilisierung der HPV-Onkogenexpression nach Integration vermittelt, vereinzelt können auch Veränderungen des Wirtsgenoms eine Rolle dabei spielen. Eine Insertionsmutagenese im eigentlichen Sinne findet bei der HPV-Integration aber in der Regel nicht statt.

Die Selektion einzelner Klone mit spezifischen Fusionstranskripten ist dennoch so stark ausgeprägt, dass der Integratnachweis einen guten Progressionsmarker für fortgeschrittene anogenitale Läsionen darstellt und auch als patientenspezifischer Tumormarker dienen kann.