

Corina Ziegert  
Dr.sc.hum.

## **Untersuchungen zur klonalen Zusammensetzung Papillomvirus-induzierter anogenitaler Läsionen**

Geboren am 04.10.1974 in Weißenfels  
Reifeprüfung am 30.06.1993 in Weißenfels  
Studiengang der Fachrichtung Biologie (Diplom) vom WS 1993/94 bis SS 1998  
Vordiplom am 17.10.1995 an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Diplom am 30.08.1998 an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Promotionsfach: Pathologie  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. M. von Knebel Doeberitz

Papillomvirus-induzierte Krebsvorläuferläsionen und Karzinome sind das Ergebnis einer Sequenz von Mutations- und Selektionsereignissen, die sich mit einem mehrere Stadien durchlaufenden Karzinogenesemodell beschreiben läßt. In dieser Arbeit sollten die klonale Zusammensetzung hochgradiger zervikaler Krebsvorläuferläsionen und invasiver Zervixkarzinome bestimmt und Selektionsparameter bei der malignen Progression näher charakterisiert werden. Hierbei wurden insbesondere folgende Fragestellungen bearbeitet:

Stammt die fortgeschrittene HPV-induzierte Läsion von einer oder mehreren Stammzellen ab? Erfolgt im Verlauf der Progression die Selektion eines oder mehrerer neoplastischer Klone? Führt der Verlust der genomischen Integrität zur Selektion von Klonen mit multiplen oder singulären Integrationsereignissen und welche Rekombinationsmerkmale lassen sich beobachten? Welche Rolle spielt die aktive Transkription integrierter HPV-Sequenzen beim Übergang vom Carcinoma in situ zum invasiven Zervixkarzinom?

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit ein RT-PCR Protokoll zur Amplifikation viraler integratabgeleiteter Onkogentranskripte und eine ligationsvermittelte PCR zur Amplifikation der viralen Integrationsstellen im Humangenom an HPV-induzierten, hochgradig prämaligen und invasiven Läsionen eingesetzt. Die viralzellulären Fusionstranskripte bzw. genomischen viral-zellulären Sequenzübergänge wurden in mikrodisszierten Gewebsarealen als Klonalitätsmarker verwendet, um den klonalen Status von 4 Carcinoma in situ-Proben, 9 Zervixkarzinom-Proben und einer Lymphknotenmetastase zu bestimmen. Außerdem wurde eine umfassende, vergleichende Analyse der viralen Integrationsstelle und des integratabgeleiteten Fusionstranskriptes an 5 Carcinoma in situ-Proben, 25 invasiven Zervixkarzinomen und 2 Vaginalkarzinomen durchgeführt.

Die Klonalitätsuntersuchungen zeigten Monoklonalität in 3 von 4 Carcinoma in situ-Proben und 8 von 9 Zervixkarzinomen. Im polyklonalen Zervixkarzinom war – anders als im polyklonalen Carcinoma in situ – ein Klon stark dominant. Die zu dem polyklonalen Zervixkarzinom korrespondierende Lymphknotenmetastase war monoklonal und bestand aus dem Klon, der schon im Primärtumor dominierte. Zwei adenosquamöse Läsionen zeigten eine monoklonale Zusammensetzung von Platten- und Drüsenepithelkomponente. Diese Beobachtungen unterstützen generell ein Modell der zervikalen Karzinogenese, welches auf der natürlichen Auslese fitter Klone mit hohem Progressionspotential nach Vorbild des Darwin'schen Selektionsmodells beruht. Dabei scheint sich meist schon im Carcinoma in situ-Stadium ein einzelner Klon etabliert zu haben, welcher eine optimierte Kombination von Merkmalen in sich vereint, die ihm die Fähigkeit verleiht, zum Tumor auszuwachsen.

Eine retrospektive Klonalitätsanalyse zeigte einen klonalen Zusammenhang zwischen einem Primärtumor an der Zervix und einem sechs Jahre später auftretenden Vulvakarzinom und

schloß damit eine unabhängige maligne Veränderung der Vulva aus. Dies unterstreicht die Eignung der viralen Integrationsstelle als patientenspezifischer Tumormarker bei rezidivierenden HPV-assoziierten Läsionen.

Die in dieser Arbeit detektierten Integrationsstellen waren hochgradig probenspezifisch und unterschieden sich von bisher veröffentlichten Integrationsstellen klinischer Proben. Alle betroffenen Läsionen zeigten singuläre Integrationsloci. Die Mehrheit der Integrate stammte aus transkriptional aktiven chromosomalen Bereichen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß während der HPV-vermittelten Karzinogenese nur solche neoplastischen Zellklone selektiert werden, die einer begrenzten Anzahl von Rekombinationsereignissen ausgesetzt waren. Die hauptsächliche Funktion der viralen Integration besteht dabei in der Stabilisierung der viralen Onkogenexpression auf einem bestimmten optimierten Niveau. Die zufällige, ungerichtete Inaktivierung kritischer zellulärer Gene nach dem Prinzip der Insertionsmutagenese spielt bei der HPV-vermittelten Tumorgenese nur eine Nebenrolle. Ein hier beobachteter Mechanismus der nichthomologen Rekombination erleichtert wahrscheinlich durch kurze überlappende Sequenzbereiche die virale Integration in das Humangenom.

Bei den integratabgeleiteten Fusionstranskripten wurde kein reguläres Spleißmuster beobachtet. Die Verwendung der nächstgelegenen 3'-Spleißstelle eines Exons scheint jedoch in einigen Fällen ein bevorzugter Spleißmechanismus zu sein.

Eine von drei Carcinoma in situ-Proben und 17 von 21 Karzinom-Proben mit integrierten HPV-Sequenzen wiesen integratabgeleitete Transkripte auf. Damit konnte eine Selektion aktiv transkribierender Klone bei der Progression vom prämaligen Vorläuferstadium ins invasive Tumorstadium gezeigt werden.

Diese Ergebnisse unterstreichen insgesamt die Bedeutung der Transkription integrierter HPV-Sequenzen während der neoplastischen Zelltransformation und zeigen, daß individuelle Integrationsstellen zur Verbesserung des Therapiemanagements und zur Verlaufskontrolle von klinischer Bedeutung sein können.