

Theresa Christina Obermüller  
Dr. med.

## **Die ätiologische Relevanz der humanen Papillomaviren beim Analkarzinom und ihre klinische und prognostische Bedeutung**

Fach/Einrichtung: Pathologie

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

Es wird gegenwärtig angenommen, dass Hoch-Risiko humane Papillomaviren (HR-HPV) eine kausale Rolle bei der Entstehung von analen Plattenepithelkarzinomen (ASCC) spielen. HR-HPV DNA und das zelluläre Protein p16<sup>INK4A</sup> wurden in früheren Studien in einem großen Teil von ASCC detektiert. In Analogie zu HPV-getriebenen Karzinomen in anderen Lokalisationen (z.B. an der Zervix, dem Oropharynx) wurde angenommen, dass dieser Anteil der ASCC ursächlich HPV-getrieben ist. Bei transformierenden HR-HPV-Infektion wird das zelluläre Protein p16<sup>INK4A</sup> extensiv exprimiert. Daher wird p16<sup>INK4A</sup> sowie HR-HPV DNA als Surrogatmarker eines HPV-getriebenen Karzinoms verwendet. Jedoch konnten bereits Beide in HPV-unabhängigen Karzinomen nachgewiesen werden. Das Gesamtüberleben von Patienten mit einem ASCC wurde in der Vergangenheit in Abhängigkeit von p16<sup>INK4A</sup> und/oder HR-HPV DNA untersucht. Heterogene Überlebensanalysen zwischen den Studien und den Surrogatmarkern haben bis dato die prognostische Aussagekraft von p16<sup>INK4A</sup> und HR-HPV DNA beim ASCC eingeschränkt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde an 78 ASCC untersucht, welcher Anteil kausal durch HR-HPV 16 getrieben ist. Basierend darauf wurde die diagnostische Aussagekraft von HPV 16 DNA und p16<sup>INK4A</sup> für die Identifikation eines HPV 16-getriebenen ASCC untersucht. Das gespleißte HPV 16-Onkogentranskript E6\*I mRNA wurde mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion als Goldstandard für den Nachweis eines kausal HPV 16-getriebenen Tumors untersucht. Der Nachweis von HPV 16 E6\*I mRNA zeigte, dass 79,5 % aller ASCC in der untersuchten Kohorte HPV 16-getrieben waren. Im nächsten Schritt wurde die diagnostische Aussagekraft von HPV 16 DNA und p16<sup>INK4A</sup> für den Nachweis einer transformierenden HPV-Infektion (Goldstandard: E6\*I mRNA-Status) analysiert. HPV 16 DNA wurde in 100 % der HPV 16-getriebenen ASCC nachgewiesen. Die Spezifität von HPV 16 DNA für den Nachweis einer transformierenden HPV-Infektion war moderat (81,3%). Da p16<sup>INK4A</sup> in verschiedenen Studien unterschiedlich ausgewertet wurde, erfolgte eine Analyse der diagnostischen Aussagekraft basierend auf verschiedenen Auswerteparametern, um den geeignetsten diagnostischen Auswerteparameter zu detektieren. Ein Nachweis von  $\geq 50$  % p16<sup>INK4A</sup>-gefärbter Tumorzellen beim ASCC identifizierte ein HPV-getriebenes ASCC mit

exzellenter Sensitivität (98,4 %) und moderater Spezifität (75,0 %). Die Spezifität deutet an, dass p16<sup>INK4A</sup> auch im ASCC unabhängig von einer transformierenden HPV-Infektion überexprimiert wird. Die kombinierte Analyse von HPV 16 DNA und p16<sup>INK4A</sup> (≥50 % der Tumorzellen p16<sup>INK4A</sup>-gefärbt) detektiert ein HPV-getriebenes ASCC mit exzellenter Sensitivität (98,4 %) und sehr guter Spezifität (93,8 %).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die prognostische Bedeutung von E6\*I mRNA, p16<sup>INK4A</sup>, HPV 16 DNA und klinischen Parametern in Patienten mit ASCC untersucht. Unabhängig vom Auswertungskriterium konnte kein Unterschied beim Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p16<sup>INK4A</sup>-Status identifiziert werden. Bezogen auf das progressionsfreie Überleben konnten statistisch signifikante Unterschiede detektiert werden ( $p < 0,05$ ). Patienten mit einem HPV 16 DNA-positivem ASCC hatten ein statistisch signifikantes ( $p < 0,05$ ) besseres Gesamt- und progressionsfreies Überleben als Patienten mit einem HR-HPV DNA-negativen ASCC. Es wurde ein Unterschied im progressionsfreien Überleben von Patienten mit einem HPV 16-getriebenen (E6\*I mRNA-positiv) ASCC im Vergleich zu einem HPV-unabhängigen ASCC beobachtet ( $p < 0,05$ ). Beim Gesamtüberleben zeigte sich ein tendenzieller, statistisch nicht signifikanter ( $p = 0,05$ ) Unterschied zwischen Patienten mit einem HPV-getriebenen und einem HPV-unabhängigen ASCC. In den multivariaten Überlebensanalysen (Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben) war nur das UICC-Stadium ein unabhängiger statistischer prognostischer Faktor. Somit sollten die Ergebnisse in einer größeren Kohorte bestätigt werden, um eine Therapieescalation oder -Escalation beim ASCC basierend auf dem HPV-Status (E6\*I mRNA, HPV DNA, p16<sup>INK4A</sup>) zukünftig zu erwägen.

Im dritten Teil der Arbeit wurde der prognostische Wert von HR-HPV DNA und p16<sup>INK4A</sup> in einem systematischen Review mit konsekutiver Metaanalyse auf der Basis individueller Patientendaten weiter objektiviert. Mittels eines definierten Suchterminus wurden 182 Manuskripte bei Pubmed NCBI identifiziert, von denen nach Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien und Erhalt der individuellen Patientendaten sieben Studien in die finalen Analysen eingeschlossen wurden. In der durchgeführten Meta-Analyse zeigte sich, dass Patienten mit einem p16<sup>INK4A</sup>-positiven ASCC ein besseres Überleben als Patienten mit einem p16<sup>INK4A</sup>-negativen ASCC (Hazard Ratio (HR)=0,4) aufwiesen. Hierbei sind die heterogenen p16<sup>INK4A</sup>-Definitionen zwischen den Studien zu berücksichtigen. Patienten mit einem HR-HPV DNA-positiven ASCC überlebten länger als Patienten mit einem HR-HPV DNA-negativen ASCC (HR=0,4). Das beste Überleben hatten Patienten mit einem simultan p16<sup>INK4A</sup>- und HR-HPV DNA-positiven (indikativ für einen ursächlich HPV-getriebenen Tumor) Status (HR=0,4). Bei den Patienten mit einem diskrepanten Marker-Status zeigten

Patienten mit einem p16<sup>INK4A</sup>-positiven und HR-HPV DNA-negativen ASCC ein schlechteres Überleben (HR=1,1). Daraus folgt, dass eine therapeutische Entscheidung alleinig basierend auf dem p16<sup>INK4A</sup>-Status oder dem HR-HPV DNA-Status nicht zu empfehlen ist.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass ein kleinerer Anteil der ASCC, als durch den alleinigen Nachweis von HR-HPV DNA und p16<sup>INK4A</sup> angenommen, HPV 16-getrieben ist. Die Ergebnisse legen weiterhin nahe, dass ein HPV 16-getriebenes ASCC mit hoher Sensitivität und Spezifität durch den gleichzeitigen Nachweis von HR-HPV DNA und p16<sup>INK4a</sup> detektiert werden kann. Darüber hinaus werden die Stärken und Schwächen beider Surrogatmarker bezogen auf ihren prognostischen Wert dargelegt und ein geeignetes Verfahren in Form des kombinierten Nachweises von p16<sup>INK4A</sup> und HR-HPV DNA vorgeschlagen.