

Bouchra Tawk  
Dr. med

## **DNA-Methylation based Classification of the Human Papilloma Virus Driven Head and Neck Squamous Cell Carcinoma**

Fach/Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Debus

Bei Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals ist das Humane Papilloma Virus (HPV) ein wichtiger ätiologischer Faktor. So ist es an der Entstehung von knapp die Hälfte der oropharyngealen Tumore und ca. 5% der Tumore außerhalb des Oropharynx beteiligt, tendenz steigend. Patienten mit HPV-positiven Tumoren haben nach Therapie ein prognostisch günstiges Gesamtüberleben. Diese Beobachtung hat zu klinischen Studien geführt, die eine Reduktion „Deeskalation“ der Therapie zum Ziel haben. Daher ist die exakte Diagnose eines HPV-assoziierten Tumors entscheidend für die Stratifizierung des Patientenrisikos. Das College der American Pathologists empfiehlt die Verwendung der p16 Immunhistochemie (p16-IHC) mit oder ohne direkten Test auf HPV-DNA zur Klassifizierung von oropharyngealen Tumoren. Für Tumore außerhalb des Oropharynx wird derzeit kein HPV-Test empfohlen.

In Deutschland hat das Deutsche Konsortium für Translationale Krebsforschung RadioOnkologie Gruppe (DKTK-ROG) über den prognostischen Nutzen von p16-IHC- und HPV-DNA-Tests berichtet. Dennoch können diagnostische Herausforderungen entstehen, wenn der Tumor für einen Test positiv und für den anderen negativ ist (z.B. p16-IHC+ und HPV-DNA- oder umgekehrt). Randomisierte klinische Studien (wie die European Cooperative Oncology Group Studie 1308) haben in dieser Population intermediäre Überlebensraten im Vergleich zu Patienten berichtet, bei denen die Testergebnisse für HPV-DNA und p16-IHC-Tumore übereinstimmen (doppelt positiv oder doppelt negativ). Darüber hinaus weist p16-IHC bei Tumoren außerhalb des Oropharynx eine geringe Spezifität auf und die Prognose eines HPV-assoziierten Tumors ist aufgrund widersprüchlicher Studienberichte unklar.

Diese Arbeit zielte darauf ab, diese Einschränkungen zu überwinden, indem sie einen robusten und Untersucher unabhängigen DNA-Methylom basierten Klassifikator (HPV-M) entwickelte. HPV-M besteht aus 24 wichtigsten CpG-Sites, welcher mit Hilfe von random forest, einem maschinellen Lernalgorithmus, identifiziert wurde. Dieser Klassifikator wurde in einer großen Kohorte von Patienten mit homogener Behandlung und gut dokumentierten klinischen Daten validiert. Der HPV-M-Klassifikators zeigte hoher Sensitivität und Spezifität für Identifikation von HPV-assoziierten Tumoren aus verschiedene anatomische Lokalisationen. Als Trainingskohorte diente die retrospektive DKTK-ROG-Kohorte mit 194 Patienten, die operiert und postoperativ eine Cisplatin basierte Radiochemotherapie erhielten. Die Validierung erfolgte in zwei retrospektiven Kohorten, darunter eine DKTK-ROG-Kohorte von 110 Patienten, die mit primärer Radiochemotherapie behandelt wurden, und eine Validierungskohorte von 222 Patienten aus Heidelberg, Dresden und München, die mit

postoperativer oder primärer Radiochemotherapie behandelt wurden. Für alle Patienten standen detaillierte demographische, behandlungs- und nachsorgebezogene Informationen zur Verfügung. Der HPV-DNA-Status, der durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt wurde, und der p16-IHC-Status waren für insgesamt 522 (99,2%) Tumore verfügbar. Genomische DNA aus Patientengewebe wurde für die Methylierungsanalyse mit zwei Microarray-Plattformen (Infinium Human Methylation 450K Arrays und Infinium Methylation EPIC) verwendet. Zusätzlich wurden Methylierungsdaten aus dem amerikanischen „The Cancer Genome Atlas, TCGA“ (n=206) zur externen Validierung des HPV-M-Klassifikators untersucht. Die genexpressionsbasierte Abschätzung der Immunzellinfiltration und der Tumorphoxie wurde mit RNAseq-Daten aus derselben Kohorte durchgeführt. So konnte der HPV-M-Klassifikator in Verbindung mit diesen etablierten molekularen Modulatoren des Behandlungserfolgs bei Kopf- und Halstumoren evaluiert werden.

Innerhalb aller Kohorten war HPV-M ein prognostischer Marker für das Risiko eines Lokalrezidivs (Hazard Ratio im Bereich 0,11-0,19), der Krankheitsprogression (0,16-0,29) und des Gesamtüberleben (0,19-0,42) ( $p < 0,05$ ), unabhängig von der anatomischen Lage und nach Anpassung an die multivariate Regressionsanalyse. Unabhängig von der anatomischen Lokalisation war der HPV-M Test hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen prädiktiven Wert in Tumoren, die sowohl HPV-DNA PCR+ als auch p16-IHC+ waren, den beiden eigenständigen Tests (HPV-DNA und p16 IHC) überlegen.

Somit dient der HPVM Klassifikator als prognostische test für die Tumoren die innerhalb und außerhalb des Oropharynxes entstehen. Zudem, konnte HPVM bei Patienten mit diskordanten Tumoren (HPVDNA+ und p16-IHC- oder HPVDNA- und p16-IHC+) eine besonders wichtige Rolle spielen. Demgegenüber p16-IHC und HPVDNA PCR, könnte nur HPVM eine statistisch signifikante Differenz in gesamter Überleben nach Radiochemotherapie in dieser Gruppe zu prognostizieren ( $p < 0,02$ ).