

Martin Simon Kalteis

Dr. med.

Methylation of Human Papillomavirus Type 16 Upstream Regulatory Region E2 Binding Sites 3 and 4 in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Primary Tumors with Matched Metastases in Relation to Patients' Clinical Parameters

Fach/Einrichtung: Pathologie

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

Der kausale Zusammenhang zwischen einer Infektion mit humanen Papillomaviren und Krebserkrankungen im Anogenitalbereich, speziell an der Cervix uteri, ist seit der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts bekannt und gut erforscht. Dagegen hat sich die Erkenntnis, dass auch Krebserkrankungen im Kopf-Hals-Bereich, speziell im Oropharynx, mit humanen Papillomaviren assoziiert werden können, erst im letzten Jahrzehnt durchgesetzt. Das Oropharynxkarzinom wurde lange Zeit als durch die „klassischen“ Risikofaktoren Tabak- und Alkoholkonsum verursacht angesehen, jedoch ist die Prävalenz des durch humane Papillomaviren bedingten Oropharynxkarzinoms in den westlichen Industrienationen im Steigen begriffen und wird voraussichtlich in naher Zukunft die des Cervixkarzinoms überholt haben.

Der Prozess der Karzinogenese in durch humane Papillomaviren bedingten Neoplasien ist durch die Überexpression der viralen Onkogene E6 und E7 gekennzeichnet. Sie beeinflusst unter anderem die Zellzykluskontrolle in infizierten Zellen und führt so zu unkontrolliertem Zellwachstum. In nicht-transformierten Zellen unterliegt die Expression von E6 und E7 einer Regulation durch negative Rückkopplung vermittelt durch das virale E2-Protein, welches in der Zelle exprimiert wird. E2 bindet an definierte Bindungsstellen in der viralen Upstream Regulatory Region und verändert dadurch die Aktivität des p97-Promotors, welcher die Expression der Onkogene kontrolliert. Es wird vermutet, dass der „klassische“ Mechanismus der Krebsentstehung in infizierten Zellen auf einem Verlust von funktionalem E2-Protein beruht, der das Ergebnis einer Zerstörung des Leserasters des viralen E2 Gens im Rahmen der Integration des viralen Genoms in das der Wirtszelle ist. Jedoch wurde in anogenitalen und oropharyngealen Tumoren in nicht unerheblichem Maß virale DNA mit intaktem E2 Gen nachgewiesen. Dies führte zu der Annahme, dass es einen alternativen Mechanismus auf epigenetischer Basis geben könnte, bei dem durch die Methylierung von Cytosin-Nukleotiden in den E2-Bindungsstellen, sogenannten CpGs, die Interaktion und damit der regulatorische Einfluss von E2 auf die Promotortätigkeit verhindert wird und somit trotz des Vorhandenseins von funktionsfähigem E2-Protein die unregelte Überexpression der viralen Onkogene erfolgen kann.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist wenig über die epigenetischen Regulationsmechanismen in durch humane Papillomaviren vom Typ 16 verursachten Oropharynxkarzinomen bekannt. Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Methylierung der viralen E2-Bindungsstellen 3 und 4 und dem Integrationsstatus des Virus in Oropharynxkarzinomen. In einer Arbeit wurde ein Trend hin zu schlechterem Überleben in der Patientengruppe gefunden, deren Tumore virale E2-Bindungsstellen mit einem hohen Methylierungsgrad aufwiesen. Insgesamt wird angenommen, dass viral bedingte gegenüber den mit klassischen Noxen assoziierten Oropharynxkarzinomen ein besseres klinisches Outcome aufweisen – falls sich diese Gruppe jedoch methylierungsabhängig heterogen im Bezug z.B. auf das Überleben verhält müsste dies im Rahmen der aktuell diskutierten Bemühungen um eine Reduzierung der Behandlungsintensität in viral bedingten Oropharynxkarzinomen berücksichtigt werden.

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war die Untersuchung der Methylierung in den viralen E2-Bindungsstellen 3 und 4 mittels Pyrosequenzierung von Bisulfit-konvertierter DNA in einer Patientenkohorte mit durch humanem Papillomavirus vom Typ 16 verursachten Oropharynxkarzinom in Primärtumorproben und in einer Subgruppe, in der zusätzlich Proben von assoziierten Lymphknotenmetastasen zum jeweiligen Primarius vorlagen. Die gewonnenen Daten wurden auf Beziehungen zu klinischen Parametern hin untersucht. In der aus Primarien und gepaarten Metastasen bestehenden Subgruppe wurden Unterschiede im Methylierungsgrad, das Vorliegen eines zerstörten Leserasters des viralen E2-Gens sowie die Methylierung eines Abschnitts des LINE-1-Retrotransposons als Surrogatparameter für die Gesamtmethylierung des humanen Wirtszellgenoms analysiert.

In 49 von 106 Primärtumorproben (54.7 %) handelte es sich um ein virus-assoziiertes Karzinom, für 41 Proben lagen Sequenzierungsdaten vor. Es zeigte sich eine bimodale Verteilung der medianen E2-Bindungsstellenmethylierung, die sich in zwei Gruppen von niedrigem und hohem Methylierungsgrad aufteilen ließ. Tumorproben mit hohem Methylierungsgrad waren signifikant mit dem Vorliegen einer basaloiden Histomorphologie vergesellschaftet ($p=.041$); die Patienten in dieser Gruppe zeigten ein signifikant schlechteres progressionsfreies- ($p=0.34$) und Gesamtüberleben ($p=.03$).

Im Vergleich zu Primarien zeigten Proben aus Lymphknotenmetastasen niedrigere E2-Bindungsstellenmethylierung; der Unterschied war in einem von fünf CpGs statistisch signifikant ($p=.022$). Es wurde kein Bezug zwischen Methylierung und der Integrität des E2-Leserasters gefunden. Der Methylierungsgrad der viralen E2-Bindungsstellen war von der anhand des LINE-1-Retrotransposon bestimmten Gesamtmethylierung des humanen Genoms unabhängig.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse suggerieren, dass durch humane Papillomaviren induzierte Oropharynxkarzinome im Bezug auf ihr klinisches Outcome keine homogene Gruppe sind.

Der Methylierungsgrad der viralen E2-Bindungsstellen 3 und 4 könnte als Biomarker zur Therapiestratifizierung herangezogen werden.

Die im Vergleich zum Wirtsgenom unterschiedliche Methylierung der viralen E2-Bindungsstellen 3 und 4 könnte durch einen spezifischen Mechanismus zur Regulation der viralen Onkogenregulation bedingt sein und suggeriert eine funktionelle Bedeutung der Methylierung der viralen E2-Bindungsstellen im Rahmen der virusbedingten Krebsentstehung und Metastasierung im Oropharynx.