

UČINEK HPV NA SENZORJE DNA V CELIČNIH LINIJAH PLOŠČATOCELIČNEGA KARCINOMA ŽRELA

Kristina Levpušček^{1,2}, Tanja Jesenko^{1,2}, Gregor Serša^{1,3}, Maja Čemažar^{1,4}, Primož Strojani^{2,5}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

⁵ Oddelek za teleradioterapijo, Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: klevpuscek@onko-i.si

Izvleček

Ploščatocelični karcinom orofarinksa (PKO), povzročen s humanim virusom papiloma 16 (HPV16), se bolje odziva na ionizirajoče sevanje kot s HPV16 nepovezani ploščatocelični karcinomi drugih delov žrela (PKŽ). Onkoproteina HPV16 E6 in E7 zavirata delovanje nekaterih citosolnih senzorjev DNA, katerih aktivacija vodi v prepisovanje citokinov in posledično aktivacijo imunskega sistema. Namen študije je bil raziskati vpliv ionizirajočega sevanja na aktivacijo molekularnih poti zaznavanja DNA pri PKŽ z različnim statusom HPV16. Z metodo qRT-PCR smo določili izražanje senzorjev DNA in citokinov štirih humanih celičnih linij PKŽ po obsevanju. Preliminarni rezultati so pokazali, da je izražanje citosolnih senzorjev DNA in citokinov časovno ter dozno odvisno. Opazili smo tudi razlike v izražanju glede na status HPV16. Nadaljnje *in vivo* študije so potrebne za ovrednotenje povezave med aktivacijo molekularnih poti zaznavanja in imunskim odzivom s HPV16 povezanim PKO po obsevanju.

Ključne besede: Humani virus papiloma, ploščatocelični karcinom žrela, senzorji DNA, obsevanje.

Uvod

Raki glave in vratu so heterogena skupina malignih bolezni, kamor spada tudi ploščatocelični karcinom žrela. Slednje razvrščamo po mestu vznika na tumorje nazofarinksa, orofarinksa (PKO) in hipofarinksa (PKH). Eden izmed dejavnikov tveganja za nastanek PKO je okužba s humanim virusom papiloma (HPV16), ki z onkoproteinoma E6 in E7 vpliva na regulacijo celičnega cikla, kar lahko privede do maligne transformacije okuženih celic (1, 2). Raziskave so pokazale, da je s HPV16 povezan PKO biološka in klinična entiteta, ki se od preostalih tumorjev žrela razlikuje predvsem v občutljivosti na ionizirajoče sevanje (3). Slednje namreč povzroča sproščanje DNA v citosol tumorskih celic, kar privede do aktivacije citosolnih senzorjev DNA, receptorjev za prepoznavo molekularnih vzorcev (4). Aktivirana molekularna pot sproži prepisovanje vnetnih citokinov, predvsem interferonov tipa I (IFN I), ki v nadaljevanju sprožijo imunski odziv. Predklinične študije so pokazale, da se HPV16 izogne imunskemu sistemu tudi preko zaviranja nekaterih citosolnih senzorjev DNA, predvsem z retinojsko kislino inducirane gena I (RIG-I) in ciklično gvanozin monofosfat-adenozin monofosfat sintazo (cGAS) (5, 6). V nasprotju s pričakovanji ima s HPV16

povezan PKO burnejši imunski odziv na ionizirajoče sevanje kot s HPV nepovezani PKŽ, navkljub zavrtju molekularnih poti zaznavanja DNA (7). Namen študije je bil raziskati aktivacijo poti zaznavanja DNA kot odziv na obsevanje v s HPV16 povezanimi in s HPV16 nepovezanimi celičnimi linijami PKŽ.

Materiali in metode

Pri raziskavi smo uporabili štiri humane celične linije PKŽ, natančneje dve celični liniji PKO (UM-SCC-6 in UPCI: SCC090) in dve celični liniji PKH (FaDu in 2A3). Status HPV16 smo določili na *in vitro* ravni z izražanjem onkoproteinov HPV16 E6 in E7. Radiosenzitivnost celic smo določili s testom viabilnosti PrestoBlue po štirih celičnih delitvah, saj nekatere izbrane celične linije ne tvorijo kolonij. Za določanje izražanja senzorjev DNA in citokinov smo celične linije obsevali z različnimi enkratnimi odmerki (0, 4 in 8 Gy). Po 24 in 48 urah smo izolirali mRNA in jo kasneje prepisali v cDNA. Z metodo qRT-PCR smo določili časovni potek izražanja senzorjev DNA (cGAS, STING, RIG-I, DAI, IFI16, DDX60) ter citokinov (IFN γ , TNF α , IL1 β).

Rezultati

Opazili smo značilno razliko v radiosenzitivnosti med s HPV16 povezano in s HPV16 nepovezano celično linijo PKO. Povečano izražanje senzorjev DNA in citokinov po obsevanju je bilo časovno in dozno odvisno. Izražanje senzorjev DNA DAI in RIG-I po obsevanju je bilo statistično povečano samo v s HPV16 nepovezanimi celičnimi linijami PKŽ. Izražanje citokinov IFN γ in IL1 β je bilo prav tako statistično povečano le v s HPV16 nepovezanimi celičnimi linijami PKŽ. Izražanje senzorjev DNA in citokinov je bilo večje pri s HPV16 povezano celično linijo 2A3 v primerjavi s HPV16 povezano celično linijo UPCI: SCC090. Pri slednji smo zaznali višjo raven izražanja mRNA onkoproteinov E6 in E7.

Razprava

Klinične smernice priporočajo zdravljenje bolnikov s PKŽ s frakcioniranim obsevanjem z nizkimi dnevnimi dozami (1,8-2 Gy) do skupne doze 66-70 Gy, z ali brez sočasne kemoterapije, ne glede na status HPV16. Namen naše študije je bil raziskati aktivacijo poti zaznavanja DNA kot odziv na obsevanje v povezavi s HPV16 okužbo. Rezultati na celičnih kulturah so pokazali, da se senzori DNA in citokini po obsevanju povišano izražajo le v s HPV16 nepovezanimi celičnimi linijami PKŽ, medtem ko v s HPV16 povezanima celičnima linijama PKŽ ostajajo zavrti. Na izražanje pomembno vpliva tudi doza in čas, ki preteče po obsevanju. Razumevanje časa aktivacije teh poti, bi lahko izboljšalo sheme zdravljenja z radioterapijo. Potrebne so nadaljnje *in vivo* študije za ovrednotenje povezave med signalnimi potmi zaznavanja DNA in imunskim odzivom PKŽ z različnim statusom HPV16 po obsevanju.

Zahvala

Zahvaljujem se svojim sodelavcem Oddelka za eksperimentalno onkologijo za njihovo pomoč, ter finančni podpori Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (P3-0003, P3-0307 ter Program usposabljanja mladih raziskovalcev).

Literatura

1. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, et al. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med* 2018; 7(9): 241.
2. Faraji F, Zaidi M, Fakhry C, et al. Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Microb Infect* 2017; 19(9-10): 464-75.
3. Mirghani H, Amen F, Tao Y, et al. Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives. *Cancer Treat Rev* 2015; 41(10): 844-52.
4. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun* 2017; 8(1): 15618.
5. Shaikh MH, Bortnik V, McMillan NA, et al. cGAS-STING responses are dampened in high-risk HPV type 16 positive head and neck squamous cell carcinoma cells. *Microb Pathog* 2019; 132: 162-5.
6. Chiang C, Pauli E-K, Biryukov J, et al. The human papillomavirus E6 oncoprotein targets USP15 and TRIM25 to suppress RIG-I-mediated innate immune signaling. *J Virol* 2017; 92 (6).
7. Wondergem NE, Nauta IH, Muijlwijk T, et al. The immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma: on subsets and subsites. *Curr Oncol Rep* 2020; 22(8): 1-14.

