



Projektbericht PR 2024-08

Lebenszyklus und Pathomechanismen des Equinen Papillomavirus Typ 2

Projektleitung

med. vet. Nadine Werlen, Doktorandin

Virologisches Institut, Vetsuisse Fakultät Universität Zürich

Hintergrund/Ausgangslage

Das Equine Papillomavirus Typ 2 (EcPV-2) ist mit der Entstehung genitaler Läsionen bei natürlich infizierten Pferden assoziiert. Die Läsionen können von benignen präkanzerösen Läsionen bis hin zu invasiven Plattenepithelkarzinomen (PEK) reichen. Trotz der klinischen Relevanz sind die molekularen Pathomechanismen weitgehend unbekannt.

Ziel der Studie

Ziel dieser Arbeit war es, die Veränderungen in der Genexpression einzelner Hautschichten während der Krankheitsprogression zu charakterisieren. Dabei lag der Fokus auf der Identifizierung von Genen, die für die maligne Transformation und Progression relevant sind.

Klinische Relevanz

Aktuell verfügbare Therapieoptionen sind begrenzt und invasiv. Mit der Identifizierung krankheitsstadiumspezifischer Markergene und relevanter Signalwege konnten wir konkrete Ansatzpunkte für eine verbesserte Diagnostik und Therapie schaffen. Die im Rahmen dieses Projektes identifizierten potenziellen Biomarker werden wir nun in einem nächsten Schritt validieren.

Bisherige Ergebnisse

Wir untersuchten genitales FFPE-Gewebe (formalinfixiert, paraffineingebettet) von neun männlichen Pferden (jeweils drei je Gruppe: gesund, präkanzerös, kanzerös). Mithilfe der Laser-Capture-Mikrodissektion konnten wir die verschiedenen Hautschichten (Dermis, Basalschicht, Stachelzellschicht, Körnerschicht) isolieren. Nach RNA-Extraktion erfolgte die RNA-Sequenzierung und bioinformatische (R) Auswertung der Daten.

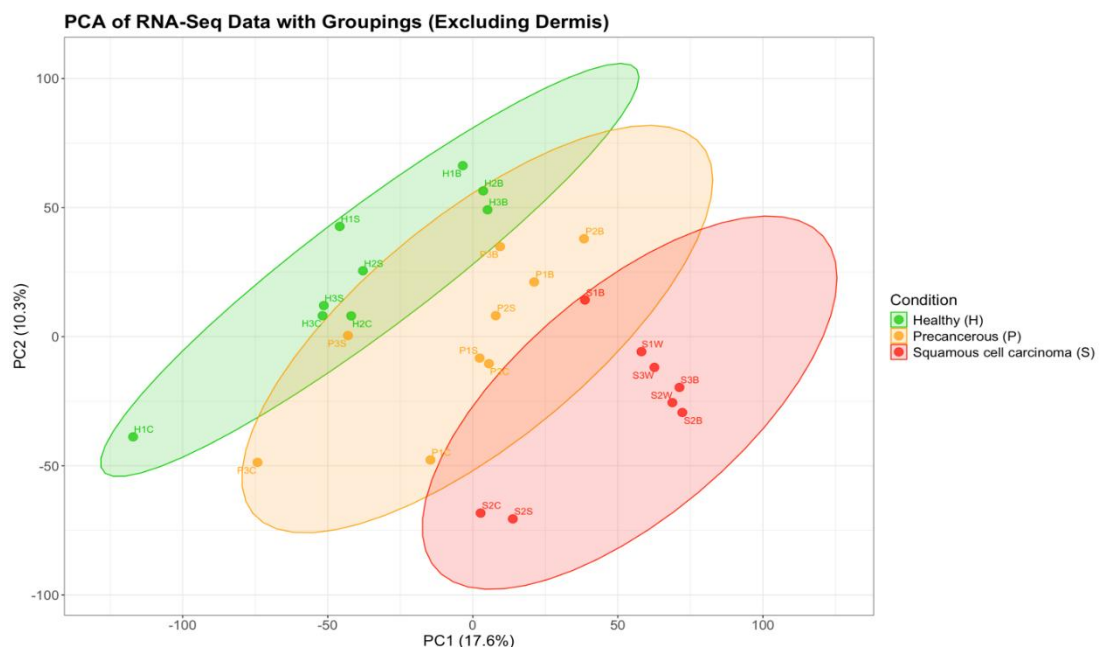


Abb 1: PCA-Diagramm, das Transkriptomprofile aus drei Hautschichten (Basalzellschicht «B», Stachelzellschicht «S», Hornschicht «C») sowie gepoolten Proben

die alle Schichten umfassen. Unterschieden wird auch zwischen den Stadien (gesunden Proben (Kreise), präkanzeröse Proben (Dreiecke) und Plattenepithelkarzinom Proben (Quadrate)). Die PCA enthält überlagerte 95 %-Konfidenzellipsen, um Clustermuster hervorzuheben.

Die Hauptkomponentenanalyse widerspiegelte die kontinuierliche Krankheitsprogression: gesunde Kontrollproben gruppieren sich eng zusammen und wiesen eine hohe molekulare Stabilität auf. Präkanzeröse Läsionen wiesen eine mittlere Position auf, während Proben von Plattenepithelkarzinomen eine ausgeprägte Variabilität sowie eine zunehmende Distanz zum gesunden Gewebe aufwiesen. Diese Beobachtung stützt die Hypothese einer systematischen molekularen Transformation während der Tumorentstehung.

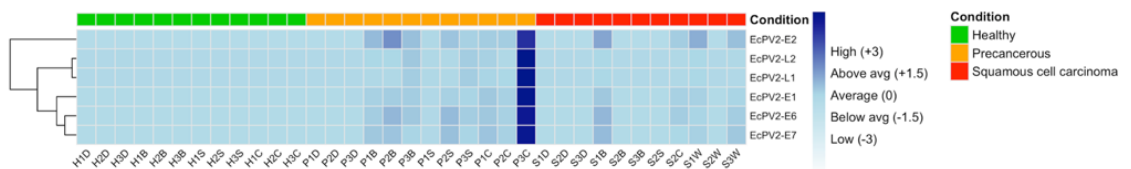


Abb. 2: Wärmekarte der Expression der EcPV-2-Virustranskripte (E1, E2, E6, E7, L1, L2) unter verschiedenen Krankheitsbedingungen (grün = gesund, orange = präkanzerös, rot = PEK) sowie in verschiedenen Hautschichten (D = Dermis, B = Basalschicht, S = Stachelzellschicht, C = Körnerschicht)

Die Analyse der viralen Genexpression zeigte bereits in präkanzerösen Läsionen eine massive Aktivierung der viralen Maschinerie, die sich in einer starken Hochregulation aller EcPV-2-Gene äußert. Die späten Kapsid Gene L1 und L2 erreichen speziell während des präkanzerösen Stadiums ihre maximale Expression. Die späten Kapsidgene werden im PEK jedoch in geringerer Masse exprimiert. Dies deutet auf einen Übergang vom produktiven zum abortiven (nicht-produktiven) Viruszyklus hin.

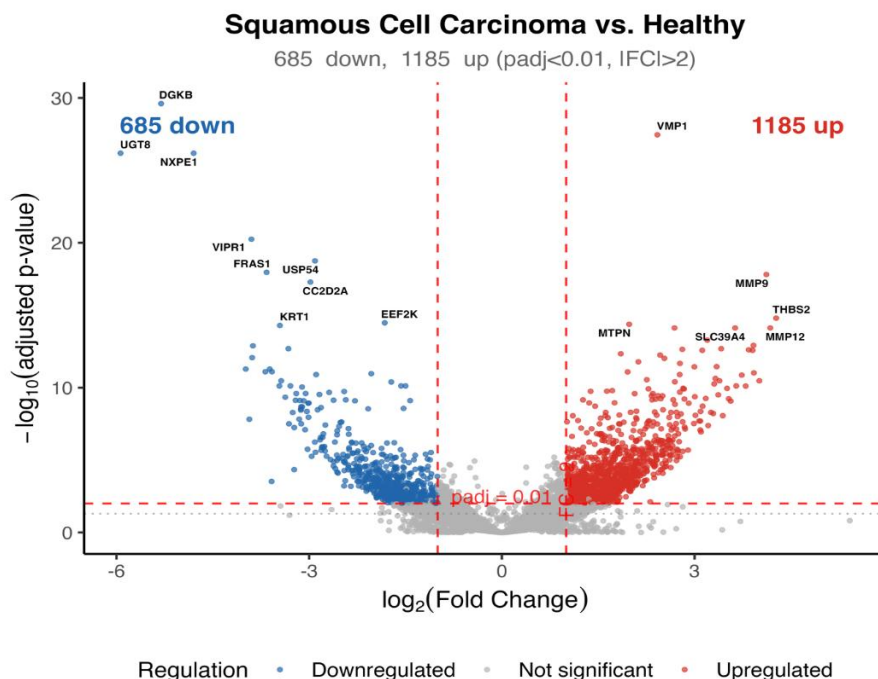


Abb 3: Differenzielle Genexpression von gesunder Haut (healthy) im direkten Vergleich mit PEK (squamous cell carcinoma). Vulkanplot zeigt 1870 differentiell exprimierte Gene, davon werden im Vergleich zur gesunden Haut im PEK 685 herunterreguliert (blau) und 1185 hochreguliert (rot).

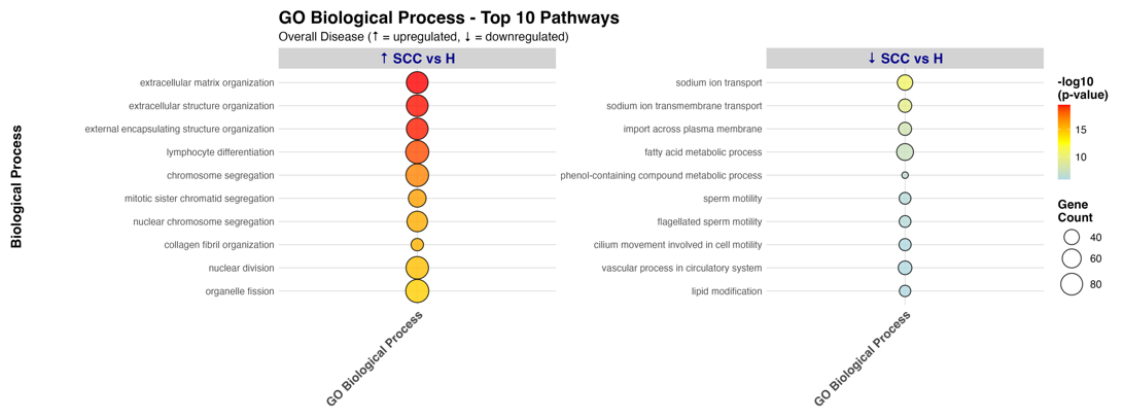


Abb. 4 Die GO_BP-Pfadanalyse zeigt die 10 stärksten hoch- und herunterregulierten Pfade im Abgleich mit der Datenbank für «biologische Prozesse» im Vergleich zwischen gesunden (h=healthy=gesund) und kanzerösen (SCC = squamous cell carcinoma = PEK) Proben. Punktgröße = Genanzahl, Farbintensität = Signifikanzniveau.

Das Fortschreiten zum Plattenepithelkarzinom ist durch einen umfangreichen Umbau der extrazellulären Matrix durch gewebezerstörende Enzyme (MMP9, MMP12) und Kollagenabbau gekennzeichnet sowie den Verlust von Genen, die für die Epitheldifferenzierung zuständig sind. Die dramatischsten transkriptionellen Veränderungen treten hierbei in der Basal- und Stachelzellschicht auf.

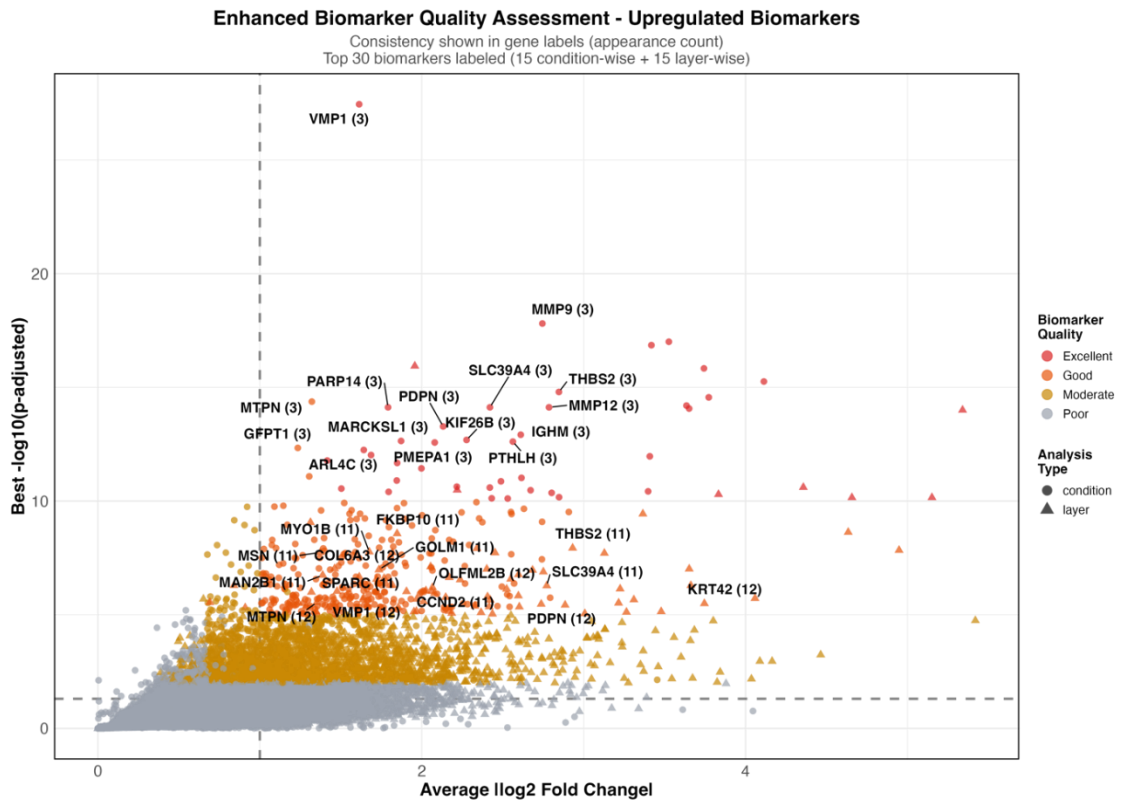


Abb. 5: Vulkanplot zur Darstellung der Eignung konsistent hochregulierter Gene als potentielle Biomarker.

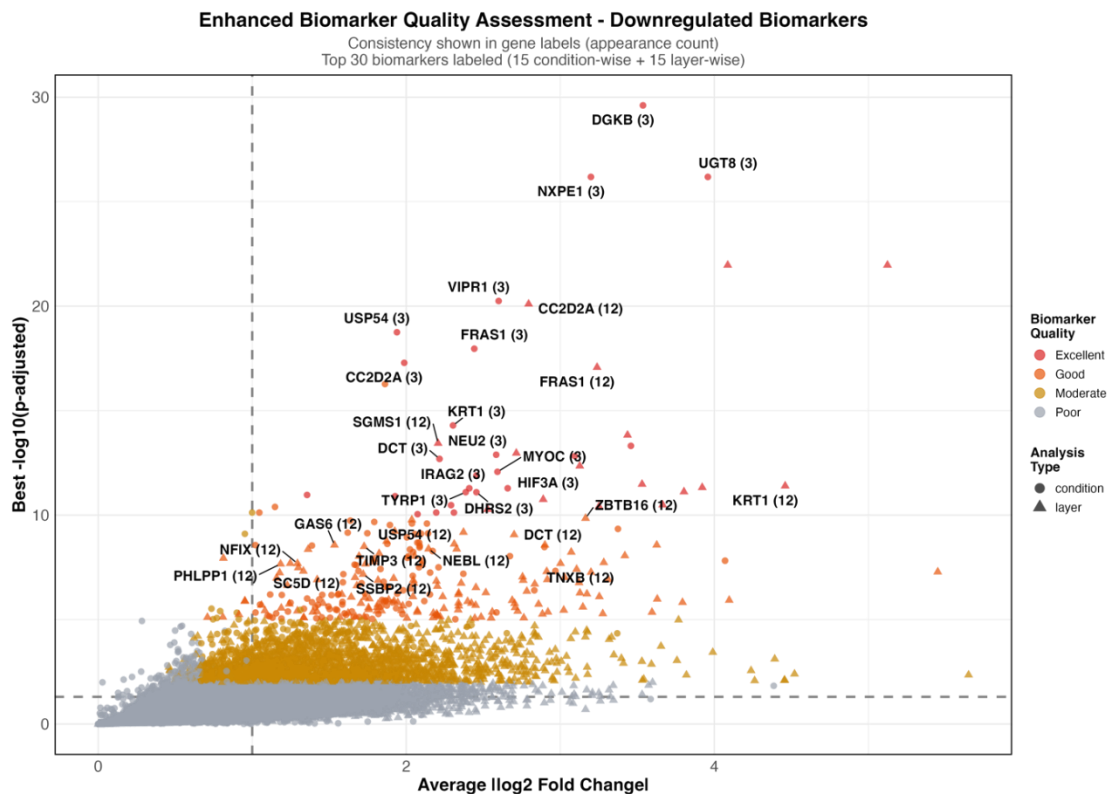


Abb. 6: Vulkanplot zur Darstellung der Eignung konsistent herunterregulierter Gene als potentielle Biomarker.

Wir konnten zudem konsistente potenzielle Biomarker identifizieren. Gene, die mit Gewebeumbau assoziiert sind (VMP1, MMP9 und THBS2) zeigen sich durchweg als hochregulierte Progressionsmarker. Gene der normalen Hautfunktion (DGKB, NXPE1 und UGT8) jedoch können als konsistent herunterregulierte Gene auch als Biomarker dienen, die den Verlust der normalen Gewebefunktion widerspiegeln.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieses Projektes konnten wir zum ersten Mal EcPV-2 induzierte Läsionen räumlich auflösen sowie schichtspezifisch analysieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Progression der Krankheit von präkanzerösen zu kanzerösen Läsionen mit Veränderungen der Genexpression einhergeht. Die identifizierten Biomarker werden wir nun validieren (in einem ersten Schritt mittels qPCR) und später auch in funktionellen Studien untersuchen.

Die Resultate aus diesem Projekt werden wir in einem wissenschaftlichen Fachartikel publizieren. Damit können wir zum besseren Verständnis papillomavirusinduzierter Tumorentstehung beitragen.