

Guanmengqian Huang
Dr. Med

Genome-wide DNA methylation profiling in peripheral blood cells of triple negative breast cancer patients

Fach/ Einrichtung: Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Ute Hamann

Brustkrebs bei Frauen ist die weltweit am häufigsten diagnostizierte Krebsart und die häufigste Todesursache durch Krebs. Dabei ist triple-negativer (dreifach-negativer) Brustkrebs einer der aggressivsten Subtypen von Brustkrebs. Dieser hat eine höhere Rückfallrate und ist mit einem kürzeren Gesamtüberleben im Vergleich zu anderen Subtypen von Brustkrebs assoziiert.

Die meisten diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Parameter für triple-negativen Brustkrebs basieren auf der Analyse von Tumorgewebe aus Biopsien und Operationen. Diese Eingriffe haben jedoch bei Patienten eine geringe Akzeptanz und sind mit hohen Kosten verbunden. Daher ist die Erforschung von zirkulierenden Biomarkern, die als Ersatz-Biomarker für Tumormerkmale dienen können, von großem Vorteil für die Patienten. Obwohl DNA-Methylierungsprofile oft gewebe- und zellspezifisch sind, deuten neueste Daten darauf hin, dass anomale DNA-Methylierungsmuster in peripheren Blutzellen als Risikomarker und diagnostische Biomarker für verschiedene solide Krebsarten - einschließlich Brustkrebs - dienen könnten. Bei triple-negativem Brustkrebs ist allerdings wenig über DNA-Methylierungsänderungen in spezifischen Genen bekannt, und große genomweite Methylierungsstudien fehlen.

In der vorliegenden Studie wurde ein epigenomweites DNA-Methylierungs-Profilierung in DNA-Proben von peripheren Blutzellen von 233 Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs und 233 gesunden Kontrollen unter Anwendung von Infinium HumanMethylation450 BeadChips durchgeführt. Das Ziel war es, Methylierungsunterschiede in Blutzellen-DNA zu identifizieren, die mit triple-negativem Brustkrebs assoziiert sind. Die BeadChip-Daten wurden normalisiert, qualitätskontrolliert und weiter selektiert, bevor sie nach Zelltyp-Heterogenität und Alter adjustiert wurden. Es wurden zwei Adjustierungsmethoden angewendet: Der EWASher-Algorithmus adjustiert nach Zelltyp-Heterogenität und Alter und das lineare Regressionsmodell nur nach Alter. Nach der Korrektur wurden CpG-Kandidaten (50 hypermethylierte CpGs und 15 hypomethylierte CpGs) entsprechend der Schwellenwerte der Methylierungsdifferenz nach EWASher ($>0,04$), einem P-Wert nach EWASher ($<0,001$) und einer Methylierungsdifferenz nach der linearen Regression ($>0,01$) ausgewählt. Die weitere

Auswahl von CpG-Top-Kandidaten erfolgte nach folgenden Kriterien: Mehrere Sonden pro Gen, Lokalisation in der Promotorregion oder im ersten Exon, funktionelle Anreicherung in Pfadanalysen (KEGG, DAVID, Reactome, ConsensusPathDB, Ingenuity); basierend auf Literaturdaten: Sonden in Genen mit dokumentierter Funktion bei Krebs, Funktion bei triple-negativem Brustkrebs/Brustkrebs/anderen Krebsarten, Suszeptibilitätsgen für triple-negativen Brustkrebs/Brustkrebs/andere Krebsarten, berichtete differentielle Methylierung bei triple-negativem Brustkrebs/Brustkrebs/andere Krebsarten, somatische Mutation bei triple-negativem Brustkrebs/Brustkrebs/anderen Krebsarten. Eine Matrix mit einer Zeile pro Sonde und einer Spalte pro Auswahlkriterium wurde erstellt und eine Hauptkomponentenanalyse mit dieser Matrix durchgeführt. Die drei Methylierungs-sonden mit den größten ersten Hauptkomponenten wurden zur Validierung ausgewählt.

Die Validierung wurde in einem unabhängigen Probensatz von 57 Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs und 124 Kontrollen mittels der digitalen Tröpfchen-basierten Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die Hypermethylierung von cg06588802 in LINC000299 wurde erfolgreich validiert. Es wurden Korrelationen der Methylierung von zwei CpG-Stellen, cg06983746 in FASLG und cg06588802 in LINC00299 und ihren benachbarten CpGs identifiziert. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass die Methylierung häufig regional korreliert ist. Darüber hinaus zeigte die *in silico* Funktionsanalyse von Daten aus dem Krebsgenom-Atlas eine starke negative Korrelation zwischen der cg06588802-Methylierung und der LINC00299-Expression in normalen Brustgeweben.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Hypermethylierung von cg06588802 in LINC00299 ein Biomarker für triple-negativen Brustkrebs sein könnte. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Methylierungslevels von cg06588802 in LINC000299 mit dem Tumor-Lymphknoten-Metastasen-Stadium gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die Methylierung möglicherweise in einem frühen Stadium der Karzinogenese auftritt.

In dieser bisher größten epigenomweiten Assoziationsstudie wurde unter Berücksichtigung der möglichen Störfaktoren Zelltyp-Heterogenität und Alter eine erhöhte Methylierung von cg06588802 in LINC00299 und benachbarten CpG-Stellen bei Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen identifiziert und validiert. Die Interpretation dieses Ergebnisses unter Berücksichtigung der Daten aus der Literatur weist auf einen Zusammenhang zwischen der anomalen LINC00299-Hypermethylierung, der Lymphozytenaktivität und dem Risiko für triple-negativen Brustkrebs hin.