

Zhong Guan

Dr. med.

## **Comparative and Combined Analyses of Methylation, Genetic and Environmental Risk Scores for Breast Cancer Risk Prediction**

Fach/Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hermann Brenner

Brustkrebs ist sowohl die häufigste Krebsart als auch die häufigste Krebstodesursache bei Frauen weltweit. Durch frühzeitiges Erkennen dieser Krankheit kann die Mortalität reduziert werden. Die Mammographie ist derzeit die am weitesten verbreitete Methode zur Früherkennung von Brustkrebs, aber die Empfehlungen zum Mammographie-Screening berücksichtigen meist nicht die erhebliche interindividuelle Variation des Brustkrebsrisikos. Der Nachweis von Biomarkern durch einen nicht-invasiven und kostengünstigen Bluttest könnte für die populationsbezogene Brustkrebs-Risikoeinschätzung potenziellen Nutzen haben. Kürzlich durchgeführte Studien zur DNA-Methylierung im Blut legen nahe, dass Methylierungsänderungen im Vollblut mit dem Brustkrebsrisiko assoziiert sind. Da die Mehrzahl der bereits veröffentlichten Studien, die Blut-DNA-Methylierung als Frühindikator für das Brustkrebsrisiko betrachtet haben, in klinischen Settings durchgeführt wurde, in denen die Blutproben nach Diagnosestellung gewonnen wurden, sollten die berichteten Ergebnisse über anomale DNA-Methylierung in prospektiven Studien validiert werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. Single Nucleotide Polymorphism, SNP), häufige genetische Variationen, Potenzial zur Prognose des Brustkrebsrisikos besitzen. Einzelne SNPs sind jeweils nur mit kleinen Risikovariationen assoziiert, können jedoch kumulativ eine erhebliche Risikovariation erklären. Genetische Risikoscores (GRS), die auf multiplen SNPs basieren, können verwendet werden, um Frauen mit unterschiedlichem Brustkrebsrisiko zu identifizieren, um genauere und personalisierte Präventionsstrategien zu entwickeln. Neben epigenetischen und genetischen Risikoprädiktoren werden häufig "Environmental Risk Scores" (ERS) die auf vielen bekannten

Brustkrebsrisikofaktoren wie Reproduktions-, Lebensstil- und anthropometrischen Faktoren basieren, zur Vorhersage des Brustkrebsrisikos verwendet. Einige der ERS wurden validiert und könnten bei der Risikobewertung von Brustkrebs von erheblichem Nutzen sein. Ziel dieser Dissertation war es daher einerseits, einen Überblick über derzeit identifizierte DNA-Methylierungsmarker zur Früherkennung/Risikostratifizierung von Brustkrebs zu geben. Zum anderen wurde in einer prospektiven Kohortenstudie ein Methylierungs-Score, ein genetischer Risiko-Score sowie ein ERS für die Vorhersage des Brustkrebsrisikos bewertet, jeweils einzeln und in Kombination miteinander.

Zunächst wurde ein systematischer Review durchgeführt, der einen Überblick über potenziell vielversprechende DNA-Methylierungsmarker zur Früherkennung bzw. Risikostratifizierung von Brustkrebs in Vollblutproben gibt. Insgesamt wurden dabei 70 genspezifische Methylierungsmarker und 285 differentiell methylierte CpG-Sites identifiziert, von denen die meisten aus retrospektiven Studien stammen und bislang nicht unabhängig validiert wurden. Darüber hinaus wies die Mehrheit der berichteten Marker eine begrenzte diskriminatorische Kapazität auf, wobei nur sechs Marker eine Sensitivität von  $> 40\%$  bei einer Spezifität von  $> 75\%$  erreichten. Starke Assoziationen ( $OR \leq 0,5$  oder  $OR \geq 2$ ) mit dem Brustkrebsrisiko wurden nur für 14 Marker berichtet. Die Ergebnisse dieses Reviews deuteten darauf hin, dass die derzeit identifizierten DNA-Methylierungsmarker für die frühzeitige Erkennung von Brustkrebs ungenügend zu sein scheinen. Vielversprechende Methylierungsmarker müssen in Studien mit großer Fallzahl und prospektivem Design weiter validiert werden.

Nach der Identifizierung von 8 genspezifischen Methylierungsmarkern und 285 unterschiedlich methylierten CpG-Sites, die mit dem Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht worden waren, wurden in dieser Dissertation in einem zweiten Schritt diese Methylierungsmarker mit Hilfe der ESTHER-Studie validiert, um die Ergebnisse des Reviews zu überprüfen. Für diese Analyse wurden insgesamt 477 CpG-Sites ausgewählt. 24 davon zeigten signifikante Assoziationen mit dem Brustkrebsrisiko mit einem rohen p-Wert  $< 0,05$ , allerdings erreichte keine der 24 CpG-Sites nach Adjustierung für multiples Testen den sog False-Discovery-Rate (FDR)-Wert  $\leq 0,05$ . Dieses Ergebnis zeigt, dass scheinbar viel versprechende Ergebnisse aus Klinischen Settings in prospektiven Studien nicht ohne weiteres reproduzierbar sind. Weitere Anstrengungen sind erforderlich, um verlässliche und informative Methylierungsmarker durch die Kombination von

Daten aus multizentrischen Studien und den Einsatz von Hochdurchsatztechnologien zu untersuchen. Da die Exposition von Östrogen ein Risikofaktor für Brustkrebs ist, wurde in dieser Dissertation außerdem die Assoziation von CpG-Sites in Östrogen-assoziierten Genen mit dem Brustkrebsrisiko untersucht. Insgesamt wurden 148 CpG-Sites innerhalb von 4 Östrogen-assoziierten Genen für diese Analyse ausgewählt. Es konnte beobachtet werden, dass vier CpG-Sites mit dem Brustkrebsrisiko assoziiert sind, allerdings erreichte nach Adjustierung für multiples Testen keine der 4 CpG-Sites den Wert von  $FDR < 0,05$ . Die Rolle der Methylierung in Östrogen-assoziierten Genen für die Regulation der Östrogensynthese und des Katabolismus ist noch unklar. Daher sollte in weiteren Studien der genaue Mechanismus der Östrogen-Homöostase und die Frage, ob der Methylierung in Östrogen-relevanten Genen die Entwicklung von Brustkrebs fördert, weiter untersucht werden.

In einem dritten Schritt wurde auf Basis der Daten der ESTHER-Studie der prognostische Wert der Methylierung für das Brustkrebsrisiko mit der Vorhersagekraft genetischer Scores und von ERS verglichen. In dieser Studie zeigte der auf der Methylierung basierende Score im Vergleich zum genetischen Score und zum ERS bei der Vorhersage der Brustkrebsinzidenz ( $AUC = 0,58$ ,  $95\% \text{ CI } (0,57-0,60)$ ) eine relativ moderate Leistung. Die Kombination aller drei Scores hingegen konnte die Brustkrebsinzidenz mit einer höheren Genauigkeit prognostizieren ( $AUC = 0,64$ ,  $95\% \text{ CI } (0,62-0,66)$ ). Umfangreichere und zielgerichtetere Anstrengungen sind erforderlich, um nützliche Methylierungsmarker für das Brustkrebs-Screening sowie weitere SNPs mit erhöhtem Risiko sowie anamnestisch erhebbare Risikofaktoren zu identifizieren. Die Kombination dieser drei Arten von Risikoinformationen hat großes Potenzial zur Prognose des Brustkrebsrisikos und könnte zur Verbesserung des Brustkrebs-Screenings und Präventionsprogrammen beitragen.

Zusammenfassend deuten die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen darauf hin, dass im Bereich der DNA-Methylierungsänderungen im Blut zur Risikostratifizierung oder Früherkennung von Brustkrebs noch erheblicher Forschungsbedarf besteht, da bislang in klinischen Settings identifizierte Methylierungsmarker in einer prospektiven Studie nicht validiert werden konnten. Studien mit großer Stichprobengröße, prospektivem Studiendesign und Einsatz epigenomweiter Assoziationsanalysen sollten durchgeführt werden, um zuverlässige epigenetische Signaturen für das Brustkrebsrisiko zu identifizieren. Mit weiteren Verbesserungen genetischer und epigenetischer Risikoprädiktion

durch groß angelegte internationale GWAS- und EWAS-Bemühungen und Berücksichtigung weiterer Risikosignaturen, wie etwa auf microRNA basierenden Signaturen, sollte in künftigen Studien die Entwicklung von Vorhersagemodellen weiter vorangetrieben werden, die zu einer besseren Risikostratifikation für das Brustkrebsscreening beitragen können.