

Bidii Stephen Ngalah
Dr.Sc.Hum

Analysis of copy number variation profiles in brain tumors in the context of a methylation based classifier

Subject area/Institution: Human genetics / German Cancer Research Center (DKFZ)

Doctoral Supervisor: Priv-Doz Dr. rer. nat. Obul Reddy Bandapalli

Hirntumore reichen von gutartigen Neubildungen wie dem pilozytischen Astrozytom bis hin zu bösartigen Neubildungen wie dem Glioblastom. Die histopathologische Diagnose dieser Entitäten wird häufig durch die Variabilität zwischen den Beobachtern erschwert. Darüber hinaus können die verwendeten genomweiten Methylierungsmuster nicht den Schweregrad des Tumors einstufen, der für das Patientenmanagement entscheidend ist. Obwohl spezifische Kopienzahlvariationen (CNV), wie z.B. 1p/19q Co-Deletionen, bekannt sind, um das Oligodendrogliom zu charakterisieren, und der gemeinsame Gewinn von chr 7 und der Verlust von chr 10 das Glioblastom kennzeichnen, sind andere CNV-Profile nicht gut in die Hirntumordiagnose integriert worden. Daher scheint es vielversprechend, Verbesserungen in der methylierungsbasierten Diagnostik und Krankheitsprognose zu erreichen, indem ein Ansatz zur systematischen Einbeziehung von CNV-Informationen in die Klassifikation von Hirntumoren etabliert wird. Auf dieses Ziel habe ich hingearbeitet. In der ersten Phase meiner Studie evaluierte ich, ob Methylierungsdaten (450K und 850K epic) über das Vorhandensein von CNV informieren können. Ich verwendete 61 gepaarte Datensätze, die aus der Mikroarray-basierten vergleichenden genomischen Hybridisierung (aCGH) bzw. dem Epic 450K/850K Methylierungsarray verarbeitet wurden. Die Kopienzahlplots der Methylierungsdatensätze wurden aus dem "conumee" R-Paket in bioconductor mit kleinen Modifikationen generiert. Für den aCGH-Datensatz wurden CNV-Plots aus dem "DNA copy"-Paket abgeleitet. Ich beobachtete >80% prozentuale Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden. Um eine zufällige Übereinstimmung auszuschließen und das Ausmaß der Übereinstimmung zu überprüfen, habe ich die Kappa-Statistik berechnet. Ich beobachtete mäßige (0,54) bis erhebliche (0,61) Kappa-Statistikwerte. Zusammenfassend habe ich den Nachweis erbracht, dass die Methylierungsdaten bei der Bestimmung von CNV zuverlässig sind.

In der zweiten Phase bewertete ich die CNV-Profile und Überlebenszeiten mittels Kaplan-Meier-Analyse zwischen den WHO-klassifizierten Astrozytomen Grad II und III der Krebsgenom-Atlas (TCGA)-Daten (n=117). Vor dem Clustering beobachtete ich keinen signifikanten Unterschied im Überleben zwischen WHO-Grad II und III. Nach dem hierarchischen Clustering (Pearson

coefficient correlation ward linkage) unter Verwendung der log₂ CNV-Werte konnte ich 7 Cluster/Untergruppen identifizieren, die ein unterschiedliches Überleben hatten. Die Cluster hatten sowohl einzigartige als auch gemeinsame Veränderungen zwischen ihnen. Zum Beispiel zeigte Cluster 4 (n=10) ein besseres Überleben mit Deletionen an 3q,4q,5p/q,11p,12q,13q und Gain in chr 12p. Diese Regionen tragen Gene wie ANO2, CD4, LRRC23, VWF und GALNT8 Gene. Cluster 3 hatte ein schlechtes Überleben und erhöhte Deletionen in chr 1q,2q,3q,4q,5p/q,6q,7q,11p,13q und Gain in chr 9p (n=54). Einige Schlüsselgene, die an diesen Loci verändert waren, waren C2orf88, CDKN2A/B, RB1, SORBS2, POLD1, MYBPC2 und TP63. Diese Gene spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklusregulation, dem Wachstum und der Tumorsuppression. Cluster 7 hatte Verlust an chr 4p/q, 13p/q und 19q (n=8), die Gene wie LRBA, FBXW7, MARCHF1, SPOCK3, MTUS2 und RFC3 enthielten. Darüber hinaus waren auch das CDH12-Gen und die lange nicht-kodierende RNA (LINC005), die CCND2 auf 5p bzw. 13q reguliert, in >75% der Proben deletiert. Des Weiteren konnte ich feststellen, dass Glioblastom-Rezidivfälle und Primärtumor durch das Vorhandensein von chr7p/q gain, 9p, 10p/q und 13p/q-Deletionen unterschieden werden konnten, wobei ich insgesamt n= 1500 Fälle und n= 1400 Kontrollen aus dem TCGA-Datensatz verwendete. Die 9p- und 10p/q-Loci sind bereits dafür bekannt, dass sie für Zellüberlebens- und apoptotische Gene wie CDK2A/B, MDM2, EGFR und PTEN kodieren, die bei hochgradigen Gliomen häufig vorkommen. Diese Ergebnisse versprechen daher eine bessere Tumordiagnose und einen Ansatz zur Patientenstratifizierung, der sowohl beim Patientenmanagement als auch bei der Vorhersage von Behandlungsergebnissen durch die Verwendung von CNV-Profilen helfen würde.

In der dritten Phase meiner Studie untersuchte ich die Methylierungsklassen und -pfade, die mit Genen in den veränderten Regionen assoziiert sind. Ich beobachtete eine unterschiedliche Häufigkeit in der Verteilung der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)-Mutation und der 06-Methyl-Guanin-DNA-Methyl-Transferase (MGMT) in den 7 Untergruppen. In den spezifischen Clustern 1 und 6 waren A_IDH 100% bzw. 70%. In den anderen Clustern dominierte A_IDH_HG wie folgt: Cluster 5 (50%), Cluster 4 (33%), Cluster 3 (13%) und Cluster 7 (12%). Dies zeigt, dass Methylo-Klassen mit den CNV-Profilen abgeglichen werden können. Mit Hilfe von ingenuity pathway-based knowledge konnte ich kanonische Signalwege identifizieren, die mit veränderten Genen pro Gruppe assoziiert sind. Ich beobachtete, dass ziemlich einzigartige Signalwege mit der Krankheit assoziiert waren. Insbesondere PTEN, ERK/MAPK, P53, IL-3, Glioblastoma multiforme, Gliom-Invasivität und Axonal Guidance Signaling, die mit der Gliombildung assoziiert sind, traten in den meisten Gruppen auf. Zu den wichtigsten veränderten Genen gehörten die adenomatöse Polyposis coli, die ein Tumorsuppressor ist, die Glykogensynthasekinase 3 beta (GSK-3 β), die die Zellproliferation beeinflusst, das

Retinoblastom (Rb), das ein Tumorsuppressor-Rb-Protein kodiert, während der Platelet-derived growth factor (PDGF) und die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) beide das Zellwachstum und andere zelluläre Funktionen regulieren. Proto-Onkogen Ratten-Sarkom (Ras), WNT, Son of Sevenless (SOS), Auditory processing deficit und beta-Catenin wurden ebenfalls verloren. Die Aktivierung des WNT-Signalwegs hilft bei der zellulären Differenzierung, die die Bildung von Hirntumoren fördert, während der Ras /PI3K/RTK-Signalweg zur Deregulation des Tumorwachstums beiträgt. Diese Ergebnisse zeigen, dass mehrere durch CNV dysregulierte Signalwege bei der Etablierung einer neuartigen Stratifizierung von Hirntumoren, bei der Diagnostik und folglich bei der Identifizierung neuer medikamentöser Angriffspunkte helfen können.