

Epigenetische Alterationen des Lungenkarzinoms: Diagnostische Nutzung und Induktion durch E-Zigarettenkonsum

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Swetlana Scheufele

Kiel, 2018

Erste Gutachterin:

Prof. Dr. rer. nat. Manuela Dittmar

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Ole Ammerpohl

Tag der mündlichen Prüfung:

17.04.2018

Zusammenfassung

Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (engl. *non-small cell lung cancer*; NSCLC) ist die zweithäufigste Krebsart bei Männern und Frauen, zu den häufigsten Entitäten zählen das Adeno- und das Plattenepithelkarzinom. Der NSCLC wird häufig im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Bisher gibt es keine Möglichkeiten der routinemäßigen Lungenkrebsfrüherkennung.

Rauchen zählt zu den häufigsten Ursachen für die Entstehung von Bronchialkarzinomen, weswegen heutzutage viele Raucher zu der vermeintlich gesünderen Alternative, der E-Zigarette, wechseln. Da beim Verdampfen des *Liquids* u.a. auch Formaldehyd und Acrolein entstehen, raten einige Studien vom E-Zigarettenkonsum ab. Um die tatsächlichen Risiken der E-Zigarette abzuschätzen, fehlen Ergebnisse aus Langzeitstudien. Desweiteren liegen keine biologischen Studien vor, welche die Wirkung des E-Zigarettdampfes auf molekulargenetischer Ebene genomweit untersucht haben.

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Rahmen des Deutschen Zentrums für Lungenkrankheiten (DZL) durchgeführt. Ziel war es, einerseits einen zuverlässigen Früherkennungstest anhand von bestimmten, für das Lungenkarzinom spezifischen Epimutationen zu entwickeln. Andererseits wurde die Wirkung des E-Zigarettdampfes auf die Entstehung von Epimutationen untersucht.

Bei dem entwickelten Test für Lungenkrebsfrüherkennung handelte es sich um ein auf *Liquid Biopsies* basiertes NGS-*Panel*. Die Entwicklung des Plasma *Panel*s erfolgte in drei voneinander unabhängigen Ansätzen. Im ersten Ansatz wurden für den primären Tumor spezifische DNA-Methylierungssignaturen detektiert. Hierfür wurden „Illumina Infinium Human Methylation450K BeadChip“ (HM 450K)-Datensätze, bestehend aus 40 Lungenkarzinomen sowie deren korrespondierenden Kontrollen, analysiert. Die *in silico* Analysen ergaben 224 CpG *Loci*, die am besten für die Differenzierung maligner Tumorgewebe geeignet waren ($FDR < 1 \times 10^{-23}$, $\sigma/\sigma_{\max} > 0,4$). 63 weitere Positionen zeigten eine starke, entitätsspezifische DNA-Methylierung ($FDR < 1 \times 10^{-4}$). Im zweiten Ansatz wurden für das Blutplasma der Lungenkrebspatienten spezifische DNA-Methylierungssignaturen detektiert. Hierfür erfolgte *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS) zirkulierender, zellfreier DNA (zfdNA) aus dem Plasma von Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten. Als Kontrolle diente Plasma einer tumorfreen Kohorte. WGBS identifizierte erstmalig 29.877 tumor- sowie 76.374 entitätsspezifisch methylierte CpG *Loci* im Blutplasma. Für das *Panel* wurden 292 Regionen ausgewählt, die maligne Lungentumore sowie deren Entitäten am zuverlässigsten differenzierten. Im dritten Ansatz wurde das Plasma *Panel* mit 59 tumorspezifischen sowie prognostisch relevanten CpG *Loci*

(FDR < 0,05) aus Datensätzen weiterer Studien ergänzt. Anschließend wurde das Plasma *Panel* synthetisiert und anhand einer kleinen Patientenkohorte (n=12) validiert. Im Rahmen der Pilot-Studie differenzierte das entwickelte Plasma *Panel* mit einer 100%igen Richtigkeit maligne Lungentumore (Stadium: I bis IV) und lieferte weitere Informationen bezüglich deren Entität und *Staging*.

Um die Wirkung des E-Zigarettdampfes auf Lungenzellen zu untersuchen, wurde eine multi-OMICS Studie designt. Im Rahmen der Studie wurden primäre Lungeneithelzellen sowie die A549 Lungenzelllinie parallel analysiert. Nach Etablierung zahlreicher zellphysiologischer, molekularbiologischer sowie epigenetischer Assays inkl. „Infinium MethylationEPIC BeadChip“, ATAC-Sequenzierung und RNA-Sequenzierung wurden die Daten ausgewertet.

Die Ergebnisse der multi-OMICS Studie zeigten, dass bereits geringe Mengen an nikotinfreiem E-Zigarettenextrakt Aneuploidie und Zellproliferation induzierten, die Apoptose wurde dabei inhibiert. Diese Beobachtungen wurden bisher in der Literatur noch nie im Zusammenhang mit E-Zigaretten beschrieben und untermauern andere Studien, die vor dem erhöhten Lungenkrebsrisiko der E-Zigarettenkonsumenten warnen. Desweiteren zeigten molekulargenetischen Untersuchungen zum ersten Mal eine Fehlregulation von SLC- sowie ABC-Transportern. Das lässt den Rückschluss zu, dass die entstehenden Tumore eventuell chemoresistent und aufgrund des erhöhten Metabolismus besonders aggressiv sein könnten.

Geringe Mengen des nikotinhaltigen E-Zigarettenextrakts induzierten bereits nach drei Stunden Apoptose der Lungenzellen. Laut mehreren internationalen Studien hat die Apoptose des Lungeneithels Entzündungen zur Folge, was das Risiko an Bronchialkarzinom zu erkranken noch weiter erhöhen könnte. Desweiteren detektierten genomweite, molekulare Analysen erstmalig ähnlich wie bei den klassischen Zigaretten die Fehlregulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie z.B. Morphogenese, Entwicklung, Zellzyklus, Proteinbiogenese, -lokalisation und -bindung.

In dieser Arbeit konnte somit ein diagnostisch-prognostisches *Panel* auf Basis epigenetischer Alterationen entwickelt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen damit eine wesentliche Grundlage für die erfolgreiche Beantragung der deutschlandweiten *Clinical Trial* Studie „EmoLung“ des DZL dar, die voraussichtlich 2018 beginnt. Darüber hinaus konnte mit einer Kombination epigenetischer, molekularbiologischer und zellphysiologischer Untersuchungen erstmals eine Proliferations- und Aneuploidie fördernde Wirkung durch E-Zigarettenextrakt gezeigt werden.

Summary

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is worldwide the second most common cancer in both men and women. The most common entities include adeno- and squamous cell carcinoma. As there are no proper tools for lung cancer early detection, NSCLC is often diagnosed in advanced stages and is therefore associated with poor prognosis.

Smoking is one of the most frequent causes of bronchial carcinomas. As a consequence many smokers switch to e-cigarettes, which are supposed to be a healthier alternative to conventional cigarettes. However, during vapouring big amounts of formaldehyde and acrolein develop. For this reason several studies dis advise e-cigarette consumption. Unfortunately, there is a lack of long term as well as short term molecular studies to estimate the risk of e-cigarettes.

This work was performed in the framework of The German Center for Lung Research (DZL). The aims were to design a reliable, epimutation-based test for lung cancer early detection and to analyze the effect of e-cigarette vapour on the appearance of those epimutations.

The developed lung cancer early detection test was a liquid biopsy-based NGS-panel. The development occurred in several approaches. First, tumor-specific DNA methylation signatures were detected. To this aim „Illumina Infinium Human Methylation450K BeadChip“-data of 40 lung cancer surgical specimen as well as their corresponding controls were analysed. *In silico* data analysis identified 224 CpG loci, whose methylation was significantly different in malignant tumor tissue ($FDR < 1 \times 10^{-23}$, $\sigma/\sigma_{max} > 0.4$). 63 other positions showed entity specific DNA methylation patterns ($FDR < 1 \times 10^{-4}$). The second approach was performed to identify tumor specific DNA methylation profiles in blood plasma. Therefore, whole genome bisulfite sequencing (WGBS) of circulating, cell-free DNA (cfDNA), isolated from plasma of adeno- and squamous cell carcinoma patients, was performed. Tumor-free patients served as a control group. For the first time, WGBS identified 29.877 tumor and 76.374 entity specific, differentially methylated CpG loci in blood plasma. Therefrom 292 targets were selected, depending on their ability to differentiate malignant lung tumors and their entities. During the third and the last approach the panel was complemented with 59 tumor specific and prognostic markers ($FDR < 0.05$) from other studies. After a successful development, the plasma panel was synthesized and validated by using a small patient cohort (n=12). The developed panel was able to analyze liquid biopsy samples and identify lung cancer patients (stage I to IV) with an accuracy of 100%. Moreover, it provided information about the entity and the tumor stage.

For the second aim of this work, a multi-OMICS study was designed to analyse the effect of e-cigarette vapour on lung cells. In this study primary epithelial lung cells as well as A549 cells were used. After establishing numerous physiological, molecular and epigenetic protocols including the "Infinium Methylation EPIC BeadChip", ATAC-Sequencing and RNA-Sequencing, data analysis was performed.

For the first time, it was shown, that even small amounts of nicotine free e-cigarette extract induced aneuploidy as well as cell proliferation. At the same time apoptosis was inhibited. These observations are in line with the results of other international studies indicating the potential harm of e-cigarettes. Moreover, for the first time the multi-OMICS study identified aberrant transcriptional regulation of SLC- and ABC-transporters, leading to potential chemoresistance and aggressiveness of arising tumors.

Small amounts of nicotine containing e-cigarette extract induced after three hours apoptosis in lung cells. According to several international studies enhanced apoptosis leads to lung epithelia inflammation, enhancing the risk of tumor development. Here, genome-wide molecular assays detected for the first time deregulation of important cellular processes including morphogenesis, development, cell cycle, protein biogenesis, protein localisation and protein binding.

During this work epigenetic alterations in lung cancer specimen were determined in order to develop a prognostic and diagnostic lung cancer panel. The results of this study provided the basis for a successful application of the German Clinical Trial DZL-Study „EmoLung“, which will be initiated in 2018. Moreover, a proliferative and aneuploidy promoting effect of e-cigarettes was shown for the first time using epigenetic, molecular and physiological approaches.