

Abstract

The aim of this work was the characterization of mismatch repair (MMR) deficient cells on a genetic and epigenetic level to provide insight into carcinogenesis processes developing in MMR deficient human tumors.

For the genetic analysis, somatic mutation data from whole genome DNA sequencing of tumor or adenoma tissue as well as tumor-distant normal tissue of eleven hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) patients were used to identify 'hotspot' regions for mutations. The identification of 'hotspots' was mainly influenced by the distance of mutations on amino acid level and their occurrence frequency in the patients. With this strategy 231 candidate 'hotspot' regions were identified. Pathway analysis of involved 'hotspot' genes revealed their association with cancer related pathways and gene sets. A first investigation of the 'hotspot' mutation A728T in the candidate gene *NEDD9* revealed that this genetic alteration possibly influences apoptotic signalling, resulting in altered cell viability and caspase activity in the breast cancer cell line MCF-7.

By using a targeted sequencing approach for additional HNPCC tumor and sporadic colorectal cancer DNAs, a comparison of mutations in the identified 'hotspot' regions for both cancer types was enabled. Next to a higher tumor mutational burden in sporadic cases, 13 'hotspot' regions were found to be exclusively mutated in Lynch syndrome associated tumors, suggesting different mutagenesis processes.

For the epigenetic analysis, an *Msh2* knockout mouse model was explored and we investigated histone modification patterns of H3K4me3, H3K36me3 and H3K27me3 by chromatin immunoprecipitation DNA-sequencing (ChIP-seq). In general, an enhancement of histone methylation was observed in the knockout genotypes, especially with an increased number of H3K36me3 and H3K4me3 labelled genes. Furthermore, these modifications were enriched in pathways and gene sets associated with DNA repair, cell cycle and translation as well as with cell development and differentiation processes.

A single hit radiation resulted in almost identical epigenetic signatures in the wildtype mice compared to the untreated knockout mice, especially to the *Msh2*^{-/-} genotype. These results indicated the presence of a common adaptive epigenetic response concerning radiation and MMR deficiency.

Taken together, within this work genetic and epigenetic alterations of MMR deficient cells were identified which perhaps provide new insight into tumorigenesis processes in HNPCC patients. Furthermore, here identified 'hotspot' regions and histone modification patterns could be further used to identify biomarkers and new treatment approaches for patients with MMR deficient cancers.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Mismatch-Reparatur (MMR) -defiziente Zellen genetisch und epigenetisch zu charakterisieren, um Einblicke in Karzinogeneseprozesse zu erhalten, die gegebenenfalls therapeutisch genutzt werden könnten.

Für die genetische Analyse wurden somatische Mutationsdaten aus Gesamtgenomsequenzierungen von elf Patienten mit hereditärem non-polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC) verwendet. "Hotspot"-Regionen wurden ermittelt, in denen somatische Mutationen akkumulierten. Die Identifizierung dieser Regionen war nach dem funktionellen Einfluss der Mutationen ausgerichtet und beinhaltete Kriterien wie den Abstand der Mutationen auf Aminosäure-Ebene sowie die Frequenz der Mutationen in den Patienten. Zusammengefasst konnten 231 Kandidaten "Hotspot"-Regionen ermittelt werden, die 171 Gene in den MMR-defizienten Tumoren betrafen. Eine Signalweganalyse dieser "Hotspot"-Regionen zeigte, dass sie in wichtigen Krebs-assoziierten Signalwegen und Gensets angereichert waren. Erste funktionelle Analysen der "Hotspot"-Mutation A728T im *NEDD9* Genlokus zeigten, dass diese genetische Veränderung einen potentiellen Effekt auf den Apoptose-Signalweg hat. Dementsprechend konnte bei Überexpression der entsprechenden Mutation in MCF-7-Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen sowie eine reduzierte Kaspaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

Für den Vergleich von sporadischen und HNPCC-assoziierten Tumoren wurde eine zielgerichtete Sequenzierung der "Hotspot"-Regionen in 221 Gewebeproben vorgenommen. Es zeigte sich, dass in den sporadischen Fällen mehr Mutationen pro Tumor auftraten. Darüber hinaus gab es 13 "Hotspot"-Regionen, die exklusiv in den HNPCC-Fällen mutiert waren. Diese konnten durch unterschiedliche Mutageneseprozesse bedingt sein, die, abhängig von einem vererbten oder sporadisch erworbenen Defekt des MMR-Systems, auftreten.

Für die epigenetische Analyse wurde mit einem *Msh2* "Knockout" Mausmodell gearbeitet, das neben dem Wildtyp (*Msh2*^{+/+}) auch einen heterozygoten (*Msh2*^{+/-}) sowie homozygoten (*Msh2*^{-/-}) "Knockout" Genotyp umfasste. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation-DNA-Sequenzierung (ChIP-seq) wurden die Histonmodifikationen H3K4me3, H3K36me3 und H3K27me3 untersucht. Allgemein konnte in beiden "Knockout" Genotypen eine erhöhte Histonmethylierung festgestellt werden, speziell anhand von gestiegenen Zahlen von H3K36me3 and H3K4me3 markierten Genen. Des Weiteren konnte mittels Signalweg- und Genset-Analysen gezeigt werden, dass diese methylierten Gene mit Prozessen wie DNA-Reparatur, Zellzyklus und Translation sowie Zellentwicklung und -differenzierung assoziiert waren. Darüber hinaus wurde auch der Effekt einer einzelnen kurzen Strahlendosis untersucht. Diese zeigte nahezu identische epigenetische Signaturen wie in den "Knockout"-Mäusen. Ähnliche Veränderungen waren speziell im Vergleich zum *Msh2*^{-/-} Genotyp präsent.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine gemeinsame epigenetische adaptive Antwort von einer MMR-Defizienz sowie von einer einzelnen kurzen Bestrahlung induziert wurde. Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit genetische und epigenetische Veränderungen aufgezeigt werden, die neue Einblicke in den Prozess der Tumorentwicklung bei HNPCC-Patienten ermöglichen. Des Weiteren können die hier identifizierten "Hotspot"-Regionen und Histonmodifikationsmuster Anhaltspunkt für weiterführende Untersuchungen sein, die zum Ziel die Identifikation von Biomarkern und neuen Behandlungsansätzen für Patienten mit MMR-defizienten Krebs haben.