

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wydział Lekarski

lekarz Mateusz Bilski

**Ekspresja składowych rodziny miR-200 jako czynnik
predykcyjny przeżycia chorych na glejaki mózgu
WHO G2 i WHO G3**

ROZPRAWA DOKTORSKA

NAPISANA POD KIERUNKIEM

PROF. DR HAB. N. MED. JACKA FIJUTHA

Promotor pomocniczy: dr n.med. Łukasz Kuncman

Praca subsydiowana z funduszy Fundacji im. Jakuba hr. Potockiego

Łódź 2023

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wprowadzenie

Glejaki - pierwotne nowotwory pochodzenia glejowego należą do najczęściej występujących nowotworów centralnego układu nerwowego i stanowią około 70-80% ich ogólnej liczby. Są one przyczyną około 2% ogółu zachorowań na nowotwory, co przekłada się na około 2900 nowych przypadków rocznie na terenie Polski. W ciągu ostatnich trzydziestu lat liczba zachorowań uległa podwojeniu. Do powszechnie uznanych czynników ryzyka mających wpływ na powstawanie nowotworów pochodzenia glejowego należą zespoły genetyczne oraz promieniowanie jonizujące. W 2016 r. WHO opublikowała, czwartą edycję klasyfikacji guzów centralnego układu nerwowego; WHO CNS4, w której molekularne czynniki prognostyczne zaczęły odgrywać podstawową rolę predykcyjną i rokowniczą. W 2021r. pojawiła się nowa, piąta edycja klasyfikacji nowotworów centralnego układu nerwowego; WHO CNS 5, która stanowi jego szóstą wersję. Czynniki molekularne takie jak obecność mutacji IDH 1 i IDH 2 oraz kodelecji 1p19q mają ugruntowaną rolę w prognozowaniu oraz predykcji odpowiedzi na leczenie u chorych na glejaki. Są wskazówką w codziennej praktyce klinicznej, jak również w projektowaniu badań klinicznych. Wobec braku zadowalających postępów w leczeniu wielu typów nowotworów w tym glejaków, duża część aktualnie prowadzonych badań nad nowymi czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi dotyczy charakterystyki molekularnej opartej na ekspresji cząsteczek miRNA. Są to fragmenty nie kodujące, które regulują ekspresję genów po procesie transkrypcji. Kontrolują one około 30 % wszystkich genów znanych u ssaków, a co istotne również wiele onkogenów, genów supresorowych czy genów odpowiedzialnych za odpowiedź na leczenie promieniowaniem jonizującym oraz leczenie systemowe. Istnieją liczne doniesienia naukowe, w których wykazano, iż u pacjentów z nowotworami mózgu pochodzenia glejowego dochodzi do szeroko pojętych zaburzeń miRNA. Ich wyniki wskazują, iż składowe rodziny miR-200 mają wpływ na proces nowotworzenia, progresji oraz przerzutowania nowotworów pochodzenia glejowego. W związku z tym u pacjentów z glejakami, rozważany jest ich potencjał rokowniczy i predykcyjny. W skład rodziny miR-200 wchodzi 5 cząstek, którymi są: miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 oraz miR-429. Składowe tej rodziny są jednymi z najważniejszych inhibitorów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT). Mogą one hamować m.in. migrację komórkową, zdolności adhezyjne czy proces angiogenezy. miRNA mogą mieć funkcje zbliżone do ich genów targetowych. Dane pochodzące z piśmiennictwa wskazują na to iż poziom ekspresji jednego rodzaju miRNA względem innego może się różnić w odniesieniu do ich wartości prognostycznej czasu przeżycia całkowitego w wielu typach nowotworów. Najwyższą

wartość pod względem prognostycznym i predykcyjnym wnoszą więc analizy, które integrują większą liczbę cząstek miRNA oraz cech kliniczno- patologicznych. Pozwala to na stworzenie rzetelnych modeli dokładniej określających prognozę pacjentów z daną grupą cech. Przeprowadzenie analizy zestawu kilku miRNA tzw. sygnatur podnosi ich siłę w określaniu predykcji przeżycia chorych na glejaki mózgu WHO G2 i WHO G3.

Cele

1. Ocena względnej ekspresji poszczególnych składowych rodziny miR-200 w tkance nowotworowej oraz towarzyszącej nienowotworowej chorych na glejaki mózgu WHO G2 i WHO G3.
2. Ocena względnej ekspresji poszczególnych składowych rodziny miR-200 w odniesieniu do wybranych czynników kliniczno-patologicznych: rozpoznania histopatologicznego, obecności mutacji IDH 1/2, obecności kodelecji 1p19q, *gradingu*, pierwotnej objętości guza, zakresu wykonanej operacji (GTR, STR, biopsja), okolicy anatomicznej zajętej przez nowotwór, wielkości CTV napromienianego obszaru, wieku pacjentów i płci.
3. Ocena wartości prognostycznej cząstek rodziny miR-200 na podstawie analizy czasu całkowitego przeżycia (OS) u pacjentów z glejakami mózgu WHO G2 i WHO G3.
4. Opracowanie modelu predykcyjnego przeżycia chorych na glejaki mózgu WHO G2 i WHO G3 opartego na sygnaturze składowych całej rodziny miR-200.
5. Opracowanie zintegrowanego modelu predykcyjnego przeżycia u pacjentów na glejaki mózgu WHO G2 i WHO G3 w oparciu o składowe rodziny miR-200 oraz cechy kliniczno-patologiczne.

Materialy i metody

Do badania zakwalifikowano 53 pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem mózgu WHO G2 oraz WHO G3. Materiał pochodzący z blozków parafinowych został przygotowany w Katedrze i Klinice Neurochirurgii i Neurochirurgii Dziecięcej UM w Lublinie. Badania związane z oznaczeniem mutacji IDH 1/IDH 2, kodelecji 1p19q oraz względnej ekspresji składowych rodziny miR-200 zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej UM w Lublinie. W analizie uwzględnieni zostali pacjenci leczeni w Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej. W pierwszym kroku oceniono obecność mutacji IDH 1/IDH 2 oraz kodelecji 1p19q. W drugim kroku metodą Real-Time PCR przeprowadzano ocenę względnej ekspresji wszystkich składowych rodziny miR-200 w tym samym materiale oraz w towarzyszącej tkance nienowotworowej pobranej jednocześnie podczas zabiegu operacyjnego, od tych samych pacjentów. Dodatkowo przeprowadzona została analiza wybranych

cech kliniczno- patologicznych na podstawie dokumentacji medycznej pacjentów włączonych do badania. Analizę czasu całkowitego przeżycia (OS) przeprowadzono dla całej grupy. Przygotowano model regresji logistycznej dla sygnatury miRNA. Na podstawie predykcji z modelu przeprowadzono analizę OS, a także oceniono potencjał predykcyjny sygnatury za pomocą krzywej ROC (ang. Receiver Operating Characteristic). Do selekcji cech klinicznych i zmiennych o istotnym potencjale predykcyjnym związanym z przeżyciem całkowitym pacjentów wykorzystano model regresji krokowej wstecznej, a zmienne były kolejno eliminowane w oparciu o kryterium informacyjne Akaike (ang. Akaike Information Criterion, AIC).

Wyniki

Wykazano istotną różnicę we względnej ekspresji składowych rodziny miR-200 pomiędzy tkanką glejaków mózgu WHO G2 i WHO G3 oraz towarzyszącą tkanką nienowotworową. Istotne obniżenie względnego poziomu ekspresji w tkance nowotworowej zaobserwowano w przypadku składowych miR-200b-5p, miR-200c-3p, miR-141-3p.

Brak obecność kodelecji 1p19q istotnie korelował z wyższym poziomem ekspresji składowej miR-200a-5p.

Nie wykazano różnic względnego poziomu ekspresji składowych rodziny miR-200 w zależności od płci, obecności mutacji IDH1, zakresu resekcji, objętości guza i wykazano jedynie trend zmienności w zależności od lokalizacji dominującej masy guza w zakresie płata ciemieniowego, czołowego i skroniowego.

Wykazano wyższy względny poziom ekspresji składowej miR-200c-3p w tkance glejaków mózgu WHO G2 w porównaniu do glejaków mózgu WHO G3.

Podtyp histologiczny glejaków mózgu istotnie koreluje z różnicami w ekspresji składowych rodziny miR-200. W guzach o typie histologicznym astrocytoma występuje istotnie wyższy poziom względnej ekspresji miR-141-3p, natomiast w guzach o typie histologicznym oligodendroglioma występuje istotnie wyższy poziom ekspresji składowej miR-200a-5p.

Wykazano, że miR-200a-3p, miR-200a-5p, miR-200c-5p, miR-141-3p oraz miR-429 mogą być samodzielnymi predyktorami przeżycia pacjentów z glejakami mózgu WHO G2 i WHO G3.

Lepsze rokowanie w odniesieniu do 2-letniego i 5-letniego OS związane jest z wyższą względną ekspresją miR-200a-3p, miR141-3p w tkance glejaków mózgu WHO G2 i WHO G3.

Lepsze rokowanie w odniesieniu do 2-letniego i 5-letniego OS związane jest z niższą względną ekspresją miR-200a-5p, miR-200c-5p, miR-429 w tkance guzów WHO G2 i WHO G3.

Opracowano model predykcyjny przeżycia chorych na glejaki mózgu WHO G2 i WHO G3 oparty na sygnaturze składowych całej rodziny miR-200, uzyskując stosunkowo wysokie wartości ROC.

Opracowano finalny, zintegrowany model predykcyjny przeżycia pacjentów z glejakami mózgu WHO G2 i WHO G3 w oparciu o składowe rodziny miR-200 oraz cechy kliniczne.

W finalnie opracowanym modelu predykcyjnym przeżycia pacjentów, zintegrowanym z cechami klinicznymi, najsilniejszymi predyktorami przeżycia pacjentów okazały się składowa miR-200a-5p, miR-200b-3p, miR-200c-5p, miR-141-3p, miR-429 oraz objętość guza ($V \text{ cm}^3$) oraz CTV.

Wnioski

1. U chorych na glejaki mózgu WHO G2 i WHO G3, względna ekspresja składowych rodziny miR-200 wykazuje istotne różnice pomiędzy tkanką nowotworową oraz towarzyszącą nienowotworową.
2. Cechy kliniczne, takie jak Grading, podtyp histopatologiczny oraz obecność kodelecji 1p19q istotnie korelują z względym poziomem ekspresji wybranych składowych miR-200.
3. Poszczególne składowe rodziny miR-200 wykazują wartość prognostyczną względem 2-letniego i 5-letniego przeżycia ogólnego (OS) u chorych na wybrane glejaki mózgu WHO G2 i WHO G3.
4. Ze względu na różnice w potencjale predykcyjnym przeżycia, wskazana jest ocena obu nici składowych rodziny miR-200.
5. Model predykcyjny przeżycia chorych na glejaki WHO G2 i WHO G3 oparty na sygnaturze składowych miR-200 wykazuje potencjalną przydatność kliniczną i wymaga potwierdzenia w przyszłych badaniach.
6. Finalny, zintegrowany model przeżycia pacjentów oparty na składowych rodziny miR-200, objętościach guza nowotworowego oraz klinicznej objętości tarczowej (CTV) wykazuje potencjalną przydatność kliniczną i wymaga potwierdzenia w przyszłych badaniach.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Introduction

Gliomas - primary tumors of glial origin are the most common type of tumors of the central nervous system and account for 70-80 % of their total number. They are the cause of about 2% of all cancer cases, which translates into about 2,900 new cases annually in Poland. The number of cases has doubled in the last thirty years. Genetic syndromes and ionizing radiation are commonly recognized risk factors affecting the development of glial tumors. In 2016, WHO published the fourth edition of the classification of the central nervous system tumors; WHO CNS4, where molecular prognostic factors began to play a fundamental role. In 2021, fifth edition of the classification of the central nervous system tumors appeared; WHO CNS 5 which was its sixth version. Molecular factors such as the presence of IDH 1 and IDH 2 mutations and 1p19q codeletion have an established role in prognosis and prediction of response to treatment in patients with gliomas. They are a guide in everyday clinical practice as well as in the design of clinical trials. In the absence of satisfactory progress in the treatment of many types of cancer, including gliomas, a large part of the current research on new prognostic and predictive factors concerns molecular characterization based on the expression of miRNA molecules. These are non-coding fragments that regulate gene expression after the transcription process. They control about 30% of all genes known in mammals, and, importantly, also many oncogenes, tumor suppressor genes and genes responsible for the response to ionizing radiation treatment and systemic treatment. It has been scientifically reported that patients with brain tumors of glial origin have miRNA disorders. Their results indicate that the members of the miR-200 family have an impact on the process of carcinogenesis, progression and metastasis of glial tumors. Therefore, in patients with gliomas, their prognostic and predictive potential is considered. The miR-200 family consists of 5 particles: miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 and miR-429. The members of this family are the most important inhibitors of endothelial-mesenchymal transition (EMT). They can inhibit cell migration, adhesive abilities or angiogenesis process. miRNA can have similar functions to their target genes. Scientific data indicate that the level of expression of one type of miRNA in regard to the other type can vary as for their prognostic value of overall survival in many types of cancer. Therefore, analyzes that integrate a greater number of miRNA particles and clinical-pathological features bring the highest prognostic and predictive value. This allows for the creation of reliable models that more accurately determine the prognosis of patients with a given group of features. Conducting the analysis of a set of several miRNAs, the

so-called signatures increases their power in predicting the survival of patients with WHO G2 and WHO G3 brain gliomas.

Aims

1. Evaluation of the relative expression of individual members of the miR-200 family in neoplastic and adjacent non-cancerous tissue for patients with WHO G2 and WHO G3 gliomas.
2. Evaluation of the relative expression of individual members of the miR-200 family in relation to selected clinico- pathological factors: histopathological diagnosis, the presence of IDH 1/2 mutation, the presence of 1p19q codeletion, Grading, volume of tumor, extent of resection (GTR, STR, biopsy), anatomical area occupied by the tumor, clinical target volume (CTV), the age and sex of patients.
3. Evaluation of the prognostic value of miR-200 family particles based on the analysis of overall survival (OS) in patients with WHO G2 and WHO G3 brain gliomas.
4. Development of a predictive survival model of patients with WHO G2 and WHO G3 brain gliomas based on the signature of the components of the entire miR-200 family.
5. Development of an integrated predictive model of survival in patients with WHO G2 and WHO G3 brain gliomas based on the components of the miR-200 family and clinico- pathological features.

Materials and Methods

53 patients diagnosed with WHO G2 and WHO G3 brain gliomas were qualified for the study. The material derived from the paraffin blocks was prepared at the Department and Clinic of Neurosurgery and Paediatric Neurosurgery of the Medical University of Lublin. Studies related to the determination of the IDH 1/IDH 2 mutation, 1p19q codeletion and relative expression of the members of the miR-200 family were performed at the Department of Forensic Medicine of the Medical University of Lublin. The analysis included patients treated in the Oncology Center of the Lublin Region. In the first step, the presence of the IDH 1/IDH 2 mutation and the 1p19q codeletion were assessed. In the second step, using the Real-Time PCR method, the relative expression of all members of the miR-200 family was assessed in the same material and in the accompanying non-cancerous

tissue collected simultaneously during surgery from the same patients. In addition, an analysis of selected clinical and pathological features was carried out based on the medical records of patients included in the study. Overall survival (OS) analysis was performed for the whole group. A logistic regression model was prepared for the miRNA signature. Based on the predictions from the model, OS analysis was performed, and the predictive potential of the signature was assessed using the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve. A stepwise backward regression model was used to select clinical features and variables with a significant predictive potential related to overall survival, and the variables were successively eliminated based on the Akaike Information Criterion (AIC).

Results

A significant difference in relative expression of miR-200 family members was demonstrated between WHO G2 and WHO G3 brain gliomas tissue and adjacent non-cancerous tissue. A significant decrease in the relative level of expression in tumor tissue was observed for the components miR-200b-5p, miR-200c-3p, miR-141-3p.

The absence of the 1p19q codeletion significantly correlated with a higher level of expression of the miR-200a-5p molecule.

There were no differences in the relative level of expression of the members of the miR-200 family depending on gender, presence of IDH1 mutation, extent of resection, tumor volume, and only a trend of variation depending on the location of the dominant tumor mass in the parietal, frontal and temporal lobes was demonstrated.

A higher relative expression level of the miR-200c-3p molecule was demonstrated in the tissue of WHO G2 brain gliomas compared to WHO G3 brain gliomas.

The histological subtype of brain gliomas significantly correlates with differences in the expression of members of the miR-200 family. In tumors of the astrocytoma histological type, there is a significantly higher level of relative expression of miR-141-3p, while in tumors of the histological type of oligodendroglioma, there is a significantly higher level of expression of the miR-200a-5p molecule.

It was shown that miR-200a-3p, miR-200a-5p, miR-200c-5p, miR-141-3p and miR-429 can be independent predictors of survival in patients with WHO G2 and WHO G3 brain gliomas.

Better prognosis with respect to 2-year and 5-year OS is associated with higher relative expression of miR-200a-3p, miR141-3p in WHO G2 and WHO G3 brain gliomas tissue.

Better prognosis in terms of 2-year and 5-year OS is associated with lower relative expression of miR-200a-5p, miR-200c-5p, miR-429 in the tissue of WHO G2 and WHO G3 tumors.

A predictive model of survival, for patients with WHO G2 and WHO G3 brain gliomas, was developed based on the signature of the components of the entire miR-200 family, obtaining relatively high ROC values.

The final, integrated predictive model of survival of patients with WHO G2 and WHO G3 brain gliomas was developed based on the components of the miR-200 family and clinical features.

In the final version of the patients' overall survival predictive model, integrated with the clinical features, the strongest predictors of patients survival were components: miR-200a-5p, miR-200b-3p, miR-200c-5p, miR-141-3p, miR-429 as well as the volume of the tumor (V cm³) and CTV.

Conclusions

1. In patients with WHO G2 and WHO G3 brain gliomas, the relative expression of miR-200 family members shows significant differences between the neoplastic and adjacent non-cancerous tissues.
2. Clinical features such as Grading, histopathological subtype and the presence of the 1p19q codeletion significantly correlate with relative levels of expression of selected components of miR-200.
3. Individual members of the miR-200 family show prognostic value in terms of 2-year and 5-year overall survival (OS) in patients with selected WHO G2 and WHO G3 brain gliomas.
4. Due to the differences in the predictive potential of survival, it is recommended to evaluate both strands of the miR-200 family members.
5. Predictive model of the survival, for patients with WHO G2 WHO G3 brain gliomas, based on the signature of miR-200 members shows potential clinical efficacy and it demands confirmation in further studies.

6. The final, integrated model of patient survival based on the miR-200 family members, tumor volume and clinical target volume (CTV) shows potential clinical usefulness and requires confirmation in future studies.