

The prognostic and therapeutic relevance of *TERT* activation in neuroblastoma

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Andrea Krämer

aus Bergisch Gladbach

(M&S Druckhaus GmbH, Köln)

Köln, 2017

Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist ein pädiatrischer Tumor des sympathischen Nervensystems mit äußerst unterschiedlichen klinischen Verläufen, die von spontaner Regression bis zu unaufhaltsamer Progression reichen. In den vergangenen Jahren wurden wesentliche Fortschritte in der Erforschung der genetischen Ursachen der unterschiedlichen Verlaufsformen erzielt. So wurden in Hochrisiko-Neuroblastomen häufig Amplifikationen des Gens *MYCN* oder genomische Veränderungen am *TERT* Genlokus beobachtet, die beide zu einer Induktion des Enzyms Telomerase führen. In einer weiteren Gruppe der Hochrisikotumoren fanden sich inaktivierende Mutationen des Gens *ATRX*, die mit einer Aktivierung des sogenannten „Alternative Lengthening of Telomeres“ Mechanismus (ALT) assoziiert sind. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass die Aktivierung von Telomer-Verlängerungsmechanismen eine zentrale Rolle in der Entstehung von Hochrisiko-Neuroblastomen spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich die prognostische Relevanz der zwei bekannten Telomer-Verlängerungsmechanismen im Neuroblastom analysiert. Eine genomische Veränderung am *TERT* Genlokus konnte in 45/436 Tumoren (42/218 Hochrisiko und 3/218 Nicht-Hochrisiko) nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich eine ALT-Aktivierung in 36/225 Tumoren (28/128 Hochrisiko und 8/97 Nicht-Hochrisiko). Eine Amplifikation des Proto-Onkogens *MYCN* wurde in 94/436 Fällen (ausschließlich in Hochrisikopatienten) vorgefunden. Die kleine Gruppe von Hochrisikopatienten, deren Tumor weder Telomer-Verlängerungsmechanismen noch eine *MYCN* Amplifikation aufwies, waren durch eine erhöhte *TERT* Genexpression charakterisiert. Patienten, deren Tumor eine Aktivierung von Telomer-Verlängerungsmechanismen aufwies, zeigten einen schlechteren klinischen Verlauf im Vergleich zu den Patienten, deren Tumor keine Telomer-Verlängerungsmechanismen hatte. Diese Daten erlauben es, eine neue Neuroblastom

Hochrisikopatientengruppe zu klassifizieren, die durch die Aktivierung der Mechanismen zur Erhaltung der Telomerlänge charakterisiert ist.

Darüber hinaus habe ich im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich die Aktivierung des Enzyms Telomerase in Hochrisiko-Neuroblastomen therapeutisch nutzen lässt. Die Behandlung von Telomerase-positiven Zelllinien mit verschiedenen Telomerase-Inhibitoren führte, im Gegensatz zur Behandlung von ALT-positiven Zelllinien, zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Lebendzellzahl *in vitro*. In einem *TERT*-rearrangierten sowie in einem *MYCN*-amplifizierten Xenograft-Maus-Modell führte die Behandlung mit 6-thio-2'-deoxyguanosine (6-thio-dG) - einem Nukleosid-Analog, welches in die Telomere eingebaut wird - zu einem verzögerten Tumorwachstum. Ein ALT-positives Xenograft-Maus-Modell zeigte unter der Behandlung von 6-thio-dG hingegen keine Beeinträchtigung des Tumorwachstums.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Neuroblastome der Hochrisikogruppe im Wesentlichen durch eine Aktivierung von Telomer-Verlängerungsmechanismen definiert sind. Die Ergebnisse könnten in Zukunft die Risikostratifizierung von Neuroblastompatienten verbessern und einen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien liefern, in denen das Enzym Telomerase als therapeutischer Angriffspunkt genutzt wird.

Abstract

Neuroblastoma is a childhood malignancy of the sympathetic nervous system with a broad range of clinical courses, ranging from spontaneous regression to fatal progression. Over recent years, genomic sequencing studies have shed light on the genetic etiology of the diverse neuroblastoma phenotypes. It was found that high-risk neuroblastoma frequently harbors amplification of *MYCN* and genomic rearrangements of *TERT*, both of which induce telomerase activity. An additional subgroup of high-risk neuroblastoma is characterized by inactivating mutations of *ATRX*, which is associated with activation of the Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) pathway. Together, these studies suggested that activation of telomere maintenance mechanisms may play a central role in high-risk neuroblastoma pathogenesis.

In this study, I determined the prognostic relevance of alterations associated with telomere maintenance mechanisms in neuroblastoma. Genomic *TERT* rearrangements were found in 45/436 tumors (42/218 high-risk and 3/218 non high-risk patients). Furthermore, 36/225 tumors (28/128 high-risk and 8/97 non high-risk) were found to be positive for ALT-activation. Amplification of the proto-oncogene *MYCN* occurred in 94/436 cases (affecting only high-risk patients). A small group of high-risk tumors lacking *MYCN* amplification and *TERT* alterations as well as ALT-activation was characterized by elevated *TERT* expression levels. Patients positive for telomere maintenance showed a poor clinical outcome compared to patients without telomere maintenance. Together, these results suggest a more precise definition of a neuroblastoma high-risk subgroup that is characterized by the presence of telomere maintenance.

In addition, I examined whether telomerase can be exploited as a therapeutic target in high-risk neuroblastoma. I found that treatment with various telomerase inhibitors led to a decrease in viable cell numbers in telomerase-positive cell lines *in vitro*, while ALT-positive

cell lines were significantly less sensitive. Furthermore, treatment with 6-thio-2'-deoxyguanosine (6-thio-dG) - a nucleoside analogue that is incorporated into telomeres - impaired tumor growth of *TERT*-rearranged and *MYCN*-amplified mouse xenograft models *in vivo*, while the ALT-positive xenograft model was not affected.

Taken together, these results demonstrate that high-risk neuroblastoma is largely defined by activation of telomere maintenance mechanisms. These findings may have implications for neuroblastoma risk assessment and treatment stratification in the future, and provides a rationale for developing novel therapeutic strategies using telomerase as a target in high-risk neuroblastoma.