

Diss. ETH N° 28525

THE MOLECULAR UNDERPINNINGS OF WILD-TYPE VON HIPPEL-LINDAU CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

AASHIL A BATAVIA

M.Sc Bioinformatics and Systems Biology

The University of Manchester

Born on 30.01.1993

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Niko Beerenwinkel
Prof. Dr. Mitch Levesque
Prof. Dr. Holger Moch

Abstract

The following work was conducted within the Department of Pathology and Molecular Pathology at the University Hospital Zurich (USZ) and The Department of Biosystems Science and Engineering at Eidgenössische Technische Hochschule Zürich. In this dissertation, I assess the clinical and molecular phenotypes of wild-type *von Hippel-Lindau* renal cell carcinoma with clear cell histology (^{wt}*VHL* ccRCC). *VHL* aberrations are central for tumourigenesis in ccRCC. The identification but frequent dismissal of ^{wt}*VHL* ccRCC in scientific literature has led to a profound lack of understanding as to the tumorigenesis and molecular phenotypes of these carcinoma. Unveiling the molecular and clinical characteristics of these rare malignancies is the goal of my work.

In Chapter **I** the context from which my work originates is set. I introduce the varied landscape of renal cell carcinoma with clear cell histology and the importance of *VHL* aberrations as evolutionarily truncal events within these tumours, initiating tumourigenesis. I describe the role of other factors e.g. the SWI/SNF gene family and pathways e.g. PI3k–AKT–mTOR which, in combination with *VHL* aberrations, promote tumour progression in ccRCC. I also further introduce a new tumour entity now termed ELOC RCC (previously TCEB1 RCC) characterised by the biallelic inactivation of *ELOC* which lies within the same E3 ubiquitin ligase complex as protein VHL (pVHL). In Chapter **II** I present my work identifying rare ELOC RCC with clear cell histology from a patient cohort derived from the USZ Tissue Biobank. Genomic assessment of FFPE derived tumours allowed the identification of those with Chromosome 8q deletions and *ELOC* mutations resulting in its biallelic inactivation. I identify a novel *ELOC* variant which I describe using *in silico* structure modelling and structural docking analysis. Using mass spectrometry I show biallelic inactivations of *ELOC* result in the reduced expression of Elongin-C and may cause tumourigenesis via similar pathways as the biallelic inactivation of *VHL*. Chapter **III** contains the clinical and molecular characterisation of the remaining ^{wt}*VHL* ccRCC which do not contain biallelic *ELOC* inactivations. I obtain, assess and integrate genomic, epigenomic, transcriptomic, proteomic and clinical data from both my own cohort and publicly available sources to assess the molecular landscape of ^{wt}*VHL* ccRCC in comparison to classical ccRCC. I find ^{wt}*VHL* ccRCC tumours confer a poorer prognosis than those with *VHL* aberrations caused by an increase in invasive properties. Specifically I find, across multiple omic layers, factors promoting cell division, EMT and migration are elevated in ^{wt}*VHL* ccRCC in comparison to classical ccRCC. Chapter **IV** forms the conclusion of this work, summarising the findings and limitations as well as providing an outlook for future research.

Kurzfassung

Die folgende Arbeit wurde am Institut für Pathologie und Molekularpathologie des UniversitätsSpitals Zürich und des Departments für Biosystems Science and Engineering an der Eidgenössischen Technischen Hochschule ausgeführt. In dieser Doktorarbeit gehe ich auf die klinischen und molekularen Phänotypen von Nierenzellkarzinomen (NZK) mit intaktem (Wildtyp) von Hippel-Lindau Gen und klarzelliger Histologie ein (*wtVHL* klarzellige NZK bzw. *wtVHL* kNZK). VHL Genveränderungen sind der Schlüssel für die Entstehung von kNZK. Die Identifizierung, aber häufige Vernachlässigung, von *wtVHL* kNZK in der wissenschaftlichen Literatur führte zu einer starken Wissenslücke hinsichtlich Entstehung und molekularen Phänotyps dieser Karzinome. Das Ziel meiner Arbeit ist die Entschlüsselung der molekularen und klinischen Charakteristika dieser seltenen Tumoren.

Kapitel **I** steckt den Rahmen meiner Arbeit ab. Ich beginne mit den unterschiedlichen Formen des Nierenzellkarzinoms mit klarzelliger Histologie und der Bedeutung von *VHL* Änderungen als evolutionärem Hauptereignis für die Entstehung dieser Tumore. Ich beschreibe die Rolle anderer Faktoren, wie zum Beispiel die der SWI/SNF Genfamilie und von Signalpfaden, wie dem von PI3K-AKT-mTOR, die zusammen mit *VHL* Mutationen die Tumorprogression in kNZK fördern. Ich stelle auch eine neue Tumorentität vor, ELOC NZK (vormals TCEB1 NZK), die durch biallelische Inaktivierung von *ELOC* charakterisiert ist und die sich im selben E3 Ubiquitin Ligase Komplex befindet wie das *VHL* Protein. In Kapitel **II** führe ich aus wie ich mit Hilfe einer aus der USZ Nierentumor-Biobank stammenden Patientenkohorte seltene ELOC NZK mit klarzelliger Histologie identifiziere. Die genomische Analyse Formalin fixierter, in Paraffin eingebetteter Tumoren erlaubten die Identifizierung solcher mit Chromosom 8q Deletionen und *ELOC* Mutationen, was zu einer biallelischen Inaktivierung führt. Ich identifiziere eine neue *ELOC* Mutationsvariante, welche ich mit Hilfe von in silico Strukturmodellierung und struktureller «Docking» Analyse beschreibe. Durch Massenspektrometrie zeigen wir, dass eine biallelische Inaktivierung von *ELOC* zu reduzierter Expression von Elongin-C führt. Dies könnte über ähnliche Signalwege wie bei einer biallelischen *VHL* Inaktivierung zu einer Tumorentstehung führen. Kapitel **III** beinhaltet die klinische und molekulare Charakterisierung der restlichen *wtVHL* kNZK welche keine biallelische *ELOC* Inaktivierung aufweisen. Ich erhalte, bearbeite und integriere genomische, epigenomische, transkriptomische, proteomische und klinische Daten sowohl von meiner eigenen Kohorte als auch von öffentlich verfügbaren Quellen, um die molekularen Eigenheiten von *wtVHL* kNZK mit denen der klassischen kNZK zu vergleichen. Ich stellte fest, dass *wtVHL* kNZK eine schlechtere Prognose aufweisen als Tumoren mit *VHL* Änderungen, was durch eine Zunahme invasiver Merkmale verursacht wird. Insbesondere zeigte sich, dass über mehrere omic layer hinweg, Faktoren die die Zellteilung, EMT und Migration fördern, bei *wtVHL* ccRCC im Vergleich zu klassischem ccRCC erhöht sind. Kapitel **IV** ist der Schlussfolgerung aus dieser Arbeit gewidmet, in welchem Resultate und Limitationen zusammengefasst, so wie ein Ausblick auf die zukünftige Forschung gegeben werden.