

Florian Janke

Dr. sc. hum.

Genome-wide epigenomic analyses of cell free DNA from anaplastic lymphoma kinase-rearranged non-small cell lung cancer patients

Fach/Einrichtung: Humangenetik

Doktorvater: Prof. Dr. Holger Sültmann

Zielgerichtete Therapien verbessern die Prognose von fortgeschrittenen anaplastische Lymphomkinase-getriebenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (ALK⁺ NSCLC)-Patienten. Dennoch variiert das Ansprechen, aufgrund des Auftretens von Therapieresistenzen während der Behandlung, erheblich. Die zeitnahe Detektion von Therapieversagen ist essentiell, um Folgebehandlungen zu leiten und dadurch den klinischen Ausgang zu optimieren. Die Analyse von tumorassoziierten Veränderungen in zellfreier DNA (cfDNA) bietet die Möglichkeit Tumordynamiken und Therapieansprechen in longitudinal gesammelten Plasmaproben zu überwachen. Neben Mutationen und Kopienzahlveränderungen, stellen epigenetische Veränderungen im Tumor vielversprechende Biomarker für cfDNA-basierte Analysen dar.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von tumorassoziierten Methylierungs- (5mC) und Hydroxymethylierungsveränderungen (5hmC) in cfDNA von metastasierten ALK⁺ NSCLC Patienten. Zudem wurden diese epigenetischen Marker mit Genexpressionsdaten aus Lungenkrebsgewebe assoziiert und deren Eignung für die Überwachung von Tyrosinkinaseinhibitor-Therapien in seriellen Plasmaproben geprüft.

Zu diesem Zweck wurden 79 longitudinale Plasmaproben von 31 Patienten und 14 Proben von gesunden Spendern gesammelt. Das Erstellen von genomweiten 5mC und 5hmC Profilen erfolgte durch Immunpräzipitation von methylierter cfDNA, sowie chemischer Markierung und anschließender Präzipitation von hydroxymethylierter cfDNA. Die angereicherten cfDNA-Fraktionen wurden anschließend sequenziert. Zudem wurden 5(h)mC-Profile von primären Monozyten, neutrophilen Granulozyten und erythroiden Vorläuferzellen generiert. Diese hämatopoetischen Zelltypen generieren den Großteil (72.2%) der nicht-tumorassoziierten cfDNA in Krebspatienten.

Eine technische Neuheit dieser Studie war die Anreicherung von tumorassoziierten 5(h)mC Veränderungen in cfDNA durch Ausschluss von genomischen Regionen mit hohen (Hydroxy-)methylierungssignalen in den analysierten Blutzelltypen. Von 9.603.454 300-bp Regionen wiesen 577.701 (5mC; 6.0%) und 499.681 (5hmC; 5.2%) geringe (oder keine) Signale in den Blutzellen auf. Im Vergleich zu dem gesamten Datensatz zeigten die blutzellgefilterten Regionen eine erhöhte Korrelation zu Methylierungsdaten aus Lungenkrebsgewebe (Spearman,

$\rho = 0.11$ vs. $\rho = 0.26$). Zudem wurden krebs- und gewebespezifische 5mC-Veränderungen identifiziert. Die Gegenüberstellung der blutzellgefilterten genomischen Regionen von Patienten- und Kontrollproben resultierte in 5.499 differenziell methylierten (DMRs) und 495 differenziell hydroxymethylierten Regionen (DhMRs). Anhand der D(h)MRs konnte eine eindeutige Separation der Proben von Patienten und gesunden Spendern erzielt werden (hierarchische Clusteranalyse). Patientenproben mit vergleichbarem Tumorgehalt in der cfDNA wiesen die höchste Ähnlichkeit auf. Dies deutet darauf hin, dass vom Tumor stammende 5(h)mC Signale die Probenseparation maßgeblich beeinflussen und die identifizierten D(h)MRs größtenteils tumorassoziiert sind. Die Anreicherung von DMRs nahe Transkriptionsstartpunkten von Genen mit herunterregulierter Expression in Lungenkrebsgewebe zeigte, dass regulatorische 5mC-Markierungen aus cfDNA abgeleitet werden können. Viele dieser 5mC-regulierten Gene (z.B. *GATA4* oder *HOXA9*) wurden zuvor als Tumor-Suppressoren in NSCLC beschrieben. 5(h)mC-Signale korrelierten mit genomischen Alterationen (z.B. *EML4-ALK* Fusion und globale chromosomale Instabilität [t-MAD score]), gemessen aus den gleichen Plasmaproben. *PTGER4*-Methylierung und der t-MAD score zeigten die höchste Korrelation (Pearson, $r = 0.86$). Die Eignung von vier 5mC (*SOX9-AS1*, *HOXA10-AS*, *PRAC1*, und *PTGER4*) und drei 5hmC (*IL1RAP*, *KPNA7* und *KIF25*) Biomarkern zur Therapieüberwachung von zehn Patienten mit longitudinalen Plasmaproben (≥ 2) wurde getestet. Besonders 5mC-Marker spiegelten dynamische Veränderungen des Tumors wider, die bereits durch bildgebende Verfahren und in cfDNA-basierter genomischer Analyse gefunden wurden. In vier Fällen ließen 5mC Signale das Rezidiv des Tumors vor radiologischem Progress erkennen (max. 481 Tage früher). Der Progress eines Patienten wurde sowohl durch 5mC- als auch 5hmC-Biomarker vor der Bildgebung und der genomischen cfDNA Analyse erkannt. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Analyse von tumorassoziierten 5mC- und 5hmC-Veränderungen in cfDNA sensitive Möglichkeiten zur Detektion von Tumoren und Therapieüberwachung darstellen. Die Gewebespezifität dieser DNA-Modifikationen sowie deren Rolle in der Regulierung von Genexpression ermöglicht Einblicke in den Tumor, die gegenwärtig durch die Detektion von Kopienzahlveränderungen oder Mutation nicht gewährleistet werden kann.