

Helin Dogan
Dr. med.

Towards precision CNS tumor diagnostics using third-generation and single-cell sequencing

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. med. Felix Sahm

Tumore des zentralen Nervensystems wurden klassischerweise anhand ihres histopathologischen Erscheinungsbildes diagnostiziert. Im Zuge der Entwicklung molekular-diagnostischer Verfahren wurden die genetischen Grundlagen der Tumorentstehung zunehmend erforscht und zahlreiche charakteristische Alterationen identifiziert. Diese erlauben eine präzisere Diagnose sowie Risikostratifizierung. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der DNA Methylierungsanalyse zu, die eine detaillierte Klassifikation in Subgruppen ermöglicht. Obwohl die molekulare Diagnostik bereits Einzug in die WHO-Klassifikation gefunden hat, sind diese Analysen häufig nur an großen Zentren verfügbar, da sie mit hohen Investitionen verbunden sind. Da sie sich außerdem nur bei hohem Durchsatz rentieren, müssen Tumorproben in kleinen Einrichtungen teilweise über mehrere Wochen gesammelt werden, was zwangsläufig zu Verzögerungen in der Diagnostik sowie gegebenenfalls Therapieeinleitung führt.

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde eine kostengünstige sowie zeitsparende Pipeline etabliert, die sich der so genannten Nanopore Sequenzierung sowie einer kürzlich dafür entwickelten Software alias ReadFish bedient. ReadFish ermöglicht die zielgerichtete Sequenzierung molekularer Marker, indem die Genomsequenz in Echtzeit ermittelt wird. Die Pipeline namens Rapid-CNS² erfasst die molekularen Marker aus dem Heidelberger Hirntumor-Panel sowie die CpG Sites aus dem Heidelberger Methylierungs-Classifer. Sie erlaubt damit die simultane Analyse von Mutationen, Kopiezahlveränderungen, des MGMT Promoterstatus sowie der Klassifizierung anhand des Methylierungsprofils. Rapid-CNS² wurde retro- sowie prospektiv anhand der zugehörigen NGS sowie EPIC-Array Daten an 55 Gliom-Proben validiert. Dabei zeigte sich eine komplette Übereinstimmung bezüglich der Kopiezahlprofile, der Methylierungsklassen entsprechend der Version v11b4 des Heidelberger Classifiers sowie des MGMT Promoterstatus. Pathognomonische Mutationen zeigten in 96% eine Kongruenz. Darüber hinaus ließen sich die Methylierungs-Subklassen in 41/55 Fällen nachweisen. Um die Wirtschaftlichkeit der Methode zu erhöhen, wurde Rapid-CNS² zum einen mit einem weniger umfangreichen Panel sowie bei kürzerer Sequenzierdauer (24 h) getestet. Trotz dieser Modifikationen zeigte sich weiterhin eine sehr hohe und zuverlässige Übereinstimmung. Zusammenfassend stellt Rapid-CNS² eine innovative Pipeline zur molekularen Diagnostik von Hirntumoren dar, die mit niedrigen Investitionen verbunden, einfach durchführbar sowie je nach Anzahl der Zielmarker innerhalb weniger Stunden

umzusetzen ist. Insbesondere der flexiblen Auswahl von Zielmarkern anhand einer einfachen Tabelle sowie die dynamische Anpassung während der Sequenzierung ist nicht zu vernachlässigen. Insgesamt stellt sie so einen Ansatz zur Dezentralisierung der molekularen Diagnostik dar sowie ein alternatives Verfahren für dringliche Fälle.

Im zweiten Abschnitt der Dissertation wurden neue Methoden zur Einzelzell-Sequenzierung genutzt, um die Heterogenität von Transkriptionsprofilen einzelner Zellen, ihre epigenetischen Korrelate sowie die klonale Evolution anhand von Meningeomen nachzuvollziehen. Durch die integrierte Datenanalyse aus „bulk“ RNA-Sequenzierung sowie DNA Methylierungsanalyse bezüglich eines bekannten molekularen Markers in Meningeomen – des CDKN2A Status – konnte eine Gruppe CDKN2A hoch exprimierender maligner Meningeome gefunden werden, vorausgesetzt, das CDKN2A-Gen war nicht, wie sonst üblich, deletiert. Die homozygote Deletion des CDKN2A-Gens ist bereits ein etablierter diagnostischer Marker für maligne Meningeome. Die Integration mit Überlebensdaten sowie die Analyse von Paaren aus Primarius und Rezidiv zeigte, dass eine hohe CDKN2A Expression ebenso als negativer prädiktiver Marker angesehen werden kann. Daraufhin wurde die Eignung der p16-Immunhistochemie als potentiell einfache und kostengünstige Detektionsmethode getestet. Die p16-Positivität korrelierte zwar nur schlecht mit dem CDKN2A-Deletionsstatus, da benigne Tumore ebenso wenig CDKN2A exprimieren, dafür aber besser mit dem Expressionslevel. Meningeome mit hoher CDKN2A-Expression zeigten ähnliche hochregulierte Transkriptionswege wie diejenigen mit CDKN2A-Deletion. Darüber hinaus zeigte sich in Tumoren mit hoher Expression eine Zugänglichkeit des Chromatins im Bereich des CDKN2A-Gens. Diese Beobachtungen unterstützten die Hypothese, dass die hohe CDKN2A Expression einen Kompensationsmechanismus darstellt, um als Inhibitor des Zellzyklus die Proliferation zu bremsen. Das geöffnete Chromatin wird hierbei jedoch dem Risiko einer Deletion ausgesetzt. Der Zustand hoher CDKN2A Expression stellt also möglicherweise die Vorstufe zur Deletion dar, was die Bedeutung als negativ prädiktiven Marker ebenso erhöht.

Eine weniger verbreiterte Technik der Einzelzellsequenzierung ist die DNA-Sequenzierung. Diese wurde gemeinsam mit einem eigens hergestellten Amplicon-Panel zur Modellierung der klonalen Evolution in ko-mutierten Meningeomen angewendet. Während Allelfrequenzen aus NGS-Diagnostik keine Aussage über die Mutationssequenz in Tumoren mit TRAF7- und/oder AKT1/KLF4-Mutation ableiten ließen, kristallisierten sich in den Einzelzelldaten drei Subklone heraus. Der Genotyp dieser Subklone legte nahe, dass TRAF7 am ehesten als tumorinitiierende Alteration auftritt, gefolgt von einem „second-hit“ in AKT1 oder KLF4. Unterstützt wurde diese Hypothese dadurch, dass der Großteil der einzelmutierten Meningeome TRAF7-Mutationen trug – womöglich als Vorstufe zum ko-mutierten Zustand.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Einzelzellanalysen auf Ebene des Genoms, des Epigenoms sowie des Transkriptoms sowie die Integration dieser Ebenen im Sinne von „Multiomics“ eine große Bedeutung für das Verständnis der Tumorentstehung sowie der personalisierten Therapieentwicklung zukommt.