

Tim Florian Iser
Dr. med.

Cerebrospinal fluid derived cell-free DNA for liquid biopsies in central nervous system gliomas

Fach/Einrichtung: Neurologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Wolfgang Wick

Primäre Gliome des zentralen Nervensystems (ZNS) können anhand charakteristischer genetischer Veränderungen klassifiziert werden. Neben festem Gewebe, das durch Operation oder Biopsie gewonnen wird, stellt zellfreie DNA (cfDNA) aus dem Liquor cerebrospinalis (CSF) eine alternative Materialquelle für genomische Analysen dar.

In diesem Dissertationsprojekt wurde eine Methode für die Tumordiagnostik anhand von cfDNA aus CSF entwickelt. Insbesondere wurden die cfDNA Isolation und Erstellung von Sequenzierungs-Bibliotheken für eine gezielte Next-Generation-Sequenzierung (NGS) optimiert, sowie eine für CSF-cfDNA optimierte bioinformatische Auswertungs-Pipeline entwickelt. Schlussendlich ermöglichte die kombinierte Betrachtung von Kopienzahlvariation (CNV) -profilen, Einzelnukleotidvarianten (SNVs) und kleinen Insertionen/Deletionen (Indels) die Entwicklung einer Molekulare Diagnose aus CSF für primäre ZNS Gliome.

Die beschriebene Methodik und Molekulare Diagnose wurde in einer Kohorte von 85 Patient*innen mit dem Verdacht auf ein primäres oder rezidivierendes ZNS-Gliom evaluiert. Anhand vorhandener klinischer Diagnosen erfolgte die Zuteilung der Patient*innen in eine von vier Subkohorten: „Glioblastome“ (n = 32), „andere Gliome“ (n = 19), „nicht-maligne Grunderkrankungen“ (n = 17) und Patient*innen mit „keiner verfügbaren finalen Diagnose“ (n = 17).

Tatsächlich war eine Molekulare Diagnose der Tumorentität oder die Identifikation tumorspezifische genetischer Alterationen bei 75,0 % (n = 24) der Glioblastome und 52,6 % (n = 10) der anderen Gliome möglich. Die Spezifität der Methodik zeigte sich zudem darin, dass keine nicht-malignen Erkrankungen fälschlicherweise als Tumor diagnostiziert wurden.

Für 38 Fälle der „Glioblastome“ und „andere Gliome“ Kohorten lagen Gewebeproben des zugehörigen soliden Tumors zum Vergleich vor. Die Übereinstimmung zwischen

CSF und solidem Gewebe war am höchsten für CNVs (26-48 %) und SNVs an spezifischen Genloci, welche gesondert betrachtet wurden (44 %). SNVs/Indels welche durch klassische Variantenidentifikationsmethoden identifiziert wurden, zeigten eine deutlich geringere Überlappung (8-14 %).

Interessanterweise konnte auch bei 23,5 % (n = 4) der Patient*innen mit „keiner verfügbaren finalen Diagnose“ eine Molekulare Diagnose aus Liquor cerebrospinalis (CSF) gestellt werden. Insbesondere solche Patient*innen profitieren von einer cfDNA Sequenzierung, da hier die operative oder biopsische Probengewinnung häufig aufgrund eines hohen Operationsrisikos nicht durchgeführt wurde.

Ein weiterer Teil des Projektes beschäftigte sich mit der Etablierung einer Methode für die Methylierungsanalyse von Cytosin-Basen in CpG-Inseln basierend auf cfDNA aus CSF. Solche Methylierungsanalysen sind in den letzten Jahren fester Bestandteil der molekularen Neuropathologie geworden und werden routinemäßig für die Diagnostik von ZNS-Gliomen eingesetzt. Auch hier konnte ein experimenteller Ablauf entwickelt werden, welcher die prinzipielle Kompatibilität von cfDNA aus CSF mit Methylierungsanalysen basierend auf dem Infinium MethylationEPIC kit zeigte.

Zusammenfassend konnte in dem hier vorgestellten Dissertationsprojekt ein End-zu-End Protokoll für die molekulare Diagnostik von primären ZNS-Gliomen aus CSF etabliert werden. Limitationen der beschriebenen Methodik liegen vor allem in der Sensitivität und Spezifität der Identifikation einzelner Varianten. Die kombinierte Betrachtung von CNVs, Varianten an spezifischen Genloci und klassischer Variantenidentifikation ermöglichte jedoch trotzdem eine molekulare Diagnosestellung in vielen Fällen. Eine Weiterentwicklung der Methode könnte in der Integration weiterer Methoden wie der beschriebenen Methylierungsanalysen, der Digitalen Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR) oder der Ganzgenomsequenzierung mit niedriger Abdeckung (lcWGS) liegen.